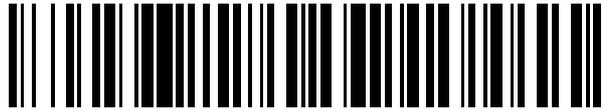


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 743 423**

51 Int. Cl.:

A61P 1/00 (2006.01)

A61K 38/20 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 1/04 (2006.01)

A61P 1/06 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.10.2012 PCT/US2012/058574**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.04.2014 WO14055073**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.10.2012 E 12885969 (1)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **10.07.2019 EP 2903629**

54 Título: **Conjugado de anticuerpos para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.02.2020

73 Titular/es:
**PHILOGEN S.P.A. (100.0%)
La Lizza 7
53100 Siena, IT**

72 Inventor/es:
**NERI, GIOVANNI;
SCHWAGER, KATHRIN;
RUZEK, MELANIE;
O'HARA, DENISE y
CHEN, JIANQING**

74 Agente/Representante:
CARPINTERO LÓPEZ, Mario

ES 2 743 423 T3

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

DESCRIPCIÓN

Conjugado de anticuerpos para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal

La presente invención se refiere al tratamiento y a la detección de una enfermedad inflamatoria intestinal (EII). La invención implica el uso de un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina, especialmente un miembro de unión específico que se une al dominio ED-A de la fibronectina. El miembro de unión específico se conjuga con interleucina-10.

Antecedentes de la invención

La enfermedad inflamatoria intestinal (EII) es un grupo de afecciones inflamatorias que afectan al colon y al intestino delgado. Los principales tipos de EII son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU). La patogénesis de la EII se caracteriza por una regulación angiogénica diferente que contribuye a, y perpetúa, un estado inflamatorio crónico en el intestino (Chidlow y col., 2006, Am J Physiol. Gastrointest. Liver Physiol., 29, G5 - G18). La enfermedad de Crohn puede afectar a cualquier parte del tubo digestivo, mientras que habitualmente la colitis ulcerosa se limita al colon y al recto (Summers RW, Elliott DE, Qadir K, Urban JF, Thompson R, Weinstock JV (2003) Am. J. Gastroentol., 98: 2034-2041). Dependiendo de su gravedad, el tratamiento de la colitis ulcerosa puede requerir inmunosupresión para controlar sus síntomas y el tratamiento generalmente implica la administración de moléculas antiinflamatorias.

Se sabe que la EII se caracteriza por la regulación positiva de citocinas proinflamatorias, tales como IFN- γ , IL-6 e IL-12 (por ejemplo, IL-12p70). Por ejemplo, se sabe que la enfermedad de Crohn está asociada a un exceso de producción de IL-12/IL-23 e IFN- γ /IL-17 (Strober y col. (2007), The Journal of Clinical Investigation, 117(3), 514-521). También se ha informado sobre la síntesis de IL-12p70 e IL-23 durante la enfermedad de Crohn activa (Fuss y col. 2006, Inflamm. Bowel Dis. 12: 9-15).

La fibronectina (FN) es una glucoproteína y se expresa ampliamente en una variedad de tejidos normales y fluidos corporales. Es un componente de la matriz extracelular (MEC) y desempeña un papel en muchos procesos biológicos, incluyendo la adhesión celular, la migración celular, la hemostasia, trombosis, curación de heridas, la diferenciación tisular y la transformación oncogénica.

Las diferentes isoformas de FN se generan mediante corte y empalme alternativo de tres regiones (ED-A, ED-B, IIICS) del transcrito primario de pre-ARNm de la FN, un proceso que está modulado por citocinas y pH extracelular (Balza (1988) FEBS Lett., 228, 42-44; Carnemolla (1989) J. Cell Biol., 106, 1139-1148; Borsi (1990) FEBS Lett. 261, 175-178). La fibronectina contiene dos extradominios globulares de tipo III que se pueden someter a un corte y empalme alternativo: ED-A y ED-B (French-Constant (1995) Exp. Cell Res., 22, 261-271, Kaspar y col. (2006) Int. J. cáncer, 118, 1331-1339). Los ED-A de la fibronectina de ratón y la fibronectina humana son idénticos en un 96,7 % (solo 3 aminoácidos difieren entre las dos secuencias de 90 aminoácidos).

Se ha informado acerca de la expresión del ED-A de la fibronectina en células tumorales y en tumores sólidos a nivel del ARNm en el cáncer de mama (Jacobs y col. (2002) Human Pathol, 33, 29-38, Matsumoto y col. (1999) Jpn. J. Cancer Res., 90, 320-325) y en el cáncer de hígado (Oyama y col. (1989) JBC, 264, 10331-10334, Tavian y col. (1994) Int. J. Cancer, 56, 820-825) y al nivel de proteína aislada en fibrosarcoma, rhabdomyosarcoma y melanoma (Borsi y col. (1987) J. Cell Biol., 104, 595-560). Además de en cáncer, se ha informado acerca de la expresión del ED-A de la fibronectina en la artritis reumatoide (documento WO2009/056268). El documento WO2010/078950 también informa acerca de la expresión del ED-A de la fibronectina en la endometriosis, psoriasis y artritis psoriásica, sin embargo, los análisis histoquímicos realizados revelaron una expresión muy débil o prácticamente ausente del ED-A en la esclerosis múltiple y en la colitis ulcerosa. Los análisis inmunohistoquímicos comunicados por Brenmoehl y col. (Int. J. Colorectal Dis. (2007) 22: 611-623) muestran que la expresión del ED-A disminuye en la mucosa intestinal inflamada de pacientes con EC en comparación con la mucosa de control y aumenta en la colitis ulcerosa. Brenmoehl y col. (2007) también comunicaron un aumento de la expresión de las isoformas ED-A y ED-B en la mucosa fibrótica de pacientes con EC. Dado que se sabe que estas isoformas de fibronectina están implicadas en la cicatrización de heridas, se espera que en la mucosa fibrótica, se produzca la expresión de las isoformas ED-A y ED-B. Brenmoehl y col. (2007) no sugieren que el ED-A se exprese durante la EC (activa), dada la disminución de la expresión del ED-A en la mucosa intestinal inflamada de los pacientes con EC en comparación con la mucosa procedente de pacientes de control. En este documento tampoco se desvela el uso de miembros de unión que se unen a la isoforma ED-A de la fibronectina para el tratamiento o diagnóstico de la EII.

La interleucina-10 (IL-10) es una citocina antiinflamatoria que funciona como un importante regulador del sistema inmunitario. Aunque se sabe que la IL-10 desempeña muchos papeles diferentes en el sistema inmunitario, sus dos actividades principales incluyen la inhibición de la producción de citocinas por macrófagos y la inhibición de las funciones accesorias de los macrófagos durante la activación de linfocitos T (Abbas A, Lichtman A, Pober J., 1994, Cellular and Molecular Immunology, 2ª ed. Filadelfia: W. B. Saunders Company). Los efectos de estas acciones hacen que la IL-10 juegue principalmente un papel antiinflamatorio en el sistema inmunitario. La IL-10 se conoció originalmente como el factor inhibidor de la síntesis de citocinas (CSIF, siglas del inglés *cytokine synthesis inhibiting factor*), y el descubrimiento de esta proteína se basó en su actividad biológica (Delves P, Roitt I (eds), 1998, Encyclopedia of Immunology, 2ª ed. San Diego: Academic Press). Debido a sus conocidas propiedades

antiinflamatorias, la terapia con IL-10 se introdujo como una nueva posible terapia antiinflamatoria en la enfermedad de Crohn (EC) (Fedorak y col., *Gastroenterology* (2000) 119, 1473-1482; Schreiber y col., *Gastroenterology* (2000) 119, 1461-1472; Colombel y col., *Gut* (2001) 49, 42-46).

5 Asadullah y col. (*Pharmacology Reviews*, (2003), 55, 245-269) revisan el estado de la técnica de la terapia con interleucina-10 en varias enfermedades inflamatorias. Al revisar la enfermedad inflamatoria intestinal crónica, Asadullah y col. comunicaron que se realizaron varios ensayos clínicos multicéntricos de gran tamaño, que ensayaron dosis múltiples de IL-10 en pacientes con EC leve o moderada o resistentes a la terapia, así como en pacientes sometidos a resección ileal o ileocolónica curativa para evitar casos postoperatorios endoscópicos por administración sistémica (Fedorak y col., *Gastroenterology* (2000) 119, 1473-1482; Schreiber y col., *Gastroenterology* (2000) 119, 1461-1472; Colombel y col., *Gut* (2001) 49, 42-46). Los datos indican que la terapia con IL-10 es segura y se tolera bien. Sin embargo, el tratamiento con IL-10 no produjo tasas de remisión significativamente más altas ni mejoría clínica en comparación con el tratamiento con placebo.

En general, se encontró que los resultados clínicos eran insatisfactorios y Herfarth y Scholmerich, (*Gut* (2002) 50, 146-147), dieron diversas explicaciones sobre esta estrategia terapéutica decepcionante.

15 Por lo tanto, se necesitan tratamientos eficaces de diversos estados de EII.

Declaraciones de invención

La presente invención es como se indica en las reivindicaciones. Los presentes inventores han descubierto, de manera sorprendente, que un anticuerpo anti-EDA fusionado a IL-10, era capaz de (i) localizarse de manera selectiva en sitios de colon inflamado *in vivo* en ratones enfermos con EII y (ii) disminuir los niveles en suero de ciertas citocinas proinflamatorias en los ratones enfermos con EII, en particular interferón-gamma, IL-6 e IL-12p70.

La regulación negativa de las citocinas proinflamatorias a través de la administración de un anticuerpo anti-EDA fusionado a IL-10, fue particularmente sorprendente ya que Tilg y col. (*Gut* (2002), 50, 191-195) comunican que el tratamiento de pacientes con enfermedad de Crohn, con IL-10 humana recombinante, induce el interferón gamma. Shibata y col. (*J. Immunol.*, (1998) 161, 4283-4288) también comunican que la IL-10 mejora la producción de linfocitos citolíticos naturales (NK cell) de INF gamma pero inhibe la producción de macrófagos de factores inductores de IFN gamma.

Por lo tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un miembro de unión específico, una molécula de anticuerpo como se define en la reivindicación 1, que se une a la isoforma Extra Dominio-A (ED-A) de la fibronectina (A-FN) y se conjuga con IL-10 para su uso en el tratamiento de la EII. La divulgación también proporciona el uso de un miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma Extra Dominio-A (ED-A) de la fibronectina para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de la EII. La divulgación también proporciona un procedimiento para tratar la EII en un paciente, el procedimiento comprende administrar a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un medicamento que comprende un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina. Preferentemente, de acuerdo con la divulgación, el miembro de unión específico se une a la isoforma ED-A de la fibronectina humana.

El miembro de unión específico, una molécula de anticuerpo, para su uso en este primer aspecto de la invención, puede unirse al ED-A de la fibronectina.

Según la divulgación, el miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en este primer aspecto de la invención, puede conjugarse con una molécula que tenga actividad inmunosupresora o antiinflamatoria, una etiqueta detectable, un radioisótopo, o una molécula bioactiva, tal como una citocina, una hormona, un radioisótopo terapéutico, un fármaco citotóxico. El miembro de unión específico puede conjugarse con la molécula bioactiva mediante un enlazador escindible.

En una realización preferida de la invención, el miembro de unión específico, molécula de anticuerpo como se define en la reivindicación 1, se conjuga con una molécula que tiene actividad inmunosupresora o antiinflamatoria, tal como IL-10.

La EII, a la que se hace referencia en el presente documento, puede ser EII activa. En particular, la EII puede ser enfermedad de Crohn (EC), colitis ulcerosa (CU), colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet o colitis indeterminada. La EII puede ser EC o CU. La EII puede ser EC, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet o colitis indeterminada. En una realización, la EII no es CU. La EII puede ser una EII que no se limite habitualmente a inflamación en el colon y el recto, tal como EC. La EII puede ser una EII que no afecte solo a la mucosa del colon. Preferentemente, la EII es EC. Los términos EC, CU, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet y colitis indeterminada, como se usa en el presente documento, pueden referirse a EC activa, CU activa, colitis colagenosa activa, colitis linfocítica activa, colitis isquémica activa, colitis por desviación activa, enfermedad de Behçet activa y colitis indeterminada activa, respectivamente.

En un segundo aspecto, la invención proporciona un miembro de unión específico, una molécula de anticuerpo como

- se define en la reivindicación 1, que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina y se conjuga con la IL-10 para su uso en el suministro, al tejido con EII, de una molécula conjugada con el miembro de unión específico. La divulgación también proporciona el uso de un miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un medicamento para el suministro, al tejido con EII, de una molécula conjugada con el miembro de unión específico. La invención también proporciona un procedimiento para suministrar, en un ser humano o en un animal, una molécula a un tejido con EII, en el que la molécula está conjugada con un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para formar un conjugado y el procedimiento comprende administrar el conjugado al ser humano o al animal. Preferentemente, de acuerdo con la divulgación, el miembro de unión específico se une a la isoforma ED-A de la fibronectina humana.
- 5 El miembro de unión específico, una molécula de anticuerpo, para su uso en este segundo aspecto de la invención, puede unirse al ED-A de la fibronectina.
- El miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en esta divulgación, puede conjugarse con una etiqueta detectable, un radioisótopo, o una molécula bioactiva, tal como una citocina, una hormona, un radioisótopo terapéutico o un fármaco citotóxico. El miembro de unión específico puede conjugarse con la molécula bioactiva mediante un enlazador escindible.
- 15 De acuerdo con la invención, el miembro de unión específico, molécula de anticuerpo, se conjuga, preferentemente, con IL-10.
- La divulgación proporciona un miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un procedimiento de diagnóstico de la EII. La divulgación también proporciona el uso de un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un producto de diagnóstico para diagnosticar la EII. La divulgación también proporciona un procedimiento para detectar o diagnosticar la EII en un ser humano o animal, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 20 (a) administrar al ser humano o al animal un miembro de unión específico que se une al dominio ED-A de la fibronectina, y
(b) determinar la presencia o ausencia del miembro de unión específico en sitios de EII del cuerpo humano o animal,
- 25 en el que la localización del miembro de unión específico en el sitio de EII indica la presencia de EII.
- Preferentemente, el miembro de unión específico se une a la isoforma ED-A de la fibronectina humana.
- 30 El miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en esta divulgación, puede unirse al ED-A de la fibronectina.
- El miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en esta divulgación, puede conjugarse con una etiqueta detectable o con un radioisótopo.
- La divulgación proporciona además un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para su uso en un procedimiento de obtención de imágenes de tejido con EII. La divulgación también proporciona el uso de un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A de la fibronectina para la fabricación de un agente de formación de imágenes para la obtención de imágenes de tejido con EII. La divulgación también proporciona un procedimiento para detectar u obtener imágenes de tejido con EII en un ser humano o animal, en el que el procedimiento comprende las siguientes etapas:
- 35 (a) administrar al ser humano o al animal un miembro de unión específico que se une al dominio ED-A de la fibronectina, y
(b) detectar la unión del miembro de unión específico en el tejido con EII en el cuerpo humano o animal.
- Preferentemente, el miembro de unión específico se une a la isoforma ED-A de la fibronectina humana.
- 45 El miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en esta divulgación, puede unirse al ED-A de la fibronectina.
- El miembro de unión específico, por ejemplo, una molécula de anticuerpo, para su uso en esta divulgación, puede conjugarse con una etiqueta detectable o con un radioisótopo.
- En un aspecto adicional, la invención proporciona un conjugado que comprende un miembro de unión que se une a la isoforma ED-A, por ejemplo, el ED-A, de la fibronectina conjugado a IL-10, en el que el conjugado tiene la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13. En el presente documento este conjugado se denomina F8-IL10. Como los dominios VH y VL de este conjugado están unidos por medio de un enlazador de 5 aminoácidos (véase la Figura 1B), se espera que el conjugado forme homodímeros no covalentes en solución.
- 50 Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo que se une a la

isoforma ED-A de la fibronectina y/o al ED-A de fibronectina, en el que el anticuerpo comprende una o más regiones determinantes de complementariedad (CDR) del anticuerpo F8 descrito en el presente documento. Estas secuencias se proporcionan más adelante (véanse las SEQ ID NO: 1-6). En la Figura 1 también se muestran las secuencias de CDR del anticuerpo F8.

5 Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender una o más CDR como se describe en el presente documento, por ejemplo, una CDR3, y opcionalmente también una CDR1 y CDR2 para formar un conjunto de CDR.

Preferentemente, como se desvela, un miembro de unión específico para su uso en la invención comprende un conjunto de CDR H y/o L de anticuerpo del anticuerpo F8 descrito en el presente documento con diez o menos, por ejemplo una, dos, tres, cuatro o cinco, sustituciones de aminoácidos en el conjunto de CDR H y/o L desvelado.

