(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 747 727**

(51) Int. CI.:

C07K 14/81 (2006.01)
C12N 15/15 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **15.03.2016 PCT/EP2016/055601**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **22.09.2016 WO16146639**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **15.03.2016 E 16712761 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **03.07.2019 EP 3271385**

(54) Título: **Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer**

(30) Prioridad:

17.03.2015 WO PCT/EP2015/055560

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
11.03.2020

(73) Titular/es:

BIONTECH SE (100.0%)
An der Goldgrube 12
55131 Mainz, DE

(72) Inventor/es:

SAHIN, UGUR;
WÜSTEHUBE-LAUSCH, JOYCELYN;
FIEDLER, MARKUS;
DANESCHDAR, MATIN y
SCHMOLDT, HANS-ULRICH

(74) Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

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

Composiciones y métodos para el diagnóstico y tratamiento del cáncer

Campo técnico de la invención

La presente enseñanza se refiere al diagnóstico y el tratamiento de enfermedades cancerosas, en particular las enfermedades cancerosas que expresan la Seprasa (Fap-alfa; proteína alfa de activación de fibroblastos), tales como cáncer de mama, cáncer pulmonar o de los pulmones, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de conductos biliares, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio o cáncer de próstata. Más particularmente, la enseñanza se refiere a péptidos dirigidos a la Seprasa.

Antecedentes de la invención

El cáncer es una de las causas principales de muerte en todo el mundo, por encima de las enfermedades cardiacas. 8,2 millones de personas de la población mundial murieron de cáncer en 2012 (OMS). Las terapias clásicas contra el cáncer, por ejemplo, radioterapia, quimioterapia y procedimientos quirúrgicos convencionales, a menudo adolecen de una baja selectividad y, por lo tanto, de efectos secundarios tóxicos graves para el tejido sano. Las nuevas formas de tratamiento consisten en la administración dirigida de moléculas bioactivas (fármacos, citocinas, radionúclidos, etcétera) al ambiente tumoral por medio de moléculas de unión específica a antígenos asociados al tumor. Esto permitirá el direccionamiento selectivo de los fármacos hacia el tejido tumoral positivo al objetivo y destruirá eficazmente las células malignas sin dañar las células sanas. Esto va junto con el desarrollo de los llamados productos de diagnóstico complementarios que permiten la determinación de tumores positivos al objetivo dentro de un paciente para garantizar de antemano una estrategia adaptada racionalmente para una terapia individualizada contra el cáncer. En esto, la aplicación de técnicas de obtención de imágenes específicas del objetivo se ha convertido en una etapa de diagnóstico importante que revela un avance impresionante durante las últimas décadas. Las técnicas de obtención de imágenes pueden proporcionar información fundamental sobre la presencia y cantidad de proteínas asociadas a tumores, la localización, detección temprana, distribución, estratificación por pacientes y monitoreo del tratamiento (Stern, Case y otros, 2013).

Un paso crucial hacia las terapias contra el cáncer, personalizadas y adaptadas, es la identificación de proteínas marcadoras asociadas selectivamente al tumor. La serina proteasa Seprasa (Fap-alfa; proteína alfa de activación de fibroblastos) se sobreexpresa selectivamente en fibroblastos asociados al cáncer (CAF) en más del 90 % de los tumores epiteliales primarios humanos, tales como los cánceres de mama, pulmón y colorrectal con poca o nula expresión en fibroblastos normales u otros tejidos normales (Rui Liu, 2012), lo que lo convierte en un objetivo atractivo para el diagnóstico y la terapia contra el cáncer. La Seprasa es una proteína transmembrana de superficie celular tipo II de 170 kDa que pertenece a la familia de la dipeptidilaminopeptidasa post-prolina. Se ancla a la membrana plasmática por un dominio transmembrana corto, y expone intracelularmente una secuencia amino terminal, mientras que un dominio catalítico con un carboxilo terminal permanece en el espacio extracelular (Goldstein, Ghersi y otros, 1997, Pineiro-Sanchez, Goldstein y otros, 1997). El papel exacto de la Seprasa en el crecimiento e invasión tumoral, el(los) mecanismo(s) molecular(es) en el(los) que se involucra la enzima, así como también sus ligandos o sustratos naturales, permanecen en gran medida desconocidos.

Al ser la Seprasa un marcador selectivo para el tejido tumoral, pueden vislumbrarse una serie de estrategias terapéuticas potenciales dirigidas a dicha proteína. El uso de moléculas de unión a la Seprasa en una serie de modelos diferentes de cáncer in vivo ha demostrado que es posible afectar eficientemente la progresión tumoral en un enfoque preclínico (Loeffler, Kruger y otros, 2006, Ostermann, Garin-Chesa y otros, 2008, Liao, Luo y otros, 2009, Kraman, Bambrough y otros, 2010, Wen, Wang y otros, 2010). El documento WO2006/042282 describió inhibidores peptídicos de la Seprasa y sugirió métodos de tratamiento de pacientes con melanoma. Por el contrario, dirigirse a la Seprasa en un entorno clínico de pacientes humanos con cáncer mediante el uso del anticuerpo monoclonal F19, su versión humanizada Sibrotuzumab (Welt, Divgi y otros, 1994, Hofheinz, al-Batran y otros, 2003, Scott, Wiseman y otros, 2003), o el inhibidor de la enzima Seprasa Talabostat (Narra, Mullins y otros, 2007, Eager, Cunningham y otros, 2009, Eager, Cunningham y otros, 2009), ha demostrado solo una eficacia clínica modesta. Curiosamente, no se informaron toxicidades significativas en los estudios preclínicos dirigidos a la Seprasa (Welt, Divgi y otros, 1994, Lee, Fassnacht y otros, 2005, Loeffler, Kruger y otros, 2006, Ostermann, Garin-Chesa y otros, 2008, Liao, Luo y otros, 2009, Santos, Jung y otros, 2009, Kraman, Bambrough y otros, 2010, Wen, Wang y otros, 2010), aunque actualmente se analiza una expresión también por células madre de médula ósea (BMSC) multipotentes. En resumen, la biodistribución favorable de los anticuerpos específicos de Seprasa y la captación selectiva en sitios de enfermedad metastásica en pacientes informadas hasta ahora (Welt, Divgi y otros, 1994, Scott, Wiseman y otros, 2003) califican a la Seprasa como un candidato atractivo para los enfoques dirigidos a tumores. Debido al hecho de que aún se desconoce si la Seprasa actúa como un supresor tumoral (Wesley, Albino y otros, 1999, Ramirez-Montagut, Blachere y otros, 2004) o promueve el crecimiento tumoral (Cheng, Dunbrack y otros, 2002, Goodman, Rozypal y otros, 2003, Huang, Wang y otros, 2004) podría ser favorable desarrollar ligandos altamente selectivos para la Seprasa para las técnicas de obtención de imágenes que no tienen impacto en la función pero que proporcionan información sobre la localización, detección temprana, distribución, estratificación por pacientes y monitoreo del tratamiento (Stern, Case y otros, 2013).