Posiblemente, como se desvela, las sustituciones pueden hacerse en cualquier resto dentro del conjunto de CDR, y puede estar en la CDR1, CDR2 y/o CDR3.

15 Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender una molécula de anticuerpo, por ejemplo, una molécula de anticuerpo humano. El miembro de unión específico normalmente comprende un dominio VH y/o VL de anticuerpo. También se proporcionan dominios VH de miembros de unión específicos para su uso en la invención. En cada uno de los dominios VH y VL hay regiones determinantes de complementariedad, ("CDR") y regiones marco, ("FR"). Un dominio VH comprende un conjunto de HCDR, y un dominio VL comprende un conjunto de LCDR. Una molécula de anticuerpo puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende un VH de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región marco. De manera alternativa, o también, puede comprender un dominio VL de anticuerpo que comprende un VL de CDR1, CDR2 y CDR3 y una región marco. Todas las secuencias de VH y VL, las secuencias de CDR, los conjuntos de CDR y los conjuntos de HCDR y los conjuntos de LCDR desvelados en el presente documento representan realizaciones de un miembro de unión específico para su uso en la invención. Como se describe en el presente documento, un "conjunto de CDR" comprende CDR1, CDR2 y CDR3. Por tanto, un conjunto de HCDR se refiere a HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y un conjunto de LCDR se refiere a LCDR1, LCDR2 y LCDR3. A menos que se indique lo contrario, un "conjunto de CDR" incluye las HCDR y las LCDR.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender un dominio VH de anticuerpo que comprende regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y una región marco, en el que HCDR1 es la SEQ ID NO: 1, y en el que opcionalmente HCDR2 es la SEQ ID NO: 2 y/o HCDR3 es la SEQ ID NO: 3.

30 Típicamente, un dominio de VH se empareja con un dominio VL para proporcionar un sitio de unión a antígeno con el anticuerpo, aunque como se indica más adelante, para unirse a un antígeno solo puede utilizarse un dominio VH o VL. Por tanto, un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender además un dominio VL de anticuerpo que comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y una región marco, en el que LCDR1 es la SEQ ID NO: 4, y en el que opcionalmente LCDR2 es la SEQ ID NO: 5 y/o LCDR3 es la SEQ ID NO: 6.

35 Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender, preferentemente, una molécula de anticuerpo para el ED-A de fibronectina, en el que la molécula de anticuerpo comprende un dominio VH y un dominio VL, en el que el dominio VH comprende un marco y un conjunto de regiones determinantes de complementariedad HCDR1, HCDR2 y HCDR3 y en el que el dominio VL comprende las regiones determinantes de complementariedad LCDR1, LCDR2 y LCDR3 y un marco, y en el que
 40 HCDR1 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 1;
 HCDR2 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 2;
 HCDR3 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 3;
 LCDR1 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4;
 LCDR2 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5; y
 45 LCDR3 tiene secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 6.

Una o más CDR o un conjunto de CDR de un anticuerpo pueden injertarse en un marco (por ejemplo, un marco humano) para proporcionar una molécula de anticuerpo para su uso en la invención. Las regiones marco pueden comprender secuencias de segmentos de genes de la línea germinal humana. Por tanto, se puede integrar la línea germinal en la región marco, por lo cual uno o más restos dentro del marco se cambian para que coincidan los restos en la posición equivalente en el marco de la línea germinal humana más similar. Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede ser una molécula de anticuerpo aislada que tiene un dominio VH que comprende un conjunto de HCDR en un marco de la línea germinal humana, por ejemplo, DP47. Normalmente, el miembro de unión específico también tiene un dominio VL que comprende un conjunto de LCDR, por ejemplo, en un marco de la línea germinal humana. El marco de la línea germinal humana del dominio VL puede ser DPK22.

55 Un dominio VH para su uso en la invención puede tener preferentemente la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 7, que es el dominio VH del anticuerpo F8. Un dominio VL para su uso en la invención puede tener preferentemente la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 8, que es el dominio VL del anticuerpo F8 de tipo silvestre.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede ser o comprender un Fv monocatenario (scFv),

que comprende un dominio VH y un dominio VL unidos mediante un enlazador peptídico. El experto en la materia podrá seleccionar una longitud y secuencia de enlazador apropiadas, por ejemplo, de al menos 5 o de al menos 10 aminoácidos de longitud, hasta aproximadamente 15, hasta aproximadamente 20 o hasta aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. El enlazador puede tener la secuencia de aminoácidos GGSGG (SEQ ID NO: 9).

- 5 El miembro de unión específico puede ser un diacuerpo, que es un fragmento multivalente o multispecífico construido por fusión génica (WO94/13804; Holliger y col. (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448).

Preferentemente, el miembro de unión específico es un scFv que forma homodímeros no covalentes (estables) en solución. Por ejemplo, el anticuerpo F8 y el conjugado F8-IL10 descritos en el presente documento, comprenden un scFv que se espera que forme homodímeros no covalentes (estables) en solución.

- 10 Un Fv monocatenario (scFv) puede estar comprendido en una miniinmunoglobulina o inmunoproteína pequeña (SIP, del inglés *small immunoprotein*), por ejemplo, como se describe en (Li y col., (1997), Protein Engineering, 10: 731-736). Una SIP puede comprender una molécula de scFv fusionada con el dominio CH4 de la isoforma secretora de la IgE humana IgE-S2 (ϵ_{S2} -CH4; Batista y col., (1996), J. Exp. Med., 184: 2197-205) formando una molécula de anticuerpo de miniinmunoglobulina homodimérica.

- 15 Como alternativa, un miembro de unión específico para su uso en la invención puede comprender un sitio de unión a antígeno en una molécula no de anticuerpo, normalmente provista de una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de CDR en un armazón proteico no de anticuerpo. En alguna otra parte del presente documento se describen con más detalle miembros de unión específicos, incluyendo moléculas de anticuerpo y de no anticuerpo.

- 20 El miembro de unión específico para su uso en la presente invención puede ser una molécula de anticuerpo que comprende el dominio VH del anticuerpo F8 mostrado en la SEQ ID NO: 7 y/o el dominio VL del anticuerpo F8 mostrado en la SEQ ID NO: 8. El miembro de unión específico para su uso en la presente invención puede ser una molécula de anticuerpo que comprende la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 11. El miembro de unión específico conjugado con la IL-10 de la presente invención puede comprender la secuencia mostrada en la SEQ ID NO: 13.

- 25 Un miembro de unión específico para su uso en la presente invención también puede comprender una o más, por ejemplo, las seis CDR de los anticuerpos anti ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F1, B7, E8 o G9 o sus variantes o los dominios VH y/o VL de los anticuerpos anti ED-A H1, B2, C5, D5, E5, C8, F1, B7, E8 o G9 o sus variantes. En el documento WO2010/078950 se desvelan las secuencias de las CDR y las secuencias de los dominios VH y VL de estos anticuerpos.

- 30 Una variante adecuada para su uso en la presente invención comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo que comprende un dominio VH y un dominio VL del anticuerpo F8 descrito en el presente documento, en el que el resto de leucina (L) en la posición 5 del dominio VH mostrado como SEQ ID NO: 7 está sustituido con valina (V) y/o el resto de arginina (R) en la posición 18 del dominio VL mostrado como SEQ ID NO: 8 está sustituido con lisina (K).

Estos y otros aspectos de la invención se describen con más detalle a continuación.

Breve descripción de las figuras

- 35 La Figura 1A muestra la secuencia de aminoácidos de la cadena pesada (VH) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 7). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena pesada (SEQ ID NO: 1) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena pesada (SEQ ID NO: 2) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de cadena pesada (SEQ ID NO: 3) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra **en negrita y subrayada**. La Figura 1B muestra la
- 40 secuencia de aminoácidos de la secuencia enlazadora del anticuerpo F8 anti-ED-A entre los dominios VH y VL (SEQ ID NO: 9). La Figura 1C muestra las secuencias de aminoácidos de la cadena ligera (VL) del anticuerpo F8 anti-ED-A (SEQ ID NO: 8). La secuencia de aminoácidos de la CDR1 de cadena ligera (SEQ ID NO: 4) del anticuerpo F8 anti-ED-A está subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR2 de cadena ligera (SEQ ID NO: 5) del anticuerpo anti-ED-A F8 se muestra en cursiva y subrayada. La secuencia de aminoácidos de la CDR3 de
- 45 cadena ligera (SEQ ID NO: 6) del anticuerpo F8 anti-ED-A se muestra en **negrita y subrayada**. La Figura 1D muestra la secuencia de aminoácidos del enlazador entre el anticuerpo F8 y la IL-10 cuando el anticuerpo está conjugado con la IL-10. La Figura 1E muestra la secuencia de aminoácidos de la IL-10 humana.

- La Figura 2 muestra los resultados de una autorradiografía de colon de ratones con EII y sanos. Los colones se
- 50 extirparon y se expusieron durante 24 horas a una pantalla de fósforo de obtención de imágenes (Molecular Dynamics) y se tomaron imágenes un aparato Storm 860. Carril-1: colon extirpado del Grupo 0 (ratón sano) 6 horas después de la inyección; Carril-2: colon extirpado del Grupo 2 (ratón con EII) 6 horas después de la inyección; Carril-3: colon extirpado del Grupo 0 (ratón sano) 24 horas después de la inyección; Carril-4: colon extirpado del Grupo 2 (ratón con EII) 24 horas después de la inyección.

- La Figura 3 muestra la biodistribución de ¹²⁵I-F8-IL10 en ratones sanos o enfermos. Los gráficos muestran la
- 55 biodistribución de ¹²⁵I-F8-IL10 en ratones sanos y enfermos 6 horas después de la inyección (A), 24 horas después de la inyección (B) y 96 horas después de la inyección (C). A las 96 horas se observa una acumulación preferencial

de ¹²⁵I-F8-IL10 en el colon y en los ganglios linfáticos (G. L.) mesentéricos de los ratones enfermos en comparación con los ratones sanos. La secuencia del conjugado F8-IL10 utilizado en estos experimentos se muestra en la SEQ ID NO: 13.

5 La Figura 4 muestra los niveles de citocina en los ratones tratados con F8-IL10. El gráfico anterior representa los niveles de citocina en el suero de ratones sanos (agua), ratones enfermos que no recibieron tratamiento (DSS al 3 %), ratones enfermos que recibieron el anticuerpo F8 en formato de inmunoproteína pequeña (F8SIP), ratones enfermos que recibieron F8-IL10 (F8-IL10). Los niveles de citocina (expresados como pg de proteína por ml de suero) que se indican son: Interleucina 1 β , (IL1-b), Interleucina 12 (IL-12p70), Interferón γ (IFN γ) e interleucina 6 (IL6).

10 La Figura 5 muestra los niveles de citocina en los ratones tratados con F8-IL10. El gráfico anterior representa los niveles de citocina en el suero de ratones sanos (agua), ratones enfermos que no recibieron tratamiento (DSS al 3 %), ratones enfermos que recibieron el anticuerpo F8 en formato de inmunoproteína pequeña (F8SIP), ratones enfermos que recibieron F8-IL10 (F8-IL10). Los niveles de citocina (cuyos niveles se expresaron como pg de proteína por ml de suero) que se indican son: Quimiocina procedente de queratinocitos (KC), interleucina-10 (IL10) y factor de necrosis tumoral alfa (TNFa).

15 La Figura 6 muestra el análisis histoquímico de especímenes de tejido de colon de pacientes afectados por colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn explorados con el anticuerpo F8 en formato SIP y con el factor de Von Willebrand. El patrón de tinción observado con el anticuerpo F8 y con el factor de Von Willebrand muestra que, en pacientes afectados por colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn, el anticuerpo F8 tiñe los vasos sanguíneos recién formados pero no los vasos sanguíneos normales. (El factor de Von Willebrand se utiliza habitualmente como marcador de vasculatura normal).

20 La Figura 7 muestra el análisis histoquímico de especímenes de tejido de colon de pacientes afectados por colitis ulcerosa y enfermedad de Crohn (derecha) y de colones de pacientes no afectados (izquierda). El patrón de tinción observado con el anticuerpo F8 muestra que el anticuerpo F8 tiñe más intensamente los nuevos vasos sanguíneos que se forman en los colones enfermos.

TERMINOLOGÍA

Fibronectina

30 La fibronectina es un antígeno sometido a corte y empalme alternativo, y se conocen diversas isoformas de fibronectina, como se describe en alguna otra parte del presente documento. El Extra-Dominio-A (EDA o ED-A) también se conoce como ED, extra repetición A de tipo III (EIIIA) o EDI. La secuencia del ED-A humano ha sido publicada por Kornblihtt y col. (1984), Nucleic Acids Res. 12, 5853-5868 y por Paoella y col. (1988), Nucleic Acids Res. 16, 3545-3557. La secuencia del ED-A humano también está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1631-1720 (Fibronectina de tipo III 12; extra dominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de referencia P02751. La secuencia del ED-A de ratón está disponible en la base de datos SwissProt como los aminoácidos 1721-1810 (Fibronectina tipo III 13; extra dominio 2) de la secuencia de aminoácidos depositada con el número de referencia P11276.

35 La isoforma ED-A de fibronectina (A-FN) contiene el Extra Dominio-A (ED-A). La secuencia de la A-FN humana puede deducirse de la secuencia precursora de fibronectina humana correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de referencia P02751. La secuencia de la A-FN de ratón puede deducirse de la secuencia precursora de fibronectina de ratón correspondiente que está disponible en la base de datos SwissProt con el número de referencia P11276. La A-FN puede ser la isoforma ED-A humana de fibronectina. El ED-A puede ser el Extra Dominio-A de fibronectina humana.

40 ED-A es una secuencia de 90 aminoácidos que se inserta en la fibronectina (FN) mediante corte y empalme alternativo y se localiza entre el dominio 11 y el 12 de la FN (Borsi y col., 1987, J. Cell Biol., 104, 595-600). El ED-A está principalmente ausente en la forma plasmática de FN pero es abundante durante la embriogénesis, la remodelación tisular, la fibrosis, el trasplante cardíaco y el crecimiento de tumores sólidos.

Corte y empalme alternativo

45 El corte y empalme alternativo se refiere a la aparición de diferentes patrones de corte y empalme de un transcrito de ARN primario de ADN para producir diferentes ARNm. Tras la escisión de los intrones, la selección puede determinar cuáles son los exones que se cortan y empalman entre sí para formar el ARNm. El corte y empalme alternativo conduce a la producción de diferentes isoformas que contienen diferentes exones y/o diferentes números de exones. Por ejemplo, una isoforma puede comprender una secuencia de aminoácidos adicional correspondiente a uno o más exones, que puede comprender uno o más dominios.

Miembro de unión específico

55 Esta expresión describe un miembro de un par de moléculas que se unen específicamente entre sí. Los miembros de

un par de unión específico pueden obtenerse de manera natural o producirse total o parcialmente de manera sintética. Un miembro del par de moléculas tiene una zona, o una cavidad, en su superficie, que se une a, y es por lo tanto complementaria a, una organización espacial y polar particular del otro miembro del par de moléculas. Los ejemplos de tipos de pares de unión son antígeno-anticuerpo, biotina-avidina, hormona-receptor de hormona, receptor-ligando, enzima-sustrato. La presente invención está relacionada con reacciones de tipo antígeno-anticuerpo.

Un miembro de unión específico normalmente comprende una molécula que tiene un sitio de unión a antígeno. Por ejemplo, un miembro de unión específico puede ser una molécula de anticuerpo o una proteína no de anticuerpo que comprende un sitio de unión a antígeno. Un miembro de unión específico, como se denomina en el presente documento, es preferentemente una molécula de anticuerpo.