Para el direccionamiento a tumores pobremente vascularizados, el gran tamaño de los anticuerpos e incluso sus fragmentos podría disminuir la tasa de penetración en el tejido y, por lo tanto, obstaculizar un suministro eficiente. Además, debido a la circulación sanguínea prolongada de los anticuerpos, estos no parecen óptimos para el uso diagnóstico, especialmente en el contexto de los conceptos de obtención de imágenes. Además de lo mencionado anteriormente, la arquitectura molecular de los anticuerpos, con un complejo patrón de glicosilación y puentes disulfuro, requiere una fabricación compleja y costosa y complica la funcionalización posterior, por ejemplo, por medio de un marcador para la obtención de imágenes. Para superar estas limitaciones, como una alternativa a los anticuerpos, han surgido durante las últimas décadas los llamados andamios de proteínas: Los andamios proporcionan una armazón estructural robusta para diseñar con precisión moléculas de interacción adaptadas para el reconocimiento estricto y específico de un objetivo determinado (Weidle, Auer y otros, 2013). La mayoría de ellos se pliegan adecuadamente en condiciones no reductoras y pueden expresarse en bacterias sin la necesidad de desnaturalización y replegamiento. Incluso la síntesis química es una opción para la producción de algunos de los formatos. Finalmente, son muy adecuados para la funcionalización posterior (marcaje, oligomerización, fusión con otros péptidos, etcétera) para generar moléculas de unión multifuncionales. Entre los diferentes enfoques basados en andamios, las miniproteínas con nudo de cistina ("knotinas") han demostrado un gran potencial para el desarrollo de agentes terapéuticos y de diagnóstico dirigidos. Por ejemplo, Cochran y colaboradores generaron miniproteínas radiomarcadas, 18F-FP-2.5D y 18F-FP-2.5F, para la obtención de imágenes por PET específicas de integrina de tumores U87MG, marcadas por un buen contraste, un rápido direccionamiento hacia el tumor, un rápido aclaramiento del cuerpo y una captación relativamente baja en tejidos normales (Kimura, Cheng y otros, 2009, Kimura, Levin y otros, 2009, Kimura, Miao y otros, 2010, Kimura, Jones y otros, 2011, Liu, Liu y otros, 2011). Las miniproteínas son polipéptidos pequeños de 30-50 aminoácidos que contienen tres enlaces disulfuro que forman la estructura anudada del mismo nombre (Kolmar 2009, Moore y Cochran, 2012). La topología de pseudonudo de cistina es responsable de una extraordinaria estabilidad térmica, proteolítica y química, lo cual es conveniente para aplicaciones biomédicas in vivo (Kolmar, 2011). Por ejemplo, sin perder su integridad estructural y funcional, las miniproteínas pueden hervirse en un ambiente alcalino o ácido (Weidle, Auer y otros, 2013). Las regiones de lazo con restricción de disulfuro toleran una amplia diversidad de secuencias, lo que proporciona una armazón molecular robusta para diseñar proteínas que reconozcan una variedad de objetivos biomédicos.

Existe la necesidad en la técnica de moléculas de unión a la Seprasa que sean útiles en enfoques diagnósticos y terapéuticos para tumores que expresan la Seprasa.

Se describen en la presente descripción agentes de unión a la Seprasa tales como péptidos de unión a la Seprasa que muestran una alta especificidad y selectividad por la Seprasa humana. Los agentes de unión a la Seprasa descritos en la presente descripción son herramientas excelentes para aplicaciones de diagnóstico, particularmente para la obtención de imágenes de tumores y aplicaciones terapéuticas mediante un direccionamiento eficiente al microambiente tumoral.

Resumen

De acuerdo con la enseñanza, una variante de cadena abierta del inhibidor de tripsina II de tipo knotina de Momordica cochinchinensis (oMCoTI-II) se usó como un andamio molecular para diseñar una proteína de unión específica a la Seprasa para aplicaciones de direccionamiento tumoral. Para este fin, se usó una biblioteca combinatoria de fagos para la selección de variantes de oMCoTI-II que interactúan específicamente con el dominio extracelular de la Seprasa humana recombinante. Uno de los péptidos de knotina (miniproteínas) identificados que muestran unión al objetivo predefinido, MC-FA-010 (aa: GKCPYSNWTPGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG), se caracterizó con más detalle. Muestra formación de complejos específicos de la Seprasa humana, mientras que no se reconocen proteínas relacionadas, tales como el homólogo estrechamente relacionado DPP-IV. La unión depende principalmente de dos residuos alifáticos y un motivo GRGP en el primer lazo de MC-FA-010, lo cual podría mostrarse mediante mutagénesis por barrido de alanina. Además, la miniproteína específica de la Seprasa presenta reacción cruzada con el homólogo murino según se determinó por citometría de flujo y ELISA de células completas mediante el uso de líneas celulares CHO-K1 positivas al objetivo. El direccionamiento específico a la Seprasa expresada por fibroblastos asociados al cáncer (CAF) podría mostrarse mediante tinción con inmunofluorescencia de cortes histológicos de tumores CT26. El direccionamiento in vivo al tejido neoplásico podría demostrarse en ratones Fox n1 (nu) que portan tumores CHO-K1 positivos para el objetivo.