Se puede proporcionar un sitio de unión a antígeno configurando regiones determinantes de complementariedad (CDR) en armazones proteicos no de anticuerpo, tales como fibronectina o citocromo B, etc. (Haan y Maggos, (2004), BioCentury, 12 (5): A1-A6; Koide y col., (1998), Journal of Molecular Biology, 284: 1141-1151; Nygren y col., (1997), Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469), o distribuyendo aleatoriamente o mutando restos de aminoácido de un bucle en un armazón proteico para conferir especificidad de unión por una diana deseada. Nygren y col. (1997) (Current Opinion in Structural Biology, 7: 463-469), han revisado con detalle armazones para diseñar nuevos sitios de unión en proteínas. En el documento WO/0034784 se desvelan armazones proteicos de miméticos de anticuerpos, en el que los inventores describen proteínas (miméticos de anticuerpos) que incluyen un dominio de tipo III de fibronectina que tiene al menos un bucle distribuido al azar. Una estructura adecuada en la que insertar una o más CDR, por ejemplo, un conjunto de HCDR, se puede proporcionar mediante cualquier miembro de dominio de la superfamilia de genes de inmunoglobulina. La estructura puede ser una proteína humana o no humana. Una ventaja de un armazón proteico no de anticuerpo es que puede proporcionar un sitio de unión a antígeno en una molécula armazón que es más pequeña o más fácil de fabricar que al menos algunas moléculas de anticuerpo. El pequeño tamaño de un miembro de unión puede conferir propiedades fisiológicas útiles tales como una capacidad para introducirse en las células, para penetrar profundamente en tejidos o alcanzar dianas con otras estructuras, o para unirse a cavidades de proteínas del antígeno diana. El uso de sitios de unión a antígeno en armazones proteicos se revisa en Wess, 2004, en: BioCentury, The Bernstein Report on BioBusiness, 12(42), A1-A7. Lo normal son proteínas que tienen una cadena principal estable y uno o más bucles variables, en los que la secuencia de aminoácidos del bucle o bucles está mutada específicamente o al azar para crear un sitio de unión a antígeno que se une al antígeno diana. Dichas proteínas incluyen los dominios de unión a IgG de la proteína A de *S. aureus*, transferrina, tetranectina, fibronectina (por ejemplo, el décimo dominio de tipo III de la fibronectina) y lipocalinas. Otras estrategias incluyen "Microcuerpos" sintéticos (Selecore GmbH), que están basados en ciclótidos - proteínas pequeñas que tiene enlaces disulfuro intramoleculares.

Además de las secuencias de anticuerpo y/o de un sitio de unión a antígeno, un miembro de unión específico para su uso en la presente invención puede comprender otros aminoácidos, por ejemplo, que formen un péptido o polipéptido, tal como un dominio plegado, o para conferir a la molécula otra característica funcional además de la capacidad para unirse al antígeno. Los miembros de unión para su uso en la divulgación pueden llevar una etiqueta detectable, o pueden conjugarse con una toxina, con una molécula que ejerce un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio o con una porción o enzima de direccionamiento (por ejemplo, mediante un enlace o un enlazador de peptidilo). Preferentemente, de acuerdo con la invención, un miembro de unión para su uso en la invención se conjuga con interleucina-10.

Por ejemplo, un miembro de unión puede comprender un sitio catalítico (por ejemplo, en un dominio enzimático) así como un sitio de unión a antígeno, en el que el sitio de unión a antígeno se une al antígeno y por tanto dirige el sitio catalítico al antígeno. El sitio catalítico puede inhibir la función biológica del antígeno, por ejemplo, mediante escisión.

Aunque, como se ha señalado, las CDR las pueden llevar armazones que no son anticuerpos, la estructura para llevar una CDR o un conjunto de CDR será generalmente una secuencia de cadena pesada o ligera de anticuerpo o una parte sustancial del mismo en el que la CDR o el conjunto de CDR se localiza en una ubicación que se corresponde con la CDR o conjunto de CDR de los dominios variables VH y VL de anticuerpo de origen natural codificados por genes de inmunoglobulina reordenados. Las estructuras y ubicaciones de los dominios variables de inmunoglobulina pueden determinarse por referencia a Kabat y col. (1987) (Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª edición. US Department of Health and Human Services.) y sus actualizaciones, actualmente disponibles en internet (en immuno.bme.nwu.edu o buscando "Kabat" utilizando cualquier buscador).

Por región CDR o CDR, se entiende que se indican las regiones hipervariables de las cadenas pesada y ligera de la inmunoglobulina, según lo definido por Kabat y col. (1987) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 4ª edición, US Department of Health and Human Services (Kabat y col., (1991a), Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5ª edición, US Department of Health and Human Services, Public Service, NIH, Washington, y ediciones posteriores). Un anticuerpo contiene habitualmente 3 CDR de cadena pesada y 3 CDR de cadena ligera. El término CDR, o su plural, se utiliza en el presente documento para indicar, según el caso, una o varias de estas regiones, o incluso la totalidad, de estas regiones que contienen la mayoría de los restos de aminoácido responsables de la unión por afinidad del anticuerpo por el antígeno o el epítipo que lo reconoce.

Entre las seis secuencias CDR cortas, la tercera CDR de la cadena pesada (HCDR3) tiene una mayor variabilidad de tamaño (mayor diversidad, esencialmente debido a los mecanismos de reordenación de los genes que la originan).

Su longitud puede ser de tan solo 2 aminoácidos aunque el tamaño más largo conocido es de 26. Funcionalmente, la HCDR3 desempeña un papel en parte en la determinación de la especificidad del anticuerpo (Segal y col., (1974), PNAS, 71: 4298-4302; Amit y col., (1986), Science, 233: 747-753; Chothia y col., (1987), J. Mol. Biol., 196: 901-917; Chothia y col., (1989), Nature, 342: 877-883; Caton y col., (1990), J. Immunol., 144: 1965-1968; Sharon y col., (1990a), PNAS, 87: 4814-4817; Sharon y col., (1990b), J. Immunol., 144: 4863-4869; Kabat y col., (1991b), J. Immunol., 147: 1709-1719).

Molécula de anticuerpo

Esta expresión describe una inmunoglobulina natural o producida total o parcialmente de manera sintética. La expresión también se refiere a cualquier polipéptido o proteína que comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. En el presente documento debe entenderse que la invención no se refiere a los anticuerpos en forma natural, es decir, que no están en su entorno natural pero que se ha sido capaz de aislarlos u obtenerlos mediante purificación a partir de fuentes naturales, o bien se pueden obtener mediante recombinación genética o mediante síntesis química y que entonces pueden contener aminoácidos no naturales tal como se describirá más adelante. Los fragmentos de anticuerpo que comprenden un sitio de unión a antígeno incluyen, pero sin limitación, moléculas de anticuerpo tales como Fab, Fab', Fab'-SH, scFv, Fv, dAb, Fd; y diacuerpos.

Es posible tomar anticuerpos monoclonales y otros anticuerpos y usar técnicas de tecnología de ADN recombinante para producir otros anticuerpos o moléculas quiméricas que se unen al antígeno diana. Dichas técnicas pueden implicar introducir ADN codificante de la región variable de inmunoglobulina, o las CDR, de un anticuerpo, en las regiones constantes, o en las regiones constantes más las regiones marco, de una inmunoglobulina diferente. Véanse, por ejemplo, los documentos EP-A-184187, GB 2188638A o EP-A-239400, y una gran cantidad de referencias bibliográficas posteriores. Un hibridoma u otra célula productora de un anticuerpo se puede someter a mutación genética o a otros cambios, que pueden o no alterar la especificidad de unión de los anticuerpos producidos.

Dado que los anticuerpos pueden modificarse de diversas formas, la expresión "molécula de anticuerpo" debería interpretarse como que abarca cualquier miembro o sustancia de unión que tenga un sitio de unión a antígeno de anticuerpo con la especificidad y/o la unión a antígeno requeridas. Por tanto, esta expresión abarca fragmentos de anticuerpo y derivados, incluyendo cualquier polipéptido que comprenda un sitio de unión a antígeno de anticuerpo, tanto si es natural como si es total o parcialmente sintético. Las moléculas quiméricas que comprenden un sitio de unión a antígeno o similar, fusionado con otro polipéptido (por ejemplo, que proviene de otra especie o que pertenece a otra clase o subclase de anticuerpo) por lo tanto se incluyen. La clonación y expresión de anticuerpos quiméricos se describe en el documento EP-A-0120694 y en el documento EP-A-0125023 y en una gran cantidad de referencias posteriores.

Las técnicas adicionales disponibles en la materia de diseño de anticuerpo han hecho posible aislar anticuerpos humanos y humanizados. Por ejemplo, pueden crearse hibridomas humanos como describen Kontermann y Dubel (2001), S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545. La presentación en fagos, otra técnica establecida para generar miembros de unión, se ha descrito con detalle en muchas publicaciones, tales como el documento WO92/01047 (tratado adicionalmente a continuación) y las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160, US6521404 y Kontermann & Dubel (2001), S, *Antibody Engineering*, Springer-Verlag Nueva York, LLC; ISBN: 3540413545. Ratones transgénicos en los que los genes de anticuerpo de ratón están inactivados y funcionalmente reemplazados por genes de anticuerpo humano mientras se dejan intactos otros componentes del sistema inmunitario del ratón, pueden utilizarse para aislar anticuerpos humanos (Mendez y col., (1997), Nature Genet, 15 (2): 146-156).

Las moléculas de anticuerpo sintéticas pueden crearse expresando genes generados mediante oligonucleótidos sintetizados y ensamblados en vectores de expresión adecuados, por ejemplo, como describen Knappik y col. (2000) J. Mol. Biol. 296, 57-86 o Krebs y col. (2001) Journal of Immunological Methods, 254 67-84.

Se ha demostrado que los fragmentos de un anticuerpo completo pueden realizar la función de antígenos de unión. Son ejemplos de fragmentos de unión (i) el fragmento Fab que consiste en los dominios VL, VH, CL y CH1; (ii) el fragmento Fd que consiste en los dominios VH y CH1; (iii) el fragmento Fv que consiste en los dominios VL y VH de un solo anticuerpo; (iv) el fragmento dAb (Ward y col. (1989) Nature 341, 544-546; McCafferty y col., (1990) Nature, 348, 552-554; Holt y col. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490), que consiste en un dominio VH o VL; (v) regiones CDR aisladas; (vi) fragmentos F(ab')₂, un fragmento bivalente que comprende dos fragmentos Fab unidos (vii) moléculas de Fv monocatenario (scFv), en las que un dominio VH y un dominio VL se unen mediante un enlazador peptídico que permite que los dos dominios se asocien para formar un sitio de unión a antígeno (Bird y col. (1988) Science, 242, 423-426; Huston y col. (1988) PNAS USA, 85, 5879-5883); (viii) dímeros de Fv monocatenario biespecíficos (PCT/US92/09965) y (ix) "diacuerpos", fragmentos multivalentes o multiespecíficos construidos por fusión génica (documento WO94/13804; Holliger y col. (1993a), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 6444-6448). Las moléculas de Fv, scFv o diacuerpo pueden estabilizarse mediante la incorporación de puentes disulfuro que unen los dominios VH y VL (Reiter y col. (1996), Nature Biotech, 14, 1239-1245). También pueden crearse minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 (Hu y col. (1996), Cancer Res., 56 (13): 3055-61). Otros ejemplos de fragmentos de unión son Fab', que difiere de los fragmentos Fab por la adición de algunos restos en el extremo

carboxilo del dominio CH1 de cadena pesada, que incluye una o más cisteínas de la región bisagra del anticuerpo, y Fab'-SH, que es un fragmento Fab' en el que el resto (o restos) de cisteína de los dominios constantes llevan un grupo tiol libre.

5 Los fragmentos de anticuerpo para su uso en la invención se pueden obtener comenzando a partir de cualquiera de las moléculas de anticuerpo descritas en el presente documento, por ejemplo, moléculas de anticuerpo que comprenden los dominios VH y/o VL o las CDR de cualquiera de los anticuerpos descritos en el presente documento, mediante procedimientos tales como digestión con enzimas, tales como pepsina o papaína y/o mediante escisión de los puentes disulfuro con reducción química. De otra manera, los fragmentos de anticuerpo de la presente invención se pueden obtener mediante técnicas de recombinación genética igualmente bien conocidas por el experto en la materia o bien mediante síntesis de péptidos por medio de, por ejemplo, sintetizadores automáticos de péptidos, tales como los suministrados por la compañía Applied Biosystems, etc., o mediante síntesis y expresión de ácido nucleico.

Los fragmentos de anticuerpos funcionales de acuerdo con la presente invención incluyen cualquier fragmento funcional cuya semivida aumente debido a una modificación química, especialmente mediante PEGilación o mediante la incorporación en un liposoma.

15 Un dAb (anticuerpo de dominio) es un fragmento pequeño, monomérico de unión a antígeno de un anticuerpo, particularmente, la región variable de una cadena pesada o ligera de un anticuerpo (Holt y col. (2003) Trends in Biotechnology 21, 484-490). Los dAb de VH se dan de manera natural en camélidos (por ejemplo, camello, llama) y se pueden producir inmunizando a un camélido con un antígeno diana, aislando linfocitos B específicos de antígeno y clonando directamente los genes dAb a partir de linfocitos B individuales. Los dAb también son producibles en cultivo celular. Su pequeño tamaño, su buena solubilidad y su estabilidad a temperaturas, los hace particular y fisiológicamente útiles y adecuados para la selección y maduración por afinidad. Un miembro de unión de la presente invención puede ser un dAb que comprende un dominio VH o VL sustancialmente como se expone en el presente documento, o un dominio VH o VL que comprende un conjunto de CDR sustancialmente como se expone en el presente documento.

25 Como se usa en el presente documento, la frase "sustancialmente como se expone" se refiere a que la característica, o características, de las CDR relevantes del dominio VH o VL de los miembros de unión descritos en el presente documento, serán idénticas o sumamente similares a las de las regiones especificadas cuya secuencia se expone en el presente documento. Como se describe en el presente documento, la frase "sumamente similar", con respecto a una o más regiones especificadas de uno o más dominios variables, contempla que en la CDR y/o en el dominio VH o VL, puedan realizarse de 1 a aproximadamente 5, por ejemplo, de 1 a 4, incluyendo de 1 a 3, o 1 o 2 o 3 o 4, sustituciones de aminoácidos.

35 Los anticuerpos biespecíficos o bifuncionales forman una segunda generación de anticuerpos monoclonales en los que dos regiones variables diferentes se combinan en la misma molécula (Holliger y Bohlen 1999 Cancer and metastasis rev. 18: 411-419). Su uso se ha demostrado tanto en el campo de diagnóstico como en el campo de terapia debido a su capacidad para reclutar nuevas funciones efectoras o para dirigirse a varias moléculas en la superficie de células tumorales. Cuando se van a utilizar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que pueden fabricarse de varias maneras (Holliger y col. (1993b), Current Opinion Biotechnol 4, 446-449), por ejemplo, prepararse químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Estos anticuerpos pueden obtenerse por procedimientos químicos (Glennie y col., (1987) J. Immunol. 139, 2367-2375; Repp y col., (1995) J. Hemat. 377-382) o procedimientos somáticos (Staerz U. D. y Bevan M. J. (1986) PNAS 83; Suresh y col. (1986) Method. Enzymol. 121: 210-228), pero también mediante técnicas de ingeniería genética que permiten forzar la heterodimerización y, por lo tanto, facilitan el procedimiento de purificación del anticuerpo buscado (Merchand y col., 1998 Nature Biotech. 16: 677-681). Los ejemplos de anticuerpos biespecíficos incluyen los de tecnología BiTE™ en los que los dominios de unión de dos anticuerpos con diferente especificidad se pueden usar y unir directamente mediante péptidos cortos flexibles. Esto combina dos anticuerpos en una sola cadena polipeptídica corta. Los diacuerpos y el scFv pueden construirse sin una región Fc, utilizando tan solo dominios variables, que posiblemente reducen los efectos de una reacción antiidiotípica.

50 Los anticuerpos biespecíficos pueden construirse como una IgG entera, como un Fab'2 biespecífico, como un Fab'PEG, como diacuerpos o bien como scFv biespecíficos. Además, dos anticuerpos biespecíficos pueden unirse utilizando procedimientos habituales conocidos en la materia para formar anticuerpos tetravalentes.

A diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, los diacuerpos biespecíficos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos, tales como fragmentos de anticuerpo) de especificidades de unión apropiadas, pueden seleccionarse fácilmente utilizando presentación en fagos (documento WO94/13804) de fagotecas. Si un brazo del diacuerpo se mantiene constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra un anticuerpo diana, entonces se puede generar una biblioteca en la que el otro brazo varía y se selecciona un anticuerpo de especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos se pueden producir mediante procedimientos de ingeniería alternativos, como se describe en Ridgeway y col. (1996), Protein Eng., 9, 616-621.

En la materia están disponibles diversos procedimientos para obtener anticuerpos contra un antígeno diana. Los anticuerpos pueden ser anticuerpos monoclonales, especialmente de origen humano, murino, quimérico o humanizado, que se pueden obtener de acuerdo con los procedimientos convencionales bien conocidos por el experto en la materia.

- 5 En general, para la preparación de anticuerpos monoclonales o sus fragmentos funcionales, especialmente de origen murino, Es posible referirse a las técnicas que se describen en particular en el manual "Antibodies" (Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor N. Y., pág. 726, 1988) o a la técnica de preparación a partir de hibridomas descrita por Kohler y Milstein, 1975, Nature, 256: 495-497.

- 10 Los anticuerpos monoclonales se pueden obtener, por ejemplo, a partir de una célula animal inmunizada contra A-FN, o de uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A, o un fragmento peptídico de ED-A. La A-FN, o uno de sus fragmentos, puede producirse de manera específica de acuerdo con los procedimientos de trabajo habituales, por recombinación genética comenzando con una secuencia de ácido nucleico contenida en la secuencia de ADNc que codifica la A-FN, o un fragmento de la misma, por síntesis de péptidos comenzando a partir de una secuencia de aminoácidos comprendida en la secuencia peptídica de la A-FN y/o de un fragmento de la misma.

- 15 Los anticuerpos monoclonales pueden, por ejemplo, purificarse en una columna de afinidad en la que la A-FN, o uno de sus fragmentos que contiene el epítipo reconocido por dichos anticuerpos monoclonales, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A, o un fragmento peptídico de ED-A, se ha inmovilizado previamente. Los anticuerpos monoclonales se pueden purificar mediante cromatografía en proteína A y/o G, seguido o no por cromatografía de intercambio iónico enfocada a eliminar los contaminantes proteicos residuales así como el ADN y el LPS, en sí, seguido o no por cromatografía de exclusión en gel de sefarsa con el fin de eliminar los posibles agregados debido a la presencia de dímeros o de otros multímeros. El conjunto de estas técnicas pueden utilizarse de manera simultánea o sucesiva.

Sitio de unión a antígeno

- 25 Esta expresión describe la parte de una molécula que se une y que es complementaria a todo o a parte del antígeno diana. En una molécula de anticuerpo se refiere como el sitio de unión a antígeno de anticuerpo, y comprende la parte del anticuerpo que se une a y que es complementaria con todos o parte del antígeno diana. Cuando un antígeno es grande, un anticuerpo solo puede unirse a una parte particular del antígeno, cuya parte se denomina un epítipo. Un sitio de unión a antígeno se puede proporcionar mediante uno o más dominios variables del anticuerpo. Un sitio de unión a antígeno de anticuerpo puede comprender una región variable de cadena ligera (VL) y una región variable de cadena pesada (VH).

Aislado

- 35 Este término se refiere, en general, al estado en el cual estarán los miembros de unión específicos para su uso en la invención o el ácido nucleico que codifica dichos miembros de unión específicos, de acuerdo con la presente invención. Por tanto, los miembros de unión específicos, los dominios VH y/o VL de la presente invención, se pueden proporcionar aislados y/o purificados, por ejemplo, de su entorno natural, de forma sustancialmente pura u homogénea, o, en el caso de ácido nucleico, carente o sustancialmente carente de ácido nucleico de o genes de origen distinto al de la secuencia que codifica un polipéptido con la función requerida. Los miembros aislados y el ácido nucleico aislado carecerán o carecerán sustancialmente de material con el que se asocian de manera natural tal como otros polipéptidos o ácidos nucleicos con los que se encuentran en su entorno natural, o en el entorno en el que se preparan (por ejemplo, cultivo celular) cuando dicha preparación se realiza *in vitro* o *in vivo* mediante tecnología de ADN recombinante. Los miembros de unión y el ácido nucleico específicos pueden formularse con diluyentes o adyuvantes e incluso aislarse con fines prácticos - por ejemplo, los miembros se mezclarán normalmente con gelatina u otros transportadores si se utilizan para recubrir placas de microtitulación para su uso en inmunoensayos, o se mezclarán con transportadores o diluyentes farmacéuticamente aceptables cuando se utilizan en diagnóstico o terapia. Los miembros de unión específicos pueden estar glucosilados, de manera natural o mediante sistemas de células eucariotas heterólogas (por ejemplo, células CHO o NS0 (ECACC 85110503), o pueden estar (por ejemplo, si se producen por expresión en una célula procariota) no glucosilados.

- 50 En la invención también pueden utilizarse preparaciones heterogéneas que comprenden moléculas de anticuerpo. Por ejemplo, dichas preparaciones pueden ser mezclas de anticuerpos con cadenas pesadas de longitud completa y cadenas pesadas que carecen de lisina en el extremo C-terminal, con diversos grados de glucosilación y/o con aminoácidos derivados, tal como la ciclación de un ácido glutámico en el extremo N-terminal para formar un resto de ácido piroglutámico.

- 55 Uno o más miembros de unión específicos para un antígeno, por ejemplo, la A-FN, el ED-A de fibronectina, puede obtenerse poniendo en contacto una biblioteca de miembros de unión específicos de acuerdo con la invención y el antígeno o un fragmento del mismo, por ejemplo, un fragmento que comprende o que consiste en ED-A, o un fragmento peptídico de ED-A y seleccionando uno o más miembros de unión específicos de la biblioteca capaces de unirse al antígeno.

Una biblioteca de anticuerpos puede explorarse utilizando exploración iterativa de colonias en filtros (ICFS, por las siglas del inglés *Iterative Colony Filter Screening*). En la ICFS, las bacterias que contienen el ADN que codifica varias especificidades de unión, se cultivan en un medio líquido y, una vez que se ha alcanzado la fase de crecimiento exponencial, algunos miles de millones de ellas se distribuyen en un soporte de cultivo que consiste en un filtro de membrana previamente tratado adecuadamente que se incuba hasta que aparecen colonias bacterianas completamente confluentes. Un segundo sustrato trampa consiste en otro filtro de membrana, previamente humidificado y recubierto con el antígeno deseado.

Después, el filtro de membrana trampa se coloca en una placa que contiene un medio de cultivo adecuado y se recubre con el filtro de cultivo con la superficie recubierta con colonias bacterianas orientada hacia arriba. El sándwich así obtenido se incuba a temperatura ambiente durante aproximadamente 16 h. Por tanto, es posible obtener la expresión de los genes que codifican los fragmentos scFv de anticuerpo que tienen una acción de propagación, de manera que los fragmentos que se unen de manera específica con el antígeno que está presente en la membrana trampa quedan atrapados. Después, la membrana trampa se trata para destacar, con técnicas colorimétricas comúnmente utilizadas para esta finalidad, los fragmentos scFv de anticuerpo unidos.

La posición de las manchas con color en el filtro trampa permite volver a las colonias bacterianas correspondientes que están presentes en la membrana de cultivo y producir los fragmentos de anticuerpos atrapados. Dichas colonias se recogen y se cultivan y las bacterias, algunos millones de ellas, se distribuyen en una nueva membrana de cultivo repitiendo los procedimientos descritos anteriormente. Después, se realizan ciclos análogos hasta que las señales positivas en la membrana trampa se correspondan con colonias positivas únicas, cada una de las cuales representa una posible fuente de fragmentos de anticuerpo monoclonal dirigidos contra el antígeno utilizado en la selección. La ICFS se describe, por ejemplo, en el documento WO0246455.

Una biblioteca también puede presentarse en partículas o complejos moleculares, por ejemplo, en paquetes genéticos replicables, como partículas de bacteriófagos (por ejemplo, T7) u otros sistemas de presentación *in vitro*, conteniendo cada partícula o complejo molecular, ácido nucleico que codifica el dominio variable VH de anticuerpo presentado en él, y opcionalmente también un dominio VL presentado, en caso de estar presente. La presentación en fagos se describe en el documento WO92/01047 y, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos US5969108, US5565332, US5733743, US5858657, US5871907, US5872215, US5885793, US5962255, US6140471, US6172197, US6225447, US6291650, US6492160 y US6521404.

Después de la selección de los miembros de unión capaces de unirse al antígeno y de presentarse en bacteriófagos o en otras partículas o complejos moleculares de la biblioteca, el ácido nucleico puede extraerse de un bacteriófago o de otra partícula o complejo molecular que presente dicho miembro de unión seleccionado. Dicho ácido nucleico puede utilizarse en la producción posterior de un miembro de unión o de un dominio variable VH o VL de anticuerpo mediante la expresión de ácido nucleico con la secuencia de ácido nucleico extraída de un bacteriófago o de otra partícula o complejo molecular que exprese dicho miembro de unión seleccionado.

Un dominio variable VH de anticuerpo con la secuencia de aminoácidos de un dominio variable VH de anticuerpo de dicho miembro de unión seleccionado puede proporcionarse de forma aislada, como puede ser un miembro de unión que comprende dicho dominio VH.

Adicionalmente, puede ensayarse la capacidad para unirse a la A-FN o al ED-A de la fibronectina, o a otro antígeno o isoforma diana, por ejemplo, la capacidad para competir con el anticuerpo F8 anti-ED-A para unirse a la A-FN o a un fragmento de la A-FN, por ejemplo, al ED-A de fibronectina.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina específicamente. Un miembro de unión específico de la presente invención puede unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con la misma afinidad que el anticuerpo F8 anti-ED-A, por ejemplo, en formato scFv, o con una afinidad que sea mejor. Un miembro de unión específico para su uso en la divulgación puede unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con una K_D de 3×10^{-8} M o con una afinidad que sea mejor. Preferentemente, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación se une a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con una K_D de 2×10^{-8} M o con una afinidad que sea mejor. Más preferentemente, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación se une a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con una K_D de $1,7 \times 10^{-8}$ M o con una afinidad que sea mejor. Aún más preferentemente, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación se une a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con una K_D de $1,4 \times 10^{-8}$ M o con una afinidad que sea mejor. Más preferentemente, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación se une a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, con una K_D de 3×10^{-9} M o con una afinidad que sea mejor.

Un miembro de unión específico de la presente invención puede unirse al mismo epítipo en la A-FN y/o el ED-A del anticuerpo F8 anti-ED-A de fibronectina.

Un miembro de unión específico para su uso en la invención puede no mostrar ninguna unión significativa con moléculas distintas de la A-FN y/o del ED-A de fibronectina. En particular, el miembro de unión específico puede no unirse a otras isoformas de fibronectina, por ejemplo, a la isoforma ED-B y/o a la isoforma IIICS de fibronectina.

En la presente invención pueden producirse y utilizarse variantes de moléculas de anticuerpo desveladas en el

presente documento. Las técnicas necesarias para hacer sustituciones en las secuencias de aminoácidos de las CDR, en los dominios VH o VL de los anticuerpos, en particular, en las regiones marco de los dominios VH y VL, y en los miembros de unión, generalmente están disponibles en la técnica. Las secuencias de variantes pueden hacerse con sustituciones que pueden o no predecirse que tengan un efecto mínimo o beneficioso sobre la actividad, y su capacidad de unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina, y/o cualquier otra propiedad deseada, puede someterse a ensayo.

Como se ha comentado, pueden emplearse variantes de secuencias de aminoácidos de dominio variable de cualquiera de los dominios VH y VL cuyas secuencias se desvelan específicamente en el presente documento de acuerdo con la presente invención. Las variantes particulares pueden incluir una o más alteraciones (adición, delección, sustitución y/o inserción de un resto de aminoácido) en la secuencia de aminoácidos, que pueden ser de menos de aproximadamente 20 alteraciones, menos de aproximadamente 15 alteraciones, menos de aproximadamente 10 alteraciones o menos de aproximadamente 5 alteraciones, posiblemente 5, 4, 3, 2 o 1. Las alteraciones pueden hacerse en una o más regiones marco y/o en una o más CDR. Normalmente las alteraciones no producen pérdida de función, por tanto, un miembro de unión específico que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede conservar una capacidad de unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina. Por ejemplo, puede conservar la misma unión cuantitativa que un miembro de unión específico en el que no se realiza la alteración, por ejemplo, como se mide en un ensayo descrito en el presente documento. El miembro de unión específico que comprende una secuencia de aminoácidos así alterada puede tener una capacidad mejorada para unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina. Por ejemplo, un miembro de unión específico que se une a la isoforma ED-A o al ED-A de fibronectina, como se denomina en el presente documento, puede comprender el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 7 y el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 8 con 10 o menos, por ejemplo, 5, 4, 3, 2 o 1 sustitución de aminoácidos en la región marco del dominio VH y/o VL. Dicho miembro de unión específico puede unirse a la isoforma ED-A o al ED-A de fibronectina con la misma o sustancialmente la misma, afinidad que la de un miembro de unión específico que comprende el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 7 y el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 8 o puede unirse a la isoforma ED-A o al ED-A de fibronectina con una afinidad más alta que la de un miembro de unión específico que comprende el dominio VH mostrado en la SEQ ID NO: 7 y el dominio VL mostrado en la SEQ ID NO: 8.

Se pueden generar nuevas regiones VH o VL que llevan secuencias procedentes de CDR para su uso en la invención utilizando mutagénesis aleatoria de uno o más genes de VH y/o VL seleccionados para generar mutaciones dentro del dominio variable completo. En algunas realizaciones, se realizan una o dos sustituciones de aminoácidos dentro de un dominio variable completo o un conjunto de CDR. Otro procedimiento que puede utilizarse es dirigir la mutagénesis a regiones CDR de los genes de VH o VL.

Como se ha indicado anteriormente, una secuencia de aminoácidos de CDR, sustancialmente como se expone en el presente documento, se puede realizar como una CDR en un dominio variable de anticuerpo humano o en una parte sustancial del mismo. Las secuencias de HCDR3 sustancialmente como se expone en el presente documento, representan realizaciones de la presente invención y, por ejemplo, cada una de ellas se puede llevar como una HCDR3 en un dominio variable de cadena pesada humana o en una parte sustancial del mismo.

Los dominios variables empleados en la invención se pueden obtener o derivar de cualquier línea germinal o dominio variable humano reordenado, o puede ser un dominio variable sintético basado en consenso o en secuencias reales de dominios variables humanos conocidos. Un dominio variable puede proceder de un anticuerpo no humano. Una secuencia CDR para su uso en la invención (por ejemplo, CDR3) puede introducirse en un repertorio de dominios variables que carecen de una CDR (por ejemplo, CDR3), utilizando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, Marks y col. (1992) describen procedimientos para producir repertorios de dominios variables de anticuerpos en los que se utilizan cebadores de consenso que se dirigen a que están adyacentes al extremo 5' de la zona del dominio variable junto con cebadores de consenso para la tercera región marco de los genes VH humanos para proporcionar un repertorio de dominios variables VH que carecen de una CDR3. Marks y col. describen adicionalmente cómo este repertorio puede combinarse con una CDR3 de un anticuerpo particular. Utilizando técnicas similares, las secuencias derivadas de CDR3 de la presente invención pueden barajarse con repertorios de dominios VH o VL que carecen de una CDR3, y los dominios VH o VL completos barajados pueden combinarse con un dominio VL o VH afin para proporcionar miembros de unión para su uso en la invención. Después, el repertorio puede presentarse en un sistema de hospedador adecuado, tal como el sistema de presentación en fagos del documento WO92/01047, o de cualquiera de una gran cantidad de referencias bibliográficas posteriores, incluyendo Kay, Winter y McCafferty (1996), de manera que puedan seleccionarse miembros de unión adecuados. Un repertorio puede estar constituido por cualquiera de 10^4 miembros individuales en adelante, por ejemplo, al menos 10^5 , al menos 10^6 , al menos 10^7 , al menos 10^8 , al menos 10^9 o al menos 10^{10} miembros.

De manera similar, una o más, o las tres CDR, pueden injertarse en un repertorio de dominios VH o VL que después se exploran para detectar un miembro de unión o miembros de unión para la A-FN y/o el ED-A de fibronectina.

Puede emplearse una o más de la HCDR1, HCDR2 y HCDR3 del anticuerpo F8 o del conjunto de las HCDR del anticuerpo F8, y/o una o más de las LCDR1, LCDR2 y LCDR3 del anticuerpo F8 o del conjunto de las LCDR del anticuerpo F8.

De manera similar, pueden emplearse otros dominios VH y VL, conjuntos de las CDR y conjuntos de las HCDR y/o conjuntos de las LCDR desvelados en el presente documento.

La A-FN y/o el ED-A de fibronectina puede utilizarse en una exploración para detectar miembros de unión específicos, por ejemplo, moléculas de anticuerpo, para su uso en la preparación de un medicamento para el tratamiento de la EII. La exploración puede ser una exploración de un repertorio como se desvela en alguna otra parte del presente documento.

- 5 Una parte sustancial de un dominio variable de inmunoglobulina puede comprender al menos las tres regiones CDR, junto con sus regiones marco intermedias. La parte también puede incluir al menos aproximadamente el 50 % de cualquiera o ambas de la primera y cuarta regiones marco, siendo el 50 % el 50 % C-terminal de la primera región marco y el 50 % N-terminal de la cuarta región marco. Los restos adicionales en el extremo N-terminal o C-terminal de la parte sustancial del dominio variable pueden ser los normalmente no asociados a regiones de dominio variable de origen natural. Por ejemplo, la construcción de miembros de unión específicos de la presente invención realizada mediante técnicas de ADN recombinante puede dar como resultado la introducción de restos N o C-terminales codificados por enlaces introducidos para facilitar la clonación u otras etapas de manipulación. Otras etapas de manipulación incluyen la introducción de enlaces para unir los dominios variables desvelados en alguna otra parte del presente documento con secuencias de proteínas adicionales que incluyen regiones constantes del anticuerpo, otros dominios variables (por ejemplo en la producción de diacuerpos) o etiquetas detectables/funcionales como se desvela con más detalle en alguna otra parte del presente documento.