La presente enseñanza proporciona, en general, compuestos útiles para el tratamiento y/o diagnóstico de enfermedades cancerosas mediante el direccionamiento a la Seprasa. Estos compuestos proporcionan la detección selectiva de células que expresan la Seprasa y/o la erradicación de células que expresan la Seprasa y/o de células que se asocian con células que expresan la Seprasa, lo que minimiza de esta manera los efectos adversos para las células normales que no expresan la Seprasa.

La presente enseñanza describe un péptido de unión a la Seprasa que comprende la secuencia de aminoácidos Gly Arg Gly Pro.

En una primera modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:
Tyr Xaa1 Xaa2 Trp Xaa3 Xaa4 Gly Arg Gly Pro

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:
Tyr Xaa1 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
en donde
Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:
Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro.

En una segunda modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:
Xaa1 Tyr Xaa2 Xaa3 Trp Xaa4 Xaa5 Gly Arg Gly Pro

en donde
Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:
Pro Tyr Xaa1 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:
Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro.

En una tercera modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Cys Xaa3 Tyr Xaa4 Xaa5 Trp Xaa6 Xaa7 Gly Arg Gly Pro Xaa8

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala,
Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa6 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa7 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa8 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Cys Pro Tyr Xaa3 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa4

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Gly Lys Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp.

En una modalidad adicional, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Xaa1 Tyr Xaa2 Xaa3 Trp Xaa4 Xaa5 Gly Arg Gly Pro Xaa6 Cys

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa6 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa es, preferentemente, parte de una estructura de nudo de cistina en donde las cisteínas son, preferentemente, la primera cisteína y la segunda cisteína de la estructura de nudo de cistina y/o la secuencia de aminoácidos entre las cisteínas forma el primer lazo de la estructura de nudo de cistina.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Pro Tyr Xaa1 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa2 Cys

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys.

Además, se describe un péptido de unión a la Seprasa que comprende la secuencia de aminoácidos:

(Xaa)n1 Cys (Xaa)n2 Gly Arg Gly Pro (Xaa)n3 Cys (Xaa)n4 Cys (Xaa)n5 Cys (Xaa)n6 Cys (Xaa)n7 Cys (Xaa)n8

en donde

los residuos de Cys forman una estructura de nudo de cisteína,

Xaa es independientemente entre sí cualquier aminoácido y

n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7 y n8 son los números respectivos de aminoácidos,

en donde la naturaleza de los aminoácidos Xaa y/o el número de aminoácidos n1, n2, n3, n4, n5, n6, n7 y n8 son de manera que puede formarse una estructura de nudo de cisteína entre los residuos de Cys,

en donde, preferentemente,

n1 es de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2,

n2 es de 3 a 10, preferentemente, 6, 7 u 8,

n3 es de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2,

n4 es de 3 a 7, preferentemente, 4, 5 o 6,

n5 es de 2 a 6, preferentemente, 2, 3 o 4,

n6 es de 1 a 3, preferentemente, 1 o 2,

n7 es de 3 a 7, preferentemente, 4, 5 o 6, y

n8 es de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2.

En una modalidad adicional, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Xaa1 Tyr Xaa2 Xaa3 Trp Xaa4 Xaa5 Gly Arg Gly Pro Xaa6 Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa7 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa6 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp,

Xaa7 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Pro Tyr Xaa1 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa2 Cys Arg Arg Asp Ser

Asp Cys Pro Gly Xaa3 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys Arg Arg Asp Ser Asp
Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys.

En una modalidad adicional, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Cys Xaa3 Tyr Xaa4 Xaa5 Trp Xaa6 Xaa7 Gly Arg Gly Pro Xaa8 Cys
Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa9 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys
Gly

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,

Xaa6 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,

Xaa7 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,

Xaa8 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp,

Xaa9 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Xaa1 Xaa2 Cys Pro Tyr Xaa3 Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa4 Cys Arg

Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa5 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly

en donde

Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly,

Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala,

Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,

Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp,

Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Gly Lys Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys Arg Arg Asp

Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly.

En una modalidad preferida, el péptido de unión a la Seprasa comprende la secuencia de aminoácidos:

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys Arg Arg Asp

Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys Gly.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa comprende una secuencia de aminoácidos que se muestra más abajo en la Tabla 1, la Tabla 2 o la Tabla 4. En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa comprende una secuencia de aminoácidos mostrada en las SEQ ID NO: 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95 o 96 del listado de secuencias.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza forma o es parte de un andamio. El término "andamio" se refiere a una estructura que confiere rigidez al péptido de unión a la Seprasa o a la secuencia de aminoácidos descrita en la presente descripción.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza se estabiliza mediante una modificación covalente. En una modalidad, dicha modificación covalente es la ciclación. En una modalidad, dicha ciclación es a través de uno o más puentes disulfuro.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza forma y/o es parte de una estructura de nudo de cistina, preferentemente, una estructura de nudo de cistina inhibidora. En una modalidad, la estructura de nudo de cistina se basa en el inhibidor de tripsina II de cadena abierta de Momordica cochinchinensis (MCoTI-II), el inhibidor de tripsina EETI-II de Ecballium elaterium y un andamio MCoTI-II optimizado.

La secuencia de aminoácidos Gly Arg Gly Pro y/o la secuencia de aminoácidos en el péptido de unión a la Seprasa de la primera o la segunda modalidad de la enseñanza es, preferentemente, parte de una estructura de nudo de cistina en donde la secuencia de aminoácidos se ubica dentro del primer lazo (es decir, entre la primera cisteína y la segunda cisteína) de la estructura de nudo de cistina.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende, además, al menos una pareja de fusión. En una modalidad, la pareja de fusión comprende una secuencia de aminoácidos heteróloga.