Aunque los miembros de unión específicos pueden comprender un par de dominios VH y VL, en la invención también pueden utilizarse dominios de unión sencillos basados en secuencias de dominio VH o VL. Se sabe que los dominios sencillos de inmunoglobulina, especialmente los dominios VH, son capaces de unirse a antígenos diana de una manera específica. Por ejemplo, véase lo comentado anteriormente sobre los dAb.

En el caso de cualquiera de los dominios de unión sencillos, estos dominios pueden utilizarse para explorar dominios complementarios capaces de formar un miembro de unión de dos dominios capaz de unirse a la A-FN y/o al ED-A de fibronectina. Esto se puede lograr mediante procedimientos de exploración de expresión en fago que usan el, así llamado, enfoque combinatorio doble jerárquico tal como se desvela en el documento WO92/01047, en el que una colonia individual que contiene bien un clon de cadena H o de L se usa para infectar una biblioteca completa de clones que codifican la otra cadena (L o H) y el miembro de unión de cadena doble resultante se selecciona de acuerdo con las técnicas de expresión en fago tales como las descritas en esa referencia. Esta técnica también se desvela en Marks 1992.

Los miembros de unión específicos para su uso en la presente invención pueden comprender además regiones constantes de anticuerpo o partes de las mismas, por ejemplo, regiones constantes de anticuerpos humanos o partes de las mismas. Por ejemplo, un dominio VL puede estar unido en su extremo C-terminal con dominios constantes de la cadena ligera del anticuerpo, incluidas las cadenas C κ o C λ humanas, por ejemplo, C λ . De manera similar, un miembro de unión específico basado en un dominio VH puede unirse en su extremo C-terminal a toda o a una parte (por ejemplo, un dominio CH1) de una cadena pesada de inmunoglobulina procedente de cualquier isotipo de anticuerpo, por ejemplo, IgG, IgA, IgE e IgM y cualquiera de las subclases de isotipos, particularmente IgG 1 e IgG4. Cualquier variante sintética u otra región constante que tenga estas propiedades y establezca regiones variables es también útil en las realizaciones de la presente invención.

Los miembros de unión específicos para su uso en la divulgación pueden etiquetarse con una etiqueta detectable o funcional. Una etiqueta puede ser cualquier molécula que produzca una señal o que pueda inducirse para que produzca una señal, incluyendo, pero sin limitación, fluorescentes, radioetiquetas, enzimas, quimioluminiscentes o fotosensibilizadores. Por tanto, la unión puede detectarse y/o medirse detectando fluorescencia o luminiscencia, radiactividad, actividad enzimática o absorbancia lumínica. Las etiquetas detectables pueden unirse a los anticuerpos para su uso en la divulgación utilizando química convencional conocida en la materia.

Existen numerosos procedimientos mediante los cuales la etiqueta puede producir una señal detectable por medios externos, por ejemplo, mediante examen visual, radiación electromagnética, calor y reactivos químicos. La etiqueta también puede unirse a otro miembro de unión específico, o a un soporte, que se une al anticuerpo para su uso en la divulgación.

Miembros de unión específicos etiquetados, por ejemplo, scFv etiquetado con una etiqueta detectable, pueden utilizarse para realizar diagnósticos *in vivo*, *ex vivo* o *in vitro* y/o para terapia.

50 Por ejemplo, los miembros de unión radioetiquetados (por ejemplo, miembros de unión conjugados con un radioisótopo) pueden utilizarse en radiodiagnóstico y radioterapia. Los radioisótopos que pueden conjugarse con un miembro de unión para su uso en la divulgación incluyen isótopos tales como ^{94m}Tc , ^{99m}Tc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{203}Pb , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{47}Sc , ^{111}In , ^{97}Ru , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{86}Y , ^{88}Y , ^{90}Y , ^{121}Sn , ^{161}Tb , ^{153}Sm , ^{166}Ho , ^{105}Rh , ^{177}Lu , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , ^{18}F , ^{211}At y ^{225}Ac . Preferentemente, emisores de positrones, tales como ^{18}F y ^{124}I , o emisores gamma, tales como ^{99m}Tc , ^{111}In y ^{123}I , se utilizan para aplicaciones de diagnóstico (por ejemplo, para PET), mientras que los emisores beta, tales como ^{131}I , ^{90}Y y ^{177}Lu , se utilizan preferentemente para aplicaciones terapéuticas. Los emisores alfa, tales como ^{211}At y ^{225}Ac también pueden utilizarse para terapia.

Por ejemplo, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación etiquetado con una etiqueta detectable

puede utilizarse para detectar, diagnosticar o controlar la EII en un ser humano o animal.

Un miembro de unión específico de la presente divulgación puede utilizarse para la fabricación de un producto de diagnóstico para su uso en el diagnóstico de EII.

5 En la presente invención puede utilizarse un conjugado o una fusión entre un miembro de unión para su uso en la invención y una molécula que, como se desvela, ejerce un efecto biocida, citotóxico, inmunosupresor o antiinflamatorio, de acuerdo con la invención, sobre las células diana en las lesiones y un anticuerpo dirigido contra un componente de la matriz extracelular que está presente en dichas lesiones. Por ejemplo, la molécula conjugada puede ser interleucina-10. Dichos conjugados pueden utilizarse de manera terapéutica, por ejemplo, para el tratamiento de la EII como se menciona en el presente documento.

10 La producción y el uso de fusiones o conjugados de miembros de unión específicos con moléculas biocidas o citotóxicas se describen, por ejemplo, en el documento WO01/62298.

15 El miembro de unión específico para su uso en la invención puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto antiinflamatorio sobre las células diana por interacción celular, una molécula antiinflamatoria, una citocina, por ejemplo, IL-10 y (ii) un miembro de unión específico para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina.

El miembro de unión específico para su uso en la invención, puede ser un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) un miembro de unión específico para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina.

20 El miembro de unión específico para su uso en la invención es preferentemente un conjugado de (i) interleucina-10 (IL10) y (ii) un miembro de unión específico para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de fibronectina. Dicho miembro de unión específico es útil en los aspectos de la invención desvelados en el presente documento en relación con el tratamiento de la EII.

25 En el presente documento también se describe un conjugado de (i) una molécula que ejerce un efecto biocida o citotóxico en las células diana por interacción celular, o un efecto inmunosupresor o antiinflamatorio y (ii) un miembro de unión para la isoforma ED-A de fibronectina y/o el ED-A de la fibronectina. Dicho conjugado comprende preferentemente una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y dicho miembro de unión, o, cuando el miembro de unión es bicatenario o multicatenario, una proteína de fusión que comprende la molécula biocida, citotóxica, inmunosupresora o antiinflamatoria y un componente de cadena polipeptídica de dicho miembro de unión. Preferentemente, el miembro de unión es un polipéptido monocatenario, por ejemplo, una molécula de anticuerpo monocatenario, tal como scFv.

30

Un conjugado, como se denomina en el presente documento, puede expresarse como una proteína de fusión. Por tanto, en la invención puede utilizarse una proteína de fusión que comprende la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria y una molécula de anticuerpo Fv monocatenario.

35 La molécula inmunosupresora o antiinflamatoria que ejerce su efecto en células diana mediante interacción celular, puede interaccionar directamente con las células diana, puede interaccionar con un receptor de unión a membrana en la célula diana o alterar el potencial electroquímico de la membrana celular. Preferentemente, la molécula es IL-10.

Preferentemente, la molécula que está conjugada con el miembro de unión específico es IL-10.

40 Tal como se trata adicionalmente a continuación, el miembro de unión específico para su uso en la invención es preferentemente una molécula de anticuerpo o comprende un sitio de unión a antígeno de anticuerpo. Convenientemente, el miembro de unión específico puede ser un polipéptido monocatenario, tal como un anticuerpo monocatenario. Esto permite la producción conveniente de una proteína de fusión que comprende un anticuerpo monocatenario y, por ejemplo, una molécula inmunosupresora o antiinflamatoria (por ejemplo, interleucina-10 o TGF beta). Se puede proporcionar un sitio de unión a antígeno de anticuerpo mediante la asociación de un dominio VH de anticuerpo y un dominio VL de anticuerpo en polipéptidos distintos, por ejemplo, en un anticuerpo completo o en un fragmento de anticuerpo tal como Fab o diacuerpo. Cuando el miembro de unión específico es una molécula bicatenaria o multicatenaria (por ejemplo, Fab o anticuerpo completo, respectivamente), una molécula inmunosupresora o antiinflamatoria, por ejemplo, puede conjugarse como un polipéptido de fusión con una o más cadenas polipeptídicas en el miembro de unión específico.

45

50 El miembro de unión específico puede conjugarse con la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria mediante un enlace peptídico, es decir, dentro de un polipéptido de fusión que comprende dicha molécula y el miembro de unión específico o un componente de su cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, Trachsel y col.). Otros medios de conjugación incluyen la conjugación química, especialmente reticulación utilizando un reactivo bifuncional (por ejemplo, empleando DOUBLE-REAGENTS™ Cross-linking Reagents Selection Guide, Pierce).

55 También se proporciona, como se desvela, un ácido nucleico aislado que codifica un miembro de unión específico para su uso en la presente invención. El ácido nucleico puede incluir ADN y/o ARN. Un ácido nucleico puede codificar

una CDR o un conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno de anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG, por ejemplo, IgG1, como se define anteriormente. Las secuencias de nucleótidos pueden codificar los dominios VH y/o VL desvelados en el presente documento.

5 En el presente documento se describen adicionalmente construcciones en forma de plásmidos, vectores, casetes de transcripción o de expresión que comprenden al menos un polinucleótido tal como se describe anteriormente.

También se proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende una o más construcciones como las anteriores. Se describe un ácido nucleico que codifica cualquier CDR o conjunto de CDR o dominio VH o dominio VL o sitio de unión a antígeno del anticuerpo o molécula de anticuerpo, por ejemplo, scFv o IgG 1 o IgG4 como se proporciona, como también un procedimiento de producción del producto codificado, cuyo procedimiento comprende la expresión a partir del ácido nucleico codificante. La expresión se puede lograr de manera conveniente cultivando en condiciones apropiadas las células hospedadoras que contienen el ácido nucleico. Después de la producción por expresión, un dominio VH o VL, o un miembro de unión específico puede aislarse y/o purificarse utilizando cualquier técnica adecuada, y después utilizarse según sea apropiado.

15 Un ácido nucleico puede comprender ADN o ARN y puede ser total o parcialmente sintético. La referencia a una secuencia de nucleótidos como se expone en el presente documento, abarca una molécula de ADN con la secuencia especificada, y abarca una molécula de ARN con la secuencia especificada en la que la U se sustituye por T, salvo que el contexto requiera otra cosa.

También se describe un procedimiento de producción de un dominio variable VH de anticuerpo, incluyendo el procedimiento causar la expresión de la expresión del ácido nucleico codificante. Dicho procedimiento puede comprender cultivar células hospedadoras en condiciones para la producción de dicho dominio variable VH de anticuerpo.

Un procedimiento de producción puede comprender una etapa de aislamiento y/o purificación del producto. Un procedimiento de producción puede comprender formular el producto en una composición que incluya al menos un componente adicional, tal como un excipiente farmacéuticamente aceptable.

25 Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una variedad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, células vegetales, hongos filamentosos, levaduras y sistemas de baculovirus y plantas y animales transgénicos. La expresión de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos en células procariotas está bien establecida en la materia. Para una revisión, véase, por ejemplo, Pluckthun (1991), *Bio/Technology* 9: 545-551. Un hospedador bacteriano común es *E. coli*.

30 La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la técnica como una opción para la producción de un miembro de unión específico, por ejemplo, Chadd y col. (2001), *Current Opinion in Biotechnology* 12: 188-194; Andersen y col. (2002) *Current Opinion in Biotechnology* 13: 117; Larrick y Thomas (2001) *Current Opinion in Biotechnology* 12: 411-418. Las líneas celulares de mamífero disponibles en la materia para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células renales de cría de hámster, células NS0 de melanoma de ratón, células YB2/0 de mieloma de rata, células renales de embrión humano, células retinianas de embrión humano y muchas otras.

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras apropiadas, incluyendo secuencias promotoras, secuencias de terminación, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según corresponda. Los vectores pueden ser plásmidos, por ejemplo, fagémidos, o vectores víricos, por ejemplo, fagos, según sea apropiado. Para más detalles, véase, por ejemplo, Sambrook y Russell (2001) *Molecular Cloning: a Laboratory Manual*: 3ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo, en la preparación de construcciones de ácido nucleico, mutagénesis, secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica y análisis de proteínas, se describen con detalle en Ausubel y col. (1999) 4ª ed., *Short Protocols in Molecular Biology: A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley y Sons.

Una célula hospedadora puede contener un ácido nucleico tal como se describe en el presente documento. Dicha célula hospedadora puede estar *in vitro* y puede estar en cultivo. Dicha célula hospedadora puede estar *in vivo*. La presencia *in vivo* de la célula hospedadora puede permitir la expresión intracelular de un miembro de unión para su uso en la presente invención como "intracuerpos" o anticuerpos intracelulares. Los intracuerpos pueden utilizarse en terapia génica.

También se desvela un procedimiento que comprende la introducción de un ácido nucleico desvelado en el presente documento en una célula hospedadora. La introducción puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato cálcico, DEAE-Dextrano, electroporación, transfección mediada con liposomas y transducción utilizando retrovirus u otros virus, por ejemplo, virus variolovacunal o, para las células de insecto, baculovirus. La introducción de ácido nucleico en la célula hospedadora, en particular, una célula eucariota, puede utilizar un sistema basado en virus o en plásmidos. El sistema basado en plásmidos puede mantenerse a modo de episoma o puede incorporarse en la célula hospedadora o en un cromosoma artificial. La incorporación puede ser mediante aleatorización o mediante integración dirigida de una o más copias de un solo locus

o de múltiples locus. Para células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección utilizando bacteriófagos.

5 Después de la introducción puede causarse o permitirse la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando las células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen. La purificación del producto expresado se puede lograr mediante procedimientos conocidos por el experto en la materia.

El ácido nucleico se puede integrar en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede promoverse mediante la inclusión secuencias que promuevan la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas estándar.

10 También se describe un procedimiento que comprende el uso de una construcción, como se ha expuesto anteriormente, en un sistema de expresión para expresar un miembro de unión específico o polipéptido como se expuso anteriormente.

Los miembros de unión específicos para su uso en la presente invención están diseñados para utilizarse en procedimientos de diagnóstico o tratamiento en sujetos humanos o animales, por ejemplo, en seres humanos. Los miembros de unión específicos para su uso en la invención pueden utilizarse en el diagnóstico o tratamiento de la EII.

15 En consecuencia, la divulgación proporciona procedimientos de tratamiento que comprenden la administración de un miembro de unión específico como se describe, composiciones farmacéuticas que comprenden dicho miembro de unión específico, y el uso de dicho miembro de unión específico en la fabricación de un medicamento para su administración, por ejemplo, en un procedimiento de preparación de un medicamento o composición farmacéutica que comprende formular el miembro de unión específico con un excipiente farmacéuticamente aceptable. Los vehículos farmacéuticamente aceptables son bien conocidos y el experto en la materia los adaptará en función de la naturaleza y del modo de administración del(los) compuesto(s) activo(s) elegido(s).

20

25 Los miembros de unión específicos para su uso en la presente invención se administrarán generalmente en forma de una composición farmacéutica, que puede comprender al menos un componente además del miembro de unión específico. Por tanto, las composiciones farmacéuticas descritas en el presente documento, y para su uso de acuerdo con la presente invención, pueden comprender, además del principio activo, un excipiente, transportador, tampón, estabilizante u otros materiales farmacéuticamente aceptables bien conocidos para los expertos en la materia. Dichos materiales no deberían ser tóxicos y no deberían interferir con la eficacia del principio activo. La naturaleza exacta del transportador u otro material dependerán de la vía de administración, que puede ser oral, inhalada o mediante inyección, por ejemplo, intravenosa.

30 Las composiciones farmacéuticas para administración oral tales como, por ejemplo, nanocuerpos, etc., también se contemplan en la presente invención. Dichas formulaciones orales pueden estar en forma de comprimidos, cápsulas, polvos, líquidos o semisólidos. Un comprimido puede comprender un transportador sólido tal como gelatina o un adyuvante. Las composiciones farmacéuticas líquidas generalmente comprenden un transportador líquido tal como agua, petróleo, aceites animales o vegetales, aceites minerales o aceites sintéticos. Puede incluirse solución salina fisiológica, dextrosa u otra solución sacarídica o glicoles tales como etilenglicol, propilenglicol o polietilenglicol.

35

40 Para la inyección intravenosa o la inyección en el lugar de la afección, el principio activo estará en forma de una solución acuosa parenteralmente aceptable que carece de pirógenos y que tiene un pH, una isotonicidad y una estabilidad adecuados. Los expertos en la materia pueden preparar soluciones adecuadas utilizando, por ejemplo, vehículos isotónicos tales como inyección de cloruro de sodio, inyección de Ringer, inyección de Ringer lactada. Pueden emplearse conservantes, estabilizantes, tampones, antioxidantes y/u otros aditivos, según se requiera. Los expertos en la materia conocen muchos procedimientos para la preparación de formulaciones farmacéuticas. Véase, por ejemplo, Robinson ed., Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, 1978.

45 Se puede administrar una composición sola o en combinación con otros tratamientos, de manera simultánea o secuencial o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, dependiendo de la afección a tratar.

50 Un miembro de unión específico para su uso en la presente divulgación puede utilizarse como parte de una terapia de combinación junto con un componente medicinal adicional. Para proporcionar efectos sinérgicos significativos, pueden utilizarse tratamientos de combinación, particularmente la combinación de un miembro de unión específico para su uso en la presente divulgación con uno o más fármacos diferentes. Un miembro de unión específico para su uso en la presente divulgación puede administrarse simultánea o secuencialmente o como una preparación combinada con otro agente o agentes terapéuticos, para el tratamiento de una o más de las afecciones enumeradas en el presente documento.

55 Por ejemplo, un miembro de unión específico para su uso en la divulgación puede utilizarse en combinación con un agente terapéutico existente para el tratamiento de la EII.

En la fabricación de un medicamento puede utilizarse un miembro de unión específico para su uso en la divulgación y

uno o más de los componentes medicinales adicionales anteriores. El medicamento puede ser para la administración individual o combinada a un individuo, y en consecuencia puede comprender el miembro de unión específico y el componente adicional como una preparación combinada o como preparaciones individuales. Las preparaciones separadas se pueden usar para facilitar la administración separada y secuencial o simultánea, y permitir la administración de los componentes mediante diferentes vías, por ejemplo, administración oral y parenteral.

De acuerdo con la presente divulgación, las composiciones proporcionadas pueden administrarse a mamíferos. La administración puede ser en una "cantidad terapéuticamente eficaz", siendo ésta suficiente para presentar beneficios a un paciente. Dichos beneficios pueden ser mejorar al menos un síntoma. Por tanto, un "tratamiento de la EII" se refiere a la mejora de al menos un síntoma. La cantidad real administrada y la tasa y evolución de la administración, dependerán de la naturaleza y gravedad de lo que se esté tratando, del mamífero particular que se esté tratando, de la afección clínica del paciente individual, de la causa del trastorno, del lugar de la administración de la composición, del tipo de miembro de unión específico, del procedimiento de administración, de la pauta de administración y de otros factores conocidos por los facultativos médicos. La prescripción del tratamiento, por ejemplo, las decisiones sobre la dosificación, etc., está bajo la responsabilidad de los facultativos generalistas y de otros médicos y puede depender de la gravedad de los síntomas y/o de la progresión de una enfermedad que se esté tratando. Las dosis apropiadas de anticuerpo son bien conocidas en la técnica (Ledermann y col. (1991) *Int. J. Cancer* 47: 659-664; y Bagshawe y col. (1991) *Antibody, Immunoconjugates and Radiopharmaceuticals* 4: 915-922). Pueden utilizarse dosis específicas indicadas en el presente documento, o en la *Physician's Desk Reference* (2003) según corresponda, para el tipo de medicamento que se vaya a administrar. Una cantidad terapéuticamente eficaz o una dosis adecuada de un miembro de unión específico para su uso en la invención puede determinarse comparando su actividad *in vitro* y la actividad *in vivo* en un modelo animal. Se conocen procedimientos de extrapolación de dosificaciones eficaces en ratones y otros animales de ensayo a seres humanos. La dosis exacta dependerá de diversos factores, que incluyen si el anticuerpo es para el diagnóstico, para la prevención o para el tratamiento, el tamaño y la localización de la zona que se va a tratar, la naturaleza exacta del anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo completo, fragmento o diacuerpo) y la naturaleza de cualquier etiqueta detectable u otra molécula unida al anticuerpo. Una dosis típica de anticuerpo estará en el intervalo de 100 µg a 1 g para aplicaciones sistémicas, y de 1 µg a 1 mg para aplicaciones tópicas. Puede administrarse una dosis de carga inicial más alta, seguida de una o más dosis más bajas. Un anticuerpo puede ser un anticuerpo completo, por ejemplo, del isotipo IgG1 o IgG4. Esta es una dosis para un solo tratamiento de un paciente adulto, que puede ajustarse de manera proporcional para niños y lactantes, y también para otros formatos de anticuerpo en proporción al peso molecular. Los tratamientos pueden repetirse a diario, dos veces a la semana, a intervalos semanales o mensuales, según el criterio del médico. Los tratamientos pueden ser cada dos a cuatro semanas para la administración subcutánea y cada cuatro a ocho semanas para la administración intravenosa. En algunas realizaciones de la presente divulgación, el tratamiento es periódico, y el período entre las administraciones es de aproximadamente dos semanas o más, por ejemplo aproximadamente dos semanas o más, aproximadamente cuatro semanas o más, o aproximadamente una vez al mes. En otras realizaciones de la divulgación, el tratamiento puede darse antes y/o después de cirugía y puede administrarse o aplicarse directamente en el lugar anatómico del tratamiento quirúrgico.

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La enfermedad inflamatoria intestinal es un grupo de afecciones inflamatorias que afectan al colon y al intestino delgado. Los principales tipos de EII son la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis ulcerosa (CU), mientras que otros tipos de EII incluyen colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, Enfermedad de Behçet y colitis indeterminada. La EC puede afectar cualquier parte del tubo digestivo, mientras que habitualmente la CU se limita al colon y al recto.

La EII, como se denomina en el presente documento, puede ser EC, CU, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet o colitis indeterminada. En particular, los términos EC, CU, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet y colitis indeterminada, como se usa en el presente documento, pueden referirse a EC activa, CU activa, colitis colagenosa activa, colitis linfocítica activa, colitis isquémica activa, colitis por desviación activa, enfermedad de Behçet activa y colitis indeterminada activa, respectivamente. En una realización, la EII puede ser EC o CU. En otra realización, la EII puede ser EC, colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet o colitis indeterminada. En una realización adicional, la EII no es CU. La EII puede ser una EII que no se limite habitualmente a inflamación en el colon y el recto, tal como EC. La EII puede ser una EII que no afecte solo a la mucosa del colon. En una realización preferida, la EII es EC. Más preferentemente, la EII es EC activa.

Cuando en el presente documento se utilice la expresión "y/o" esta debe entenderse como una divulgación específica de cada una de las dos características o componentes especificados con o sin el otro. Por ejemplo, "A y/o B" debe entenderse como una divulgación específica de cada uno de (i) A, (ii) B y (iii) A y B, como si cada uno se expusiera individualmente en el presente documento.

A menos que el contexto indique lo contrario, las descripciones y definiciones de las características expuestas anteriormente no se limitan a ningún aspecto o realización particular de la invención y se aplican por igual a todos los aspectos y realizaciones que se describen.

Ciertos aspectos y realizaciones de la invención se ilustrarán ahora como ejemplo y con referencia a las figuras descritas anteriormente.

SECCIÓN EXPERIMENTAL

MATERIALES Y PROCEDIMIENTOS

5 *Modelo de ratón de EII*

En la técnica se conocen modelos de ratón para la EII que implican la administración de DSS. También se describe un modelo de ratón adecuado, por ejemplo, en Okayasu y col. (1990), *Gastroenterology*, 98, 694-702.

Para los experimentos descritos en el presente documento, se indujo colitis en ratones C57BL/6 (Jackson Laboratories, Bar Harbor, ME) incluyendo en agua potable, durante 7 días, dextrano sulfato de sodio (DSS) al 3 % (MP BioMedicals), seguido de 3-5 días con agua potable normal. Los ratones de control recibieron agua estándar durante todo el estudio. Los ratones se monitorizaron para determinar la inducción/progresión de la enfermedad, como lo demuestra el hemocultivo los días 3-5, así como el cambio diario de peso. Los ratones se sometieron a eutanasia en varios momentos 3-5 días después suspender el DSS en el agua para evaluar el direccionamiento, la localización y los efectos farmacológicos de F8-IL-10

15 *Radioyodación con ¹²⁵I-F8/IL10, purificación, caracterización y preparación de la solución de dosificación*

Se preparó ¹²⁵I-F8/IL10 utilizando succinimidil-yodobenzoato (SIB) (Zalutsky & Narula (1988) *Cancer Research*, 48, 1446-1450; Zalutsky y Narula (1987) *Appl. Radiat. Isot.* 38, 1051-1055; Cheng, y col. (2002) *J. Med. Chem.* 45, 3048-3056). En resumen, una alícuota de yodo 125 (20 µl ~2,0 mCi) (Perkin Elmer, Waltham, MA) se hizo reaccionar con 2,5 µg de N-succinimidil-3-(tri-n-butilestannil) benzoato (C₂₃H₃₅NO₄Sn; PW = 508,23, sintetizado por Texas Biochemicals, Inc. College Station, TX) junto con 10 µg de NCS (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) como oxidante en 50 µl de metanol que contenía ácido acético al 1,5 % (v: v) (ambos de Sigma-Aldrich). Después de 15 minutos de incubación a temperatura ambiente, el oxidante restante en la solución de reacción se desactivó añadiendo 10 µg de bisulfato de sodio (agente reductor) (Sigma-Aldrich) e incubando a temperatura ambiente durante 5 minutos más. El SIB etiquetado con ¹²⁵I se conjugó con el anticuerpo F8-IL10 (~ 0,2 mg, con una relación molar de partida de aproximadamente 2,5: 1 de producto intermedio con respecto a anticuerpo) incubando a temperatura ambiente durante 20 minutos a un pH de 8,0. El producto radioetiquetado (¹²⁵I-F8/IL10) se purificó utilizando una columna PD-10 previamente equilibrada (GE Healthcare, Little Chalfont, Buckinghamshire, RU) (los posibles sitios de unión a proteínas no específicas en la columna se saturaron utilizando seroalbúmina bovina, seguido de aclarado de la columna con al menos tres volúmenes de columna de PBS), eluida en PBS. Se obtuvo un rendimiento radioquímico de aproximadamente 30 %.

La pureza radioquímica (PRQ) y la bioactividad de ¹²⁵I-F8/IL10 se caracterizaron mediante cromatografía por exclusión de tamaño (SEC, *size exclusion chromatogram*) y columna de afinidad de EDA, respectivamente. Para el análisis por SEC, se inyectó aproximadamente 1 µCi de solución de producto ¹²⁵I-F8/IL10 en la HPLC (Agilent 1100, equipado con un detector radioactivo en línea) equipado con una columna de exclusión de tamaño (G3000SWxl, TOSOH Biosciences, Tokio, Japón) y se eluyó con un caudal de 1 ml por minuto con un disolvente móvil de tampón fosfato 25 mM, NaCl 0,15 M, pH 6,8. La identidad de ¹²⁵I-F8/IL10 se confirmó comparando su tiempo de retención en el cromatograma radiométrico con el de F8/IL10 de referencia en el cromatograma de UV (280 nm). Se obtuvo una PRQ mayor de 99 % para ¹²⁵I-F8/IL10, con una actividad radioactiva específica de aproximadamente 4,5 mCi/mg.

La bioactividad de ¹²⁵I-F8-IL10 se determinó mediante un ensayo de columna de afinidad de EDA. En resumen, una alícuota (aproximadamente 1 pCi) de ¹²⁵I-F8/IL10 se cargó en una columna de afinidad de EDA previamente equilibrada (que contenía 250 µl de resina EDA, el equilibrio previo se realizó bloqueando los sitios de unión no específicos con 2 ml de BSA, 2 mg/ml en PBS, y después lavando la columna con 8 ml de PBS). La columna de afinidad se lavó con 6 ml de BSA (2 mg/ml en PBS) y el eluido se recogió fraccionadamente. La radioactividad en el eluido recogido y que permanece en la columna de afinidad se midió en un contador gamma. Se calculó el porcentaje de radioactividad retenida en la columna de resina de EDA de entre la radioactividad cargada total. Se obtuvo un porcentaje de 64 % de radioactividad retenida en la columna de afinidad para ¹²⁵I-F8/IL10.

Las soluciones de dosificación utilizadas para los estudios FC (farmacocinéticos) y de distribución tisular se prepararon mezclando ¹²⁵I-F8/IL10 con F8/IL10 no etiquetado (solución madre de F8/IL10), y un tampón de formulación a la concentración final requerida. La solución del artículo de ensayo se preparó el día de la dosificación y se llevó a temperatura ambiente antes de su administración a los animales.

50 *Biodistribución y localización de ¹²⁵I-F8/IL10 en el colon en un modelo de ratón con EII*

Los ratones no tratados o tratados con DSS se trataron con yoduro de potasio (KI) acuoso (20 mM) aproximadamente 2~4 días antes de la dosificación (5-7 días después de iniciar el tratamiento con DSS) para bloquear la captación tiroidea de cualquier posible ¹²⁵I libre no unido, generado *in vivo*. El día 9 después de iniciar el tratamiento con DSS, se administró una sola dosis de ¹²⁵I-F8/IL10 por vía intravenosa (IV). A continuación se resume la dosis y la radioactividad de cada grupo:

- i) Grupo 0 - dosis aproximada por ratón: 5 mg/kg
 Grupo 0 - radioactividad aproximada por ratón: 7,5 μ Ci (actividad específica 75 uCi/mg).
 ii) Grupo 1 - dosis aproximada por ratón: 5 mg/kg
 Grupo 1 - radioactividad aproximada por ratón: 10 μ Ci (actividad específica 100 uCi/mg).
 5 iii) Grupo 2 - dosis aproximada por ratón: 0,15 mg/kg,
 Grupo 2 - radioactividad aproximada por ratón: 12 μ Ci (actividad específica 4 490 uCi/mg).

Se extrajo sangre de los subgrupos de ratones a los 5 minutos, 1, 3, 6, 24, 48 y 96 horas y después de extrajeron varios tejidos. Las muestras de sangre se extrajeron mediante punción cardíaca o sangrado retroorbital en tubos de extracción con separadores de suero. Las muestras de suero se recogieron centrifugando las muestras de sangre a 10 000 g durante 5 min. Para la extracción de los tejidos, el animal se sacrificó y los tejidos de interés se extrajeron inmediatamente después del muestreo de sangre y la perfusión de todo el cuerpo. La perfusión de sangre de todo el cuerpo se realizó administrando aproximadamente 20 ml de heparina-PBS (25 unidades por ml) durante aproximadamente 10 minutos. Los tejidos de interés, que incluían cerebro, ganglios linfáticos mesentéricos, piel, tejido adiposo, músculo esquelético del muslo, pulmón, corazón, bazo, hígado, estómago, intestino delgado, intestino grueso y riñón, se recogieron y se pesaron. Se eliminó el contenido del TD (tubo digestivo). La radioactividad (recuentos totales en cpm) de las muestras tisulares se midió directamente con un contador gamma.

Autorradiografía de colon de ratones enfermos y sanos

La autorradiografía de colon se realizó en los colones de ratones del Grupo 0 y Grupo 2. Los colones se extrajeron, se eliminó su contenido y el tejido se expuso durante 24 horas a una pantalla de fósforo de obtención de imágenes (Molecular Dynamics) y se tomaron imágenes con un aparato Storm 860. Los resultados se muestran en la Figura 2. Carril-1: colon extirpado del Grupo 0 (ratón sano) 6 horas después de la inyección; Carril-2: colon extirpado del Grupo 2 (ratón tratado con DSS) 6 horas después de la inyección; Carril-3: colon extirpado del Grupo 0 (ratón sano) 24 horas después de la inyección; Carril-4: colon extirpado del Grupo 2 (ratón tratado con DSS) 24 horas después de la inyección. Se observó una localización irregular de 125 I-F8/IL10 a lo largo del colon en los ratones tratados con DSS y no en los ratones normales, en consonancia con la inflamación colónica irregular y el perfil de expresión asociado del EDA diana en este modelo.