La enseñanza proporciona, además, un agente de unión a la Seprasa que comprende uno o más tales como 2, 3, 4, 5, 6 o más péptidos de unión a la Seprasa como se describe en la presente descripción, en donde los péptidos de unión a la Seprasa pueden ser idénticos o diferentes. La presente enseñanza proporciona, además, un agente de unión a la Seprasa que comprende el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza asociado covalentemente y/o no covalentemente, preferentemente, asociado covalentemente con al menos un resto adicional.

En una modalidad del péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, la pareja de fusión o resto adicional comprende una proteína portadora, un marcador, un indicador o una etiqueta. En una modalidad, el indicador es un indicador para un ensayo inmunológico, en donde el indicador se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano picante o una molécula fluorescente. En una modalidad, la pareja de fusión o resto adicional se selecciona del grupo que consiste en un casete His6, tiorredoxina, una etiqueta S, biotina o sus combinaciones.

En una modalidad, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende al menos dos subunidades que se asocian covalentemente y/o no covalentemente, cada una de dichas subunidades comprende un péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza, en donde los péptidos de unión a la Seprasa pueden ser idénticos o diferentes.

De acuerdo con la enseñanza, en una modalidad, la asociación no covalente es a través de un compuesto que comprende estreptavidina. De acuerdo con la enseñanza, en una modalidad, la asociación covalente es a través de enlazadores peptídicos y/o no peptídicos.

Por lo tanto, en una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza se presenta en forma oligomérica o multimérica. En esta modalidad, dos o más péptidos de unión a la Seprasa de la enseñanza que pueden ser idénticos o diferentes pueden unirse o acoplarse mediante unión covalente o no covalente, tal como a través de biotina/estreptavidina. De esta forma, los péptidos de unión a la Seprasa de la enseñanza pueden formar dímeros, trímeros, tetrámeros, etcétera.

En una modalidad, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende al menos cuatro subunidades que se asocian no covalentemente.

En una modalidad, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende al menos tres subunidades que se asocian covalentemente.

En una modalidad, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza comprende el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza asociado covalentemente y/o no covalentemente, preferentemente, asociado covalentemente con al menos un marcador o indicador detectable y/o al menos un resto efector terapéutico.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza se une a un dominio extracelular de la Seprasa.

En una modalidad del péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, dicha Seprasa es expresada por células.

En una modalidad, el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza no se une a la DPP IV.

En una modalidad de la enseñanza, la unión es una unión específica.

La presente enseñanza proporciona, además, un ácido nucleico recombinante que codifica un péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza. En una modalidad, el ácido nucleico recombinante tiene la forma de un vector o la forma de ARN.

La presente enseñanza proporciona, además, una célula huésped que comprende un ácido nucleico recombinante de la enseñanza.

Otro objeto de la enseñanza es proporcionar medios y métodos para el diagnóstico, la detección o el monitoreo, es decir, determinar la regresión, la progresión, el curso y/o la aparición de una enfermedad cancerosa.

La presente enseñanza proporciona un kit de prueba que comprende el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza. En una modalidad, el kit de prueba comprende, además, al menos un reactivo adicional para realizar un inmunoensayo y/o las instrucciones para usar el kit para realizar un inmunoensayo. En una modalidad, el kit de prueba de la enseñanza es un kit de prueba de diagnóstico.

Los kits de pruebas de diagnóstico de la enseñanza pueden ser útiles en los métodos para el diagnóstico, la detección o el monitoreo del cáncer de la enseñanza. Estos kits pueden incluir panfletos informativos, por ejemplo, panfletos que informan cómo usar los reactivos para realizar un método descrito en la presente descripción.

La presente enseñanza proporciona un dispositivo de ensayo que comprende el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza. En una modalidad, el dispositivo de ensayo es un dispositivo de ensayo inmunoabsorbente ligado a enzima. En una modalidad del dispositivo de ensayo de la enseñanza, el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa se inmoviliza de forma liberable o no liberable sobre un soporte sólido.

La presente enseñanza proporciona un método para analizar la presencia y/o cantidad de Seprasa en una muestra que comprende usar el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza.

La presente enseñanza proporciona un método para el diagnóstico, la detección o el monitoreo del cáncer en un paciente que comprende analizar la presencia y/o cantidad de Seprasa en dicho paciente, mediante el uso del péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza
En un aspecto particular, la enseñanza se refiere a un método para la detección, es decir, para determinar la posición o el sitio, de una enfermedad cancerosa, por ejemplo, un tejido u órgano en particular. En una modalidad, dicho método comprende administrar a un paciente un compuesto de unión a la Seprasa de la enseñanza que se acopla a un marcador detectable.

El marcaje de un tejido u órgano en dicho paciente puede indicar la presencia o el riesgo de una enfermedad cancerosa en dicho tejido u órgano.

En una modalidad, el tejido u órgano es un tejido u órgano en donde las células, cuando el tejido u órgano está libre de cáncer, no expresan sustancialmente la Seprasa.

En una modalidad de los métodos de la enseñanza, dicho análisis se realiza en una muestra biológica aislada a partir de dicho paciente.

En una modalidad, la muestra biológica se aísla a partir de un paciente que tiene una enfermedad cancerosa, se sospecha que tiene o se enferma con una enfermedad cancerosa o que tiene potencial para una enfermedad cancerosa. En una modalidad, la muestra biológica es de un tejido u órgano en donde las células, cuando el tejido u órgano está libre de cáncer, no expresan sustancialmente la Seprasa.

Típicamente, el nivel de la Seprasa en una muestra biológica se compara con un nivel de referencia, en donde una desviación de dicho nivel de referencia indica la presencia y/o etapa de una enfermedad cancerosa en un paciente. El nivel de referencia puede ser un nivel determinado en una muestra de control (por ejemplo, de un tejido o sujeto sano) o un nivel mediano a partir de sujetos sanos. Una "desviación" de dicho nivel de referencia designa cualquier cambio significativo, tal como un aumento o disminución en al menos 10 %, 20 % o 30 %, preferentemente, en al menos 40 % o 50 %, o incluso más. La presencia de la Seprasa y/o una cantidad de la Seprasa que aumenta en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo, en comparación con un paciente sin una enfermedad cancerosa, puede indicar la presencia o el riesgo de (es decir, un potencial para el desarrollo de) una enfermedad cancerosa en dicho paciente.

En una modalidad, una muestra biológica y/o una muestra de control/referencia es de un tejido u órgano que corresponde al tejido u órgano que debe diagnosticarse, detectarse o monitorearse con respecto a la afección por una enfermedad cancerosa; por ejemplo, la enfermedad cancerosa que debe diagnosticarse, detectarse o monitorearse es el cáncer de cerebro y la muestra biológica y/o la muestra de control/referencia es tejido cerebral.

En una modalidad, la muestra biológica y/o una muestra de control/referencia es de un tejido u órgano en donde las células, cuando el tejido u órgano está libre de cáncer, no expresan sustancialmente la Seprasa. La indicación de la presencia o el riesgo de una enfermedad cancerosa en un paciente por los métodos de la enseñanza pueden indicar que la enfermedad cancerosa está en dicho tejido u órgano, o que dicho tejido u órgano está en riesgo de dicha enfermedad cancerosa.

Los métodos para el diagnóstico, la detección o el monitoreo permiten evaluaciones cuantitativas y/o cualitativas, por ejemplo, mediciones absolutas y/o relativas de las moléculas objetivo, por ejemplo, niveles de expresión de la Seprasa.

Los medios para realizar dicho ensayo para determinar la presencia y/o cantidad de la Seprasa se describen en la presente descripción y serán evidentes para el experto en la técnica. Típicamente, el análisis en los métodos de la enseñanza implica el uso de ligandos marcados que se unen específicamente a la Seprasa, por ejemplo, un compuesto de la

enseñanza que se une específicamente a la Seprasa directa o indirectamente a un marcador que proporciona la detección, por ejemplo, enzimas indicadoras, radiomarcadores, fluoróforos o partículas paramagnéticas.

En una modalidad de los métodos de la enseñanza, la presencia de la Seprasa o una cantidad de la Seprasa que es mayor en comparación con una referencia sin cáncer indica que el paciente tiene cáncer.

Los métodos de monitoreo de acuerdo con la enseñanza comprenden, preferentemente, el análisis para determinar la presencia y/o cantidad de la Seprasa en una primera muestra en un primer instante en el tiempo y en una muestra adicional en un segundo instante en el tiempo, en donde la regresión, la progresión, el curso y/o la aparición de una enfermedad cancerosa puede determinarse mediante la comparación de las dos muestras.

Una cantidad de la Seprasa que disminuye en una muestra biológica en comparación con una muestra biológica tomada anteriormente de un paciente puede indicar una regresión, un curso positivo, por ejemplo, un tratamiento exitoso o un riesgo reducido de aparición de una enfermedad cancerosa en dicho paciente.

Una cantidad de la Seprasa que se incrementa en una muestra biológica en comparación con una muestra biológica tomada anteriormente de un paciente puede indicar una progresión, un curso negativo, por ejemplo, un tratamiento fallido, recurrencia o comportamiento metastásico, una aparición o un riesgo de aparición de una enfermedad cancerosa en dicho paciente.

En una modalidad de los métodos de la enseñanza, el análisis para determinar la presencia y/o cantidad de la Seprasa comprende:
(i) poner en contacto la muestra biológica con el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, y
(ii) detectar la formación de y/o determinar la cantidad de un complejo entre el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa y la Seprasa.

En una modalidad de los métodos de la enseñanza, el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa comprende o se conjuga con al menos un marcador o indicador detectable.

En una modalidad, el método de la enseñanza se realiza en el contexto de un inmunoensayo.

En una modalidad de los métodos de la enseñanza, el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa se inmoviliza de forma liberable o no liberable sobre un soporte sólido.

La unión de un compuesto de unión a la Seprasa de acuerdo con la enseñanza a la Seprasa puede interferir con la función de la Seprasa, por ejemplo, mediante la inhibición de la actividad catalítica. Además, un compuesto de unión a la Seprasa puede unirse a restos efectores terapéuticos, por ejemplo, radiomarcadores, citotoxinas y enzimas citotóxicas, y la unión del compuesto a la Seprasa puede dirigirse selectivamente y destruir células que expresan la Seprasa o células que se asocian con células que expresan la Seprasa, en particular células cancerosas. En una modalidad, dicho compuesto reduce el crecimiento de las células tumorales y/o induce la muerte de las células tumorales y, por lo tanto, tiene un efecto inhibidor de tumores o destructor de tumores. En consecuencia, los compuestos de unión a la Seprasa descritos en la presente descripción pueden usarse en terapia, en particular para un tratamiento profiláctico y/o terapéutico de enfermedades cancerosas.

Un diagnóstico positivo de una enfermedad cancerosa, como se describió anteriormente mediante el uso de los métodos de la presente enseñanza, puede indicar una enfermedad cancerosa que es susceptible a los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción.

Por lo tanto, otro objeto de la enseñanza es proporcionar medios y métodos para el tratamiento terapéutico y/o profiláctico de una enfermedad cancerosa.

La presente enseñanza proporciona una composición farmacéutica que comprende el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, el ácido nucleico recombinante de la enseñanza o la célula huésped de la enseñanza.

Una composición farmacéutica de la enseñanza puede comprender un portador aceptable farmacéuticamente y puede comprender, opcionalmente, sustancias adicionales como se describe en la presente descripción.

La presente enseñanza proporciona el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, el ácido nucleico recombinante de la enseñanza, la célula huésped de la enseñanza o la composición farmacéutica de la enseñanza para su uso en terapia, en particular para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente.

La presente enseñanza proporciona el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza o el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza para su uso en el direccionamiento a un cáncer en un paciente.

La presente enseñanza proporciona un método para el tratamiento a un paciente que comprende administrar al paciente el péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza, el agente de unión a la Seprasa de la enseñanza, el ácido nucleico recombinante de la enseñanza, la célula huésped de la enseñanza o la composición farmacéutica de la enseñanza, en donde, preferentemente, el paciente tiene cáncer o está en riesgo de desarrollar cáncer.

En una modalidad de los aspectos anteriores, el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa comprende o se conjuga con al menos un resto efector terapéutico.

En una modalidad de los aspectos anteriores, el cáncer es positivo para la Seprasa y/o involucra células que expresan la Seprasa. En una modalidad, las células son fibroblastos asociados al cáncer.

De acuerdo con todos los aspectos de la enseñanza, el cáncer se selecciona, preferentemente, del grupo que consiste en cáncer de mama, cáncer de pulmón o pulmonar, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de conductos biliares, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio o cáncer de próstata.

De acuerdo con todos los aspectos de la enseñanza, la Seprasa comprende, preferentemente, la secuencia de aminoácidos de acuerdo con la SEQ ID NO: 3 o 4 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

En un aspecto, la enseñanza proporciona agentes como se describen en la presente descripción para su uso en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción. En una modalidad, la enseñanza proporciona una composición farmacéutica como se describe en la presente descripción para su uso en los métodos de tratamiento descritos en la presente descripción.

Los tratamientos descritos en la presente descripción pueden combinarse con resección quirúrgica y/o radiación y/o quimioterapia tradicional.

Otras características y ventajas de la presente enseñanza serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada y de las reivindicaciones.

Descripción detallada

Aunque la presente invención se describe en detalle más abajo, debe entenderse que esta invención no se limita a las metodologías, protocolos y reactivos particulares descritos en la presente descripción, ya que pueden variar. Debe entenderse, también, que la terminología utilizada en la presente descripción es para el propósito de describir modalidades particulares solamente, y no pretende limitar el alcance de la presente invención la cual se limitará solamente por las reivindicaciones anexas. A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos que se usan en la presente descripción tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente un experto en la técnica.

A continuación, se describirán los elementos de la presente invención. Estos elementos se enumeran con modalidades específicas, sin embargo, debe entenderse que pueden combinarse de cualquier manera y en cualquier número para crear modalidades adicionales. Los ejemplos descritos de diversas maneras y las modalidades preferidas no deben interpretarse como que limitan la presente invención a solamente las modalidades descritas explícitamente. Debe entenderse que esta descripción sustenta y abarca modalidades que combinan las modalidades descritas explícitamente con cualquier cantidad de elementos descritos y/o preferidos. Además, cualquiera de las permutaciones y combinaciones de todos los elementos descritos en esta solicitud deben considerarse descritas por la descripción de la presente solicitud a menos que el contexto lo indique de cualquier otra manera.

Preferentemente, los términos que se usan en la presente descripción se definen como se describe en "A multilingual glossary of biotechnological terms: (IUPAC Recommendations)", H.G.W. Leuenberger, B. Nagel, y H. Kölbl, Eds., Helvetica Chimica Acta, CH-4010 Basel, Suiza, (1995).

La práctica de la presente enseñanza empleará, a menos que se indique de cualquier otra manera, métodos convencionales de química, bioquímica, biología celular, inmunología y técnicas de ADN recombinante que se explican en la literatura del campo (consultar, por ejemplo, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición, J. Sambrook y otros eds., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor 1989).

A lo largo de esta descripción y de las reivindicaciones que siguen, a menos que el contexto lo requiera de otra manera, la palabra “comprender”, y variaciones tales como “comprende” y “que comprende”, se entenderá que implican la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pero no la exclusión de ningún otro miembro, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas aunque en algunas modalidades tal otro miembro entero, o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas pueden excluirse, es decir, el tema consiste en la inclusión de un miembro declarado, entero o etapa o grupo de miembros, enteros o etapas. Los términos "un" y "una" y "el/la" y referentes similares usados en el contexto para describir la enseñanza (especialmente en el contexto de las reivindicaciones) deben

interpretarse para cubrir tanto el singular como el plural, a menos que se indique de cualquier otra manera en la presente descripción, o claramente se contradiga por el contexto. La enumeración de los intervalos de valores en la presente descripción pretende servir simplemente como un método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentra dentro del intervalo. A menos que se indique de otra manera en la presente descripción, cada valor individual se incorpora en la descripción como si se enumerara individualmente en la presente descripción. Todos los métodos que se describen en la presente descripción pueden llevarse a cabo en cualquier orden adecuado a menos que se indique de otra manera en la presente descripción o que el contexto lo contradiga claramente de otra manera. El uso de cualquiera y de todos los ejemplos, o de lenguaje ilustrativo (por ejemplo, “tal como”) proporcionados en la presente descripción, sólo tiene la intención de aclarar mejor la invención y no plantea una limitación en el alcance de la invención a menos que se declare de cualquier otra manera. De ninguna manera el lenguaje en la descripción debe interpretarse como indicación de cualquier elemento no reivindicado esencial para la práctica de la invención.

La presente enseñanza se refiere a compuestos o agentes de unión a la Seprasa tales como péptidos de unión a la Seprasa o agentes que comprenden uno o más péptidos de unión a la Seprasa.

La Seprasa, también conocida como proteína alfa de activación de fibroblastos (FAPα) o gelatinasa unida a la membrana de melanoma de 170 kDa, es una proteína que en los humanos está codificada por el gen FAP. La proteína es una serina peptidasa de membrana integral, que se ha demostrado que tiene actividad gelatinasa.

La Seprasa parece actuar como un homodímero activo proteolíticamente de 170 kDa, que consiste de dos subunidades de 97 kDa. Es un miembro del grupo de serina proteasas integrales tipo II, que incluye dipeptidil peptidasa IV (DPP IV/CD26) y prolil serina peptidasas transmembrana de tipo II relacionadas, que ejercen sus mecanismos de acción sobre la superficie celular. La Seprasa es un miembro de la subfamilia prolil oligopeptidasa S9B. Otros miembros de la subfamilia S9B son DPP IV, DPP8 y DPP9.

La Seprasa se relaciona más estrechamente con la DPP IV y comparten aproximadamente el 50 % de sus aminoácidos. La DPP IV y la Seprasa presentan múltiples funciones debido a su capacidad para formar complejos entre sí e interactuar con otras moléculas asociadas a la membrana.

La Seprasa tiene una doble función en la progresión tumoral. Se ha demostrado que la actividad proteolítica de la Seprasa promueve la invasividad celular hacia la matriz extracelular y, además, sustenta el crecimiento y la proliferación de tumores. Se expresa selectivamente en los fibroblastos estromales reactivos de los cánceres epiteliales, el tejido de granulación de la cicatrización de heridas y las células malignas de los sarcomas de huesos y los tejidos blandos. La expresión de la Seprasa se observa en fibroblastos estromales activados de más del 90 % de todos los carcinomas humanos. Los fibroblastos estromales juegan un papel importante en el desarrollo, crecimiento y metástasis de los carcinomas.

De acuerdo con la enseñanza, el término "Seprasa" se refiere, preferentemente, a la Seprasa humana.

Preferentemente, el término "Seprasa" se refiere a un ácido nucleico que comprende, preferentemente, que consiste en la secuencia de ácido nucleico de SEQ ID NO: 1 o 2 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de ácido nucleico y a una proteína codificada por este ácido nucleico, preferentemente, a una proteína que comprende, preferentemente, que consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 3 o 4 del listado de secuencias o una variante de dicha secuencia de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos de la Seprasa predice una proteína de membrana integral de tipo II con una cola citoplasmática de 6 aminoácidos, seguida de un dominio transmembrana de 20 aminoácidos y un dominio extracelular de 734 aminoácidos. El carboxilo terminal contiene una supuesta región catalítica (~200 aminoácidos) que es homóloga (68 % de identidad) a la de la serina proteasa dipeptidil peptidasa IV no clásica (DPP IV). El motivo conservado de serina proteasa G-X-S-X-G se presenta como G-W-S-Y-G.

La Seprasa se expresa en cánceres de diversos orígenes, tales como cáncer de mama, cáncer de pulmón o pulmonar, por ejemplo, carcinoma de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), cáncer colorrectal, cáncer de colon, cáncer de esófago, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de conductos biliares, cáncer de páncreas, cáncer de riñón, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de vejiga, cáncer de endometrio o cáncer de próstata. La Seprasa es un objetivo valioso para el diagnóstico, la prevención y/o el tratamiento de tumores primarios y metástasis.

Un agente de unión a la Seprasa de la enseñanza tiene la capacidad de unirse a la Seprasa, es decir, la capacidad de unirse a un epítopo presente en la Seprasa, preferentemente, un epítopo ubicado dentro de los dominios extracelulares de la Seprasa, en particular las posiciones de aminoácidos 27 a 760 de la Seprasa. En modalidades particulares, un agente de unión a la Seprasa de la enseñanza se une a un epítopo en la Seprasa que no se presenta en la DPP IV.

Un agente de unión a la Seprasa se une, preferentemente, a la Seprasa, pero no a la DPP IV. Preferentemente, un agente de unión a la Seprasa es específico para la Seprasa. Preferentemente, un agente de unión a la Seprasa se une a la Seprasa expresada sobre la superficie celular. En particular, en modalidades preferidas, un agente de unión a la Seprasa se une a los epítopos nativos de la Seprasa presente en la superficie de células vivas.

El término "epítopo" se refiere a una parte o porción en una molécula que es reconocida por un agente de unión. Por ejemplo, los epítopos son los sitios discretos tridimensionales en una molécula, que son reconocidos por un agente de unión. Los epítopos usualmente consisten en agrupaciones de moléculas de superficie químicamente activas tales como los aminoácidos o cadenas laterales de azúcares y tienen usualmente características específicas de estructura tridimensional, así como también características específicas de carga. Los epítopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en que la unión al primero pero no al último se pierde en presencia de disolventes desnaturalizantes. Un epítopo de una proteína comprende, preferentemente, una porción continua o discontinua de dicha proteína y tiene, preferentemente, entre 5 y 100, preferentemente, entre 5 y 50, con mayor preferencia, entre 8 y 30, con la máxima preferencia, entre 10 y 25 aminoácidos de longitud, por ejemplo, el epítopo puede tener, preferentemente, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 o 25 aminoácidos de longitud.

De acuerdo con la enseñanza, el término "agente de unión a la Seprasa" o "compuesto de unión a la Seprasa" incluye cualquier compuesto (incluidos los complejos de moléculas) que tenga una capacidad de unión a la Seprasa. Preferentemente, dicho agente de unión es o comprende al menos un péptido de unión a la Seprasa de la enseñanza. Si un agente de unión a la Seprasa comprende al menos dos péptidos de unión a la Seprasa de la enseñanza (que pueden ser idénticos o diferentes), estos péptidos pueden asociarse covalentemente o no covalentemente (es decir, unirse). Los agentes de unión a la Seprasa pueden comprender uno o más péptidos de unión a la Seprasa asociados covalentemente o no covalentemente a cualquier otro compuesto o resto tales como marcadores o restos efectores terapéuticos.

De acuerdo con la presente enseñanza, un agente es capaz de unirse a un objetivo predeterminado tal como la Seprasa si tiene una afinidad significativa por dicho objetivo predeterminado y se une a dicho objetivo predeterminado en ensayos estándar. La "afinidad" o "afinidad de unión" a menudo se mide por la constante de disociación en equilibrio (K_D). Preferentemente, el término "afinidad significativa" se refiere a la unión a un objetivo predeterminado con una constante de disociación (K_D) de 10^{-5} M o inferior, 10^{-6} M o inferior, 10^{-7} M o inferior, 10^{-8} M o inferior, 10^{-9}M o inferior, 10^{-10} M o inferior, 10^{-11} M o inferior, o 10^{-12} M o inferior.

Un agente no es (esencialmente) capaz de unirse a un objetivo si no tiene una afinidad significativa por dicho objetivo y no se une significativamente, en particular no se une de manera detectable, a dicho objetivo en ensayos estándar. Preferentemente, el agente no se une de manera detectable a dicho objetivo si se presenta en una concentración de hasta 2, preferentemente, 10, con mayor preferencia, 20, en particular, 50 o 100 µg/ml o superior. Preferentemente, un agente no tiene afinidad significativa por un objetivo si se une a dicho objetivo con una K_D que es al menos 10 veces, 10^2 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, o 10^6 veces más alta que la K_D para unirse al objetivo predeterminado al cual el agente es capaz de unirse. Por ejemplo, si la K_D para la unión de un agente al objetivo al cual el agente es capaz de unirse es 10^{-7} M, la K_D para la unión a un objetivo por el cual el agente no tiene afinidad significativa será, al menos, 10^{-6}M, 10^{-5} M, 10^{-4} M, 10^{-3} M, 10^{-2} M, o 10^{-1} M.

De acuerdo con la enseñanza, el término "unión" se refiere, preferentemente, a una unión específica.

"Unión específica" significa que un agente se une más fuertemente a un objetivo para el cual es específico en comparación con la unión a otro objetivo. Un agente se une más fuertemente a un primer objetivo en comparación con un segundo objetivo si se une al primer objetivo con una constante de disociación (K_D) que es inferior que la constante de disociación para el segundo objetivo. Preferentemente, la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual se une específicamente el agente es más de 10^2 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces, 10^7 veces, 10^8 veces, 10^9 veces, o 10^{10} veces inferior que la constante de disociación (K_D) para el objetivo al cual el agente no se une específicamente.

Preferentemente, un agente es específico para un objetivo predeterminado si es capaz de unirse a dicho objetivo predeterminado mientras que no es capaz de unirse a otros objetivos, es decir, no tiene afinidad significativa por otros objetivos y no se une significativamente a otros objetivos en ensayos estándar. De acuerdo con la enseñanza, un agente es específico para la Seprasa si es capaz de unirse a la Seprasa pero no es (sustancialmente) capaz de unirse a otros objetivos tales como la DPP IV. Preferentemente, un agente es específico para la Seprasa si la afinidad por y la unión a tales otros objetivos no excede significativamente la afinidad por o la unión a proteínas no relacionadas con la Seprasa tales como albúmina de suero bovino (BSA), caseína, albúmina de suero humano (HSA) o proteínas transmembrana que no son la Seprasa, tales como moléculas del MHC o receptor de transferrina o cualquier otro polipéptido especificado. Preferentemente, un agente es específico para un objetivo predeterminado si se une a dicho objetivo con una K_D que es al menos 10^2 veces, 10^3 veces, 10^4 veces, 10^5 veces, 10^6 veces, 10^7 veces, 10^8 veces, 10^9 veces, o 10^{10} veces inferior que la K_D para unirse a un objetivo para el cual no es específico.

La unión de un agente a un objetivo puede determinarse experimentalmente mediante el uso de cualquier método adecuado; ver, por ejemplo, Berzofsky y otros, "Antibody-Antigen Interactions" en Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press Nueva York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company Nueva York, N Y (1992), y los métodos que se describen en la presente descripción. Las afinidades pueden determinarse fácilmente mediante el uso de técnicas convencionales, tales como por diálisis de equilibrio; mediante el uso de la analítica de resonancia de plasmones de superficie (por ejemplo BIAcore), mediante el uso de los procedimientos generales delineados por el fabricante; por radioinmunoensayo mediante el uso del antígeno objetivo radiomarcado; o mediante otro método conocido por el experto en la técnica. Los datos de afinidad pueden analizarse, por ejemplo, mediante el método de Scatchard y otros, Ann N.Y. Acad. ScL, 51:660 (1949). La afinidad medida de una interacción particular puede variar

si se mide en condiciones diferentes, por ejemplo, concentración de sal, pH. Por lo tanto, las mediciones de la afinidad y otros parámetros de unión, por ejemplo, K_D, IC_{50}, se realizan, preferentemente, con soluciones estandarizadas del agente de unión y el objetivo, y un tampón estandarizado.

De acuerdo con la enseñanza, el término "cáncer positivo a la Seprasa" o términos similares significa un cáncer que involucra o se asocia con la Seprasa, en particular un cáncer que involucra células que expresan la Seprasa, preferentemente, sobre la superficie de dichas células.

De acuerdo con la enseñanza, un cáncer involucra o se asocia con la Seprasa si la Seprasa se une espacialmente a dicho cáncer, en particular, si la Seprasa se presenta en dicho cáncer. Preferentemente, un cáncer que implica o se asocia con la Seprasa contiene células que expresan la Seprasa, preferentemente, sobre la superficie de dichas células. Dichas células pueden ser células cancerosas o células que se asocian con el cáncer, tales como los fibroblastos, en particular los fibroblastos asociados al cáncer.

"Superficie celular" se usa de acuerdo con su significado normal en la técnica, y por lo tanto, incluye el exterior de la célula que es accesible a la unión por las proteínas y otras moléculas.
Una Seprasa se expresa sobre la superficie de las células si se ubica sobre la superficie de dichas células y es accesible a la unión mediante agentes específicos para la Seprasa añadidos a las células.

El término "dominio extracelular" en el contexto de la presente enseñanza se refiere a una porción de una molécula, tal como una proteína ubicada hacia el espacio extracelular de una célula y, preferentemente, es accesible desde el exterior de dicha célula, por ejemplo, por agentes de unión tales como anticuerpos localizados en el exterior de la célula. Preferentemente, el término se refiere a uno o más lazos extracelulares o dominios o un fragmento de estos.

Los términos "parte" o "fragmento" se usan indistintamente en la presente descripción y se refieren a un elemento continuo. Una parte o fragmento