Determinación de concentraciones radioactivas equivalentes en suero y tejidos y cálculos farmacocinéticos

Basándose en la radioactividad medida precipitable (asociada a proteínas) en TCA (ácido tricloroacético), se calculó la concentración equivalente en suero (ng eq/g) de 125 I-F8/IL10. Para la precipitación de TCA, la alícuota (50 μ l) de la muestra de suero se mezcló con 50 μ l de suero de ratón, seguido de la adición de 100 μ l de solución de TCA al 20 %. La mezcla de muestra se centrifugó a 10 000 g durante 5 minutos para precipitar la proteína. Se determinó la radioactividad total y soluble en TCA en el sobrenadante. La radioactividad precipitable en TCA (cpm) en una muestra dada, la actividad específica de la solución de dosificación (cpm precipitable en TCA por mg de proteína), así como los datos de mediciones de las muestras (t_s) y de la solución de dosificación (t_D), se utilizaron para calcular la concentración equivalente del artículo de ensayo (ng eq./ml) en una muestra dada, utilizando la fórmula: [cpm precipitable con TCA/EXP (-0,693/60,2*(t_s - t_D))]/[actividad específica (en cpm/mg) *volumen de muestra (en ml)].

La cuantificación de la concentración equivalente (ng eq. /g) de 125 I-F8/IL10 en los tejidos se calculó basándose en la radioactividad total medida en la muestra y en la actividad específica de la solución de dosificación después de una corrección de la semivida de desintegración física de 125 I, utilizando la fórmula: [cpm muestra/EXP(-0,693/60,2*(t_s - t_D))]/[actividad específica (en cpm/mg)* peso de la muestra (en mg)]. No se realizó homogeneización ni precipitación con TCA para muestras de tejido. Además de la concentración equivalente radioactiva (ng eq. /ml para suero, ne eq. /g para tejido), también se calculó el porcentaje de la dosis inyectada por gramo (% DI/g) y/o el porcentaje de la dosis inyectada (% DI) para el suero y los tejidos de interés.

La biodistribución de 125 I-F8/IL10 en ratones normales (Grupo 0) y en ratones tratados con DSS (Grupo 1) se determinó 6 horas (Figura 3A), 24 horas (Figura 3B) y 96 horas (Figura 3C) después de la inyección.

Los parámetros FC se calcularon con las concentraciones medias de suero o tejido en los puntos temporales medidos. Se utilizó un módulo de análisis no compartimental del paquete informático farmacocinético de WinNonlin (versión 5.1, Pharsight). El área bajo la curva (ABC) de la concentración frente al tiempo se calculó utilizando el procedimiento trapezoidal lineal.

Efecto sobre los niveles en suero de citocinas con el tratamiento terapéutico de F8-IL10 en un modelo de ratón de EII

Como se sabe que la IL-10 disminuye las citocinas proinflamatorias, se ensayó si la administración de F8-IL10 en el modelo de ratón de EII afectaría a las respuestas en suero de las citocinas en este modelo. Los días 3, 6 y 9, después de iniciar el tratamiento con DSS (n = 10 ratones/grupo), los ratones recibieron una administración IV de 200 μ g/ratón de F8-IL10, o de una inmunoproteína pequeña (F8-SIP) de control. Este régimen de dosis fue igual al de los regímenes eficaces en los modelos de artritis inducida por colágeno (Schwager K, y col. Arthritis Research and Therapy, (2009) 11: R142). Los grupos de control incluyeron ratones no enfermos (agua normal) y enfermos (n=10 ratones/grupo). El día 10 después de iniciar el tratamiento con DSS, se extrajo sangre y se obtuvo suero como se describe anteriormente para realizar estudios de localización. El suero se evaluó con respecto a los niveles de IL-1b, IL-12p40, IFNg, IL-6, KC,

IL-10 y TNF α , utilizando la plataforma de tecnología MSD y un kit MSD 7plex de ratón de acuerdo con las instrucciones del fabricante (Mesoscale Discovery, Gaithersburg, MD). En las Figuras 4 y 5, los niveles de citocinas se expresan como pg de proteína por ml de suero.

Tinción de tejidos humanos para la expresión de EDA

- 5 Análisis inmunohistoquímico de especímenes congelados embebidos en OCT de tejido de colon de una paciente de 60 años afectada por colitis ulcerosa y de un paciente de 42 años afectado por enfermedad de Crohn. Ambos especímenes se exploraron con el anticuerpo F8 en formato SIP y con el factor de Von Willebrand.

Además, se obtuvieron especímenes de biopsias congeladas emparejadas de los mismos pacientes afectados y no afectados con enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa (n = 3 pacientes con enfermedad de Crohn y n = 5 pacientes con CC) procedentes del Analytical Biological Services (Wilmington, DE). Las muestras congeladas se pusieron en hielo seco para impedir la descongelación, se embebieron en criomoldes estándar (Tissue-Tek 4557) cargados con compuesto O.C.T. (Tissue-Tek # 4583) y se ultracongelaron en isopentano que se había enfriado con hielo seco. Los bloques de tejido se seccionaron en un criostato Leica CM1850 a 4 micrómetros, se colocaron en portaobjetos de vidrio y se conservaron a -80 °C hasta que se realizó la inmunohistoquímica (IHQ). Al iniciar la IHQ, los tejidos se sumergieron en metanol frío (-20 F) (Fisher Scientific A412P-4) para eliminar la humedad que pudiese haberse formado durante su conservación y se secaron al aire durante 20 minutos a temperatura ambiente. Después, los tejidos se sumergieron en acetona fría (-20 F) (ACROS CAS # 67-64-1) durante 10 minutos y se secaron al aire durante 10 minutos a temperatura ambiente.

Los portaobjetos tisulares se etiquetaron con un código de barras Ventana apropiado y se colocaron en una Ventana Discovery XT para el análisis IHQ (inmunohistoquímico) de Fibronectina F8 SIP o KSF SIP (anticuerpo de control). La biotina endógena se bloqueó con suero normal de ratón al 5 % (Jackson Immuno Research 015-000-120) en el Bloque Ventana S (Ventana 760-4212) durante 20 minutos y con el kit de bloqueo de Ventana Biotin (Ventana 760-050) durante 8 minutos. La fibronectina F8SIP o KSF se diluyó en diluyente de anticuerpos Dako (S0908) (Dako North America, Carpinteria, CA) a una concentración de 1: 200 (100 μ l por portaobjetos) y se incubó durante 40 minutos. Los portaobjetos se tiñeron con colorante de contraste con hematoxilina y reactivo azulado (4 minutos cada uno) antes de completar el proceso. Los portaobjetos se retiraron y se colocaron en una ventana Symphony para su posterior deshidratación y se cubrieron con un cubreobjetos. En la Figura 7 se muestran imágenes representativas de IHQ. IHQ de muestras de tejido no afectado (izquierda) y afectado (derecha) del paciente UH0501-34 con colitis ulcerosa (parte superior) y del paciente UH0405-09 con enfermedad de Crohn (parte inferior).

30 **RESULTADOS**

Autorradiografía de colon

La Figura 2 muestra la autorradiografía de colonos de ratones no enfermos (tratados con agua) (carriles 1 y 3) o enfermos (tratados con DSS) (carriles 2 y 4) 6 horas (carriles 1 y 2) o 24 horas (carriles 3 y 4) después de la administración de F8-IL10 radioetiquetado. Esto demuestra que el F8-IL10 se acumula en el colon inflamado más que el colon normal. La aparición irregular de la localización de F8-IL10 en el colon enfermo está en consonancia con los niveles variables de inflamación y expresión de EDA observados a lo largo del colon en este modelo, lo que confirma además la localización de F8-IL10 con la inflamación.

Biodistribución de ¹²⁵I-F8-IL10 en ratones enfermos y sanos

La Figura 3 muestra la acumulación de ¹²⁵I-F8-IL10 en los puntos temporales de 6, 24 y 96 horas, en el colon y en los ganglios linfáticos (G. L.) mesentéricos en ratones enfermos (tratados con DSS) en comparación con ratones normales (tratados con agua). De manera similar a la Figura 2, estos datos demuestran el direccionamiento de F8-IL10 al colon y a los ganglios linfáticos asociados en ratones tratados con DSS. También a partir de estos estudios, se determinó que la semivida en suero era de aproximadamente 3,5 horas, mientras que la semivida de F8-IL10 en el colon era de aproximadamente 35 horas; un aumento de 10 veces que sugiere una mayor persistencia tisular. Esto indica que F8-IL10 no sólo se dirige al colon y a los ganglios linfáticos mesentéricos durante la inflamación colónica, sino que una vez allí también persiste durante más tiempo que en circulación. En conjunto, estos datos sugieren que en condiciones de inflamación en el colon, tal como ocurre en la enfermedad de Crohn y en la colitis ulcerosa en seres humanos, el F8-IL10 se dirigirá a estos sitios y persistirá preferentemente en ellos.

Niveles en suero de citocinas de ratones enfermos y sanos

50 La figura 4 muestra que en comparación con los grupos de control, la administración de F8-IL10 en una modalidad terapéutica produce una disminución significativa en los niveles en suero de las citocinas inflamatorias, IL-1 β , IL12p40, IFN γ e IL-6.

La figura 5 muestra que en comparación con los grupos de control, la administración de F8-IL10 en una modalidad terapéutica no produce un aumento de TNF-alfa ni de quimiocina derivada de queratinocitos (KC) y produce niveles de IL-10 aumentados. El aumento de los niveles de estas citocinas de la Figura 4 en el modelo DSS se asocia con la inducción de la enfermedad en el colon. Las disminuciones en estas citocinas inflamatorias de la Figura 4 y los

aumentos en IL-10 están en consonancia con los efectos biológicos conocidos de IL-10 (Abbas A, Lichtman A, Pober J., 1994, Cellular and Molecular Immunology. 2ª ed. Filadelfia: W. B. Saunders Company; Delves P, Roitt I (eds), 1998, Encyclopedia of Immunology, 2ª ed. San Diego: Academic Press). Por tanto, en este modelo de EII el F8-IL10 demuestra actividad farmacológica reduciendo las citocinas asociadas a la inflamación y la patología en el contexto de la EII. Dado que se sabe que estas citocinas proinflamatorias están reguladas positivamente en pacientes con EII, la regulación negativa de estas citocinas a través de la administración de F8-IL10 sugiere que es probable que el F8-IL10 sea beneficioso en el tratamiento *in vivo* de la EII. En particular, se sabe que en pacientes con EC, el interferón y y la IL-12p70 están regulados positivamente y por lo tanto los datos desvelados en el presente documento sugieren que probablemente la administración de F8-IL10 es particularmente útil para el tratamiento *in vivo* de la EC.

10 *Inmunohistoquímica*

La Figura 6 muestra que en un paciente afectado por colitis ulcerosa, el anticuerpo F8 SIP tiñe los vasos sanguíneos recién formados pero no los vasos sanguíneos normales. (El factor de Von Willebrand se utiliza habitualmente como marcador de vasculatura normal).

La Figura 7 muestra imágenes representativas de muestras de biopsia emparejadas de enfermedad de Crohn o CU teñidas con inmunohistoquímica específica de EDA. En cada imagen las flechas indican vasos. La intensidad de la tinción alrededor de los vasos en los vasos de los pacientes afectados aumenta en comparación con las muestras de los mismos pacientes no afectados. Esto sugiere que el aumento de la expresión de EDA podría producir un aumento de direccionamiento a zonas inflamadas del colon en estos contextos de enfermedades humanas. En resumen, la distribución dirigida al colon y la disminución en suero de las citocinas que se observa con F8-IL10 en un modelo murino de EII, así como el aumento de la expresión de EDA alrededor de los vasos en tejido de colon con enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa en pacientes humanos afectados, proporcionan conjuntamente pruebas que sugieren que la administración de F8-IL10 podría dirigirse y afectar positivamente a los pacientes con EII.

SECUENCIAS DESVELADAS EN LA SOLICITUD

SEQ ID NO: 1 (CDR1 de dominio VH del anticuerpo F8) LFT

25 SEQ ID NO: 2 (CDR2 de dominio VH del anticuerpo F8) SGSGGS

SEQ ID NO: 3 (CDR3 de dominio VH del anticuerpo F8) STHLYL

SEQ ID NO: 4 (CDR1 de dominio VL del anticuerpo F8) MPF

SEQ ID NO: 5 (CDR2 de dominio VL del anticuerpo F8) GASSRAT

SEQ ID NO: 6 (CDR3 de dominio VL del anticuerpo F8) MRGRPP

30 SEQ ID NO: 7 (dominio VH del anticuerpo F8)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNLSRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLTLTVSS

SEQ ID NO: 8 (dominio VL del anticuerpo F8)

EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSMPLAWYQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQMRGRPPTFGQGTKVEIK

35 SEQ ID NO: 9 (enlazador entre el dominio VH y el dominio VL del anticuerpo F8)
GGSGG

SEQ ID NO: 10 (Enlazador entre el dominio VL del anticuerpo F8 e IL-10) SSSSGSSSSGSSSSG

SEQ ID NO: 11 (IL-10 humana)

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPLNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLKESLLEDFKGYLGQCAL
SEMIQFYLEEVMQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNK
LQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

SEQ ID NO: 12 (anticuerpo F8)

ES 2 743 423 T3

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLVTVSSGGSGGEIVLTQS
PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIK

SEQ ID NO: 13 (F8-IL10)

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLFTMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVK
GRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGLVTVSSGGSGGEIVLTQS
PGTLSLSPGERATLSCRASQSVSMPFLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF
TLTISRLEPEDFAVYYCQMRGRPPTFGQGTKVEIKSSSSGSSSSGSSSSGSPGQGTQSENSCTH
FPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDFKGYLGCQALSEMIQFYLEEVMPO
AENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRRLRRLRCHRFLPCENKSKAVEQVKNAFNKLQEKGIYKAMSEFD
IFINYIEAYMTMKIRN

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado de anticuerpo para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el que el conjugado de anticuerpo comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al Extra Dominio-A (ED-A) de fibronectina y que está conjugado con interleucina-10, comprendiendo dicho anticuerpo un dominio V_H y un dominio V_L , en el que el dominio V_H comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en SEQ ID NO: 7; y el dominio V_L comprende las secuencias de aminoácidos de CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en SEQ ID NO: 8.
2. Un conjugado de anticuerpo para su uso en el suministro de una molécula inmunosupresora o antiinflamatoria en sitios de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un paciente, en el que el conjugado de anticuerpo comprende un anticuerpo, o un fragmento de unión a antígeno del mismo, que se une al Extra Dominio-A (ED-A) de fibronectina y que está conjugado con interleucina-10, comprendiendo dicho anticuerpo un dominio V_H y un dominio V_L , en el que el dominio V_H comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena pesada en SEQ ID NO: 7; y el dominio V_L comprende las secuencias de aminoácidos CDR1, CDR2 y CDR3 de cadena ligera en SEQ ID NO: 8.
3. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio V_H comprende un marco de un gen DP47 humano; y/o el dominio V_L comprende un marco de un gen DPK22 humano.
4. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; o el dominio V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
5. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en el que el dominio V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y el dominio V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8.
6. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha interleucina-10 es interleucina-10 (IL-10) humana.
7. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se conjuga con interleucina-10 mediante un enlazador.
8. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el conjugado de anticuerpo comprende un Fv monocatenario (scFv) en el cual el dominio V_H y el dominio V_L en el scFv se unen mediante un enlazador peptídico.
9. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, en el que el conjugado de anticuerpo comprende un diacuerpo, y en el que el diacuerpo comprende un polipéptido que comprende los dominios V_H y V_L , estando los dos dominios unidos mediante un enlazador peptídico.
10. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 9, en el que dicho enlazador peptídico consiste en al menos 5 aminoácidos.
11. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con la reivindicación 10, en el que dicho enlazador peptídico consiste en los restos de aminoácido GGSGG (SEQ ID NO: 9).
12. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con cualquier reivindicación anterior, en el que;
- (i) el dominio V_H comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7; y el dominio V_L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 8,
 - (ii) la molécula inmunosupresora o antiinflamatoria es interleucina-10 (IL-10) humana,
 - (iii) el enlazador peptídico consiste en los restos de aminoácido GGSGG (SEQ ID NO: 9), y
 - (iv) el dominio V_L del anticuerpo se conjuga con la IL-10 humana mediante un enlazador peptídico que comprende los restos de aminoácido (SSSSG)₃ (SEQ ID NO: 10).
13. Un conjugado de anticuerpo para su uso en el tratamiento de una enfermedad inflamatoria intestinal (EII), en el que dicho conjugado de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
14. Un conjugado de anticuerpo para su uso en el suministro de una molécula inmunosupresora o antiinflamatoria en sitios de enfermedad inflamatoria intestinal (EII) en un paciente, en el que dicho conjugado de anticuerpo comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 13.
15. El conjugado de anticuerpo para su uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicha EII se selecciona de cualquiera de lo siguiente: colitis ulcerosa (CU), colitis colagenosa, colitis linfocítica, colitis isquémica, colitis por desviación, enfermedad de Behçet, colitis indeterminada y enfermedad de Crohn (EC).

Figura 1A

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSLETMSWVRQAPGKGLEWVSAISGSGGSTYYAD
SVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKSTHLYLFDYWGQGTLVTVSS

(SEQ ID NO: 7)

Figura 1B

GGSGG

(SEQ ID NO: 9)

Figura 1C

EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSMPELAWYQQKPOQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSG
SGSGTDFTLISRLEPEDFAVYYCQOMRGRPFITFGQGTKVEIK

(SEQ ID NO: 8)

Figura 1D

SSSSGSSSSGSSSSG

(SEQ ID NO: 10)

Figura 1E

SPGQGTQSENSCTHFPGNLPNMLRDLRDAFSRVKTFQMKDQLDNLLLKESLLEDKGYLGC
QALSEMIQFYLEEYVMPQAENQDPDIKAHVNSLGENLKTLLRLRLRRCHRFLPCENKSKAVEQV
KNAFNKLQEKGIYKAMSEFDIFINYIEAYMTMKIRN

(SEQ ID NO: 11)

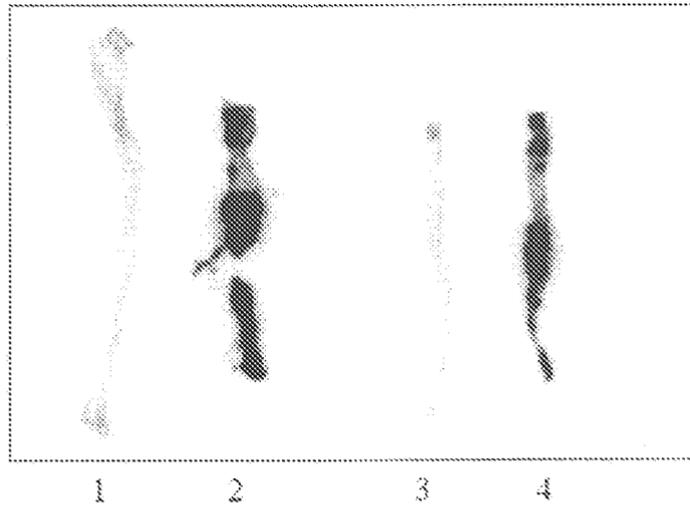


Figura 2

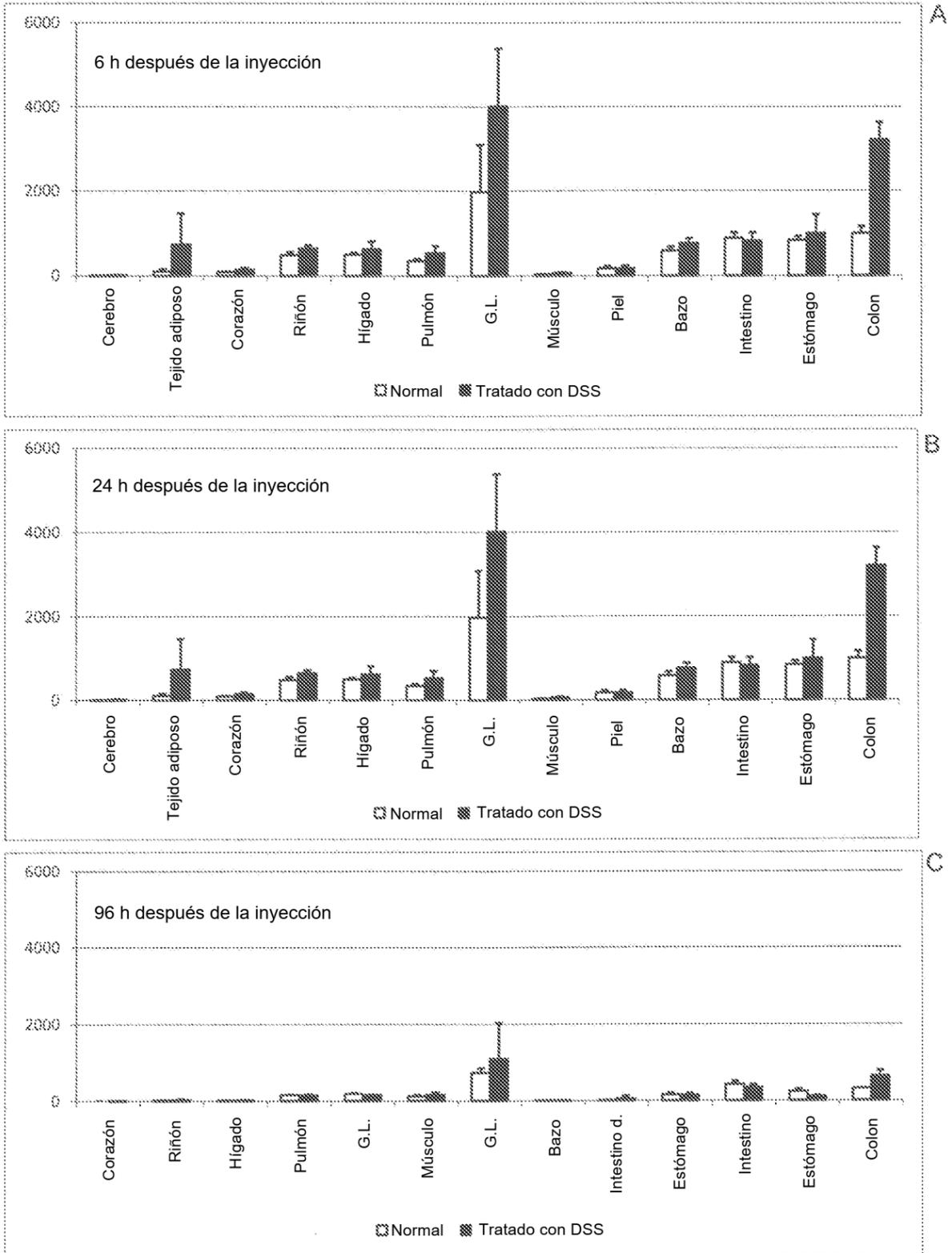


Figura 3

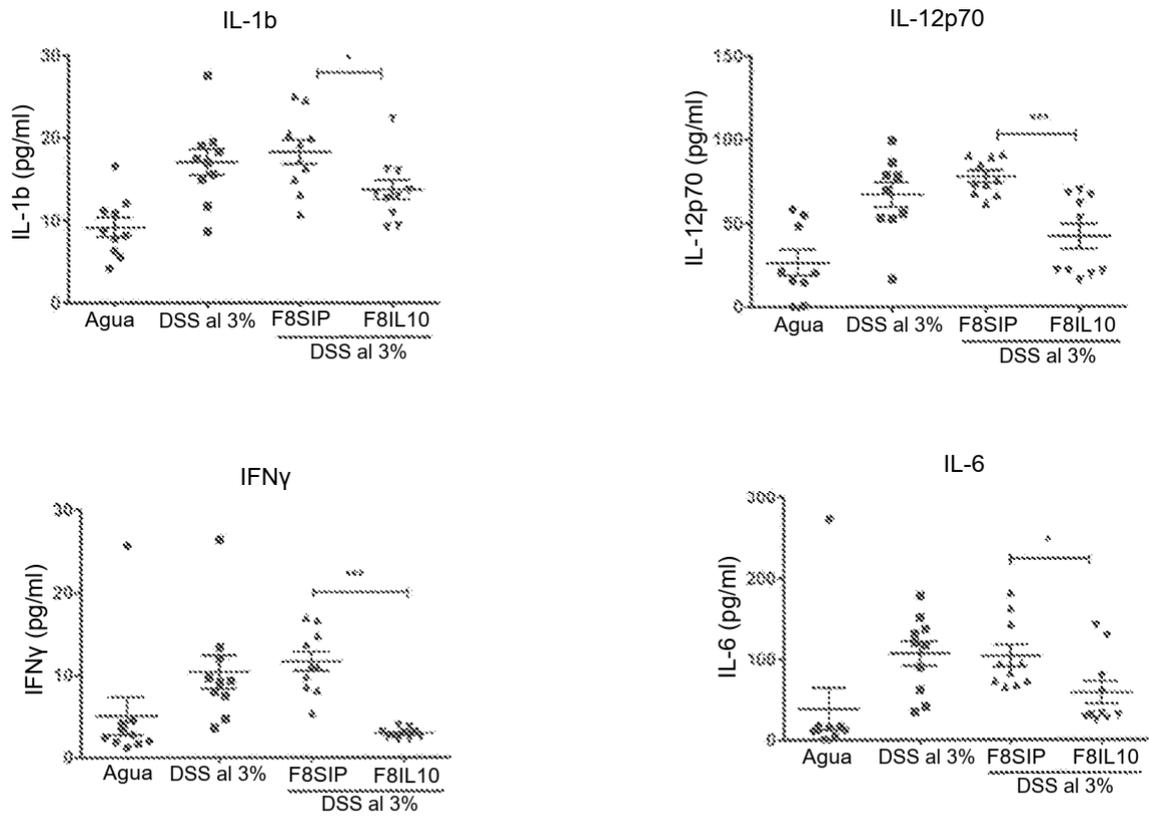


FIGURA 4

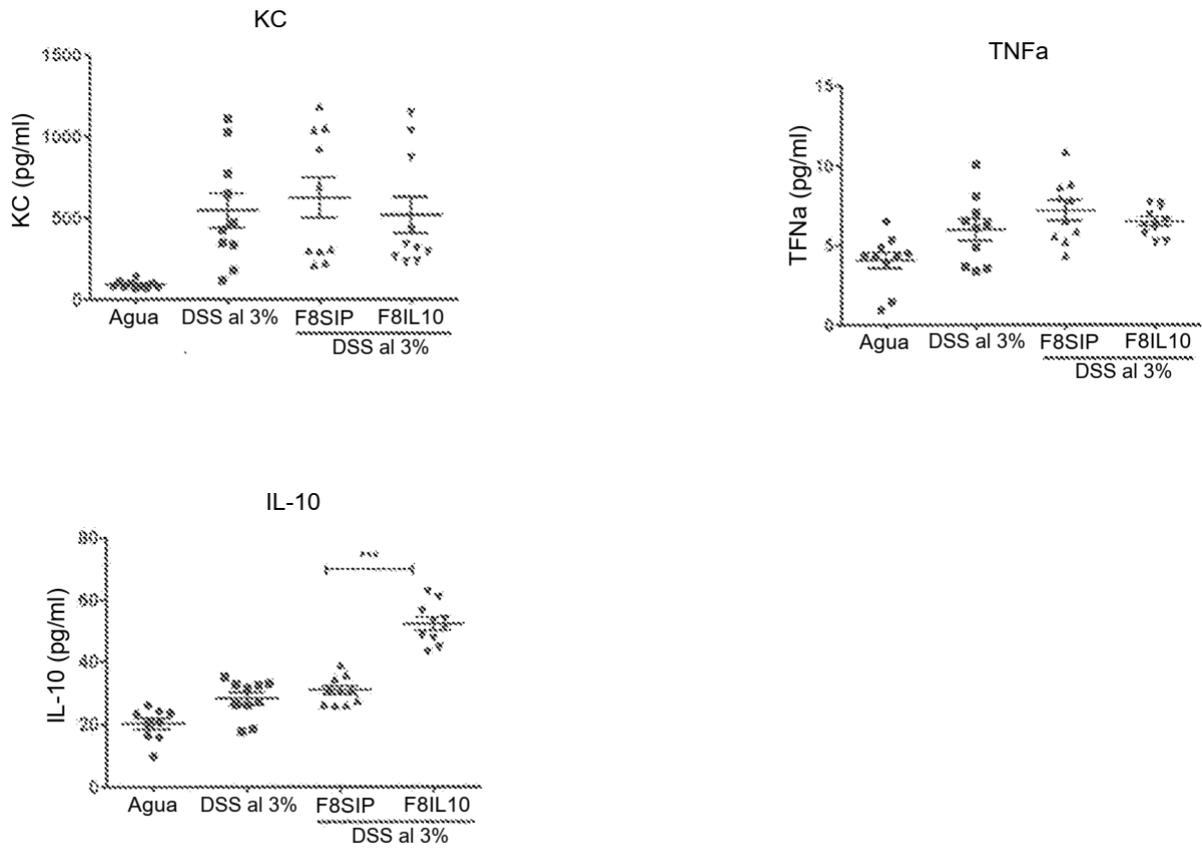


FIGURA 5

Colitis ulcerosa



Enfermedad de Crohn

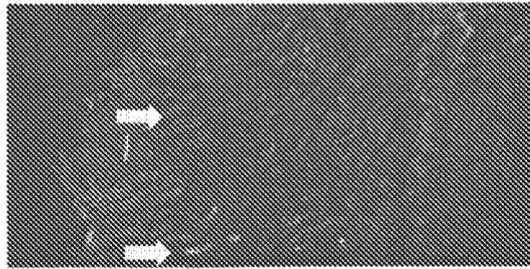


Figura 6

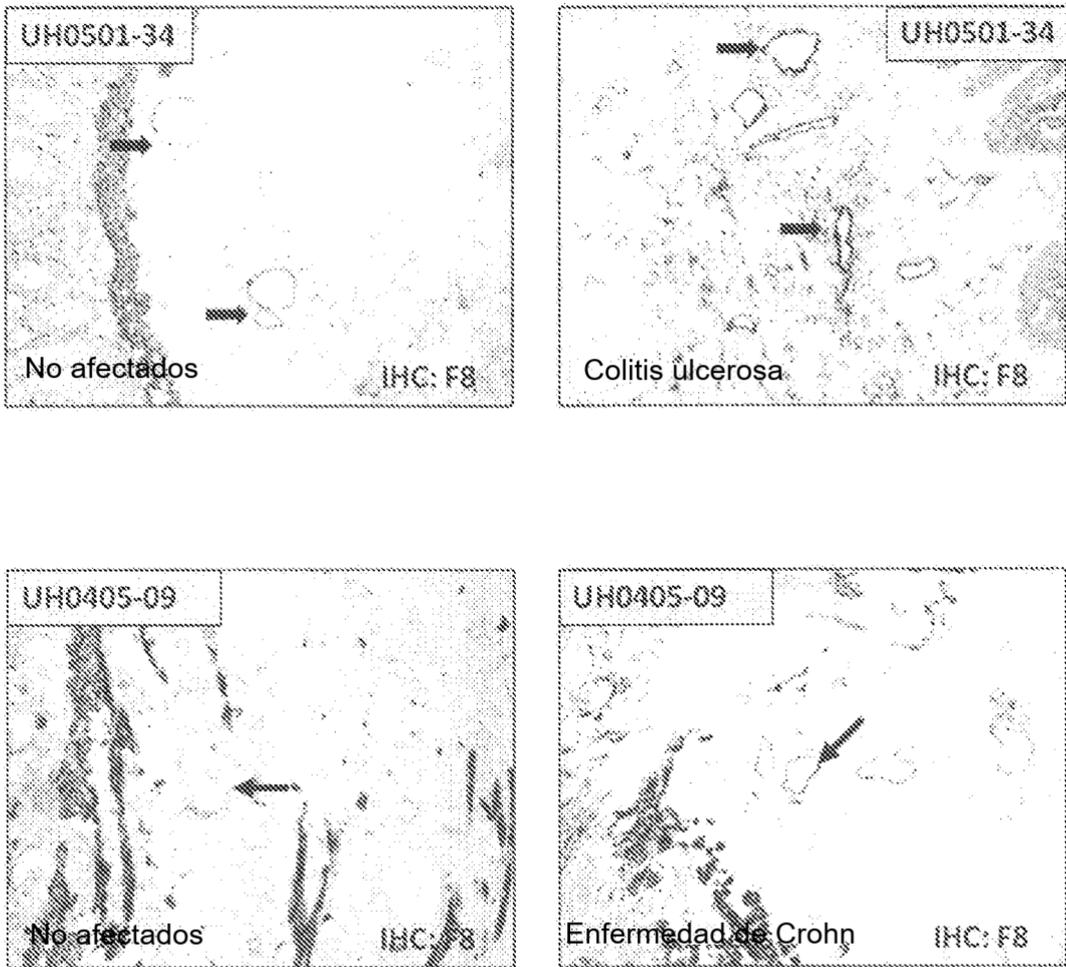


Figura 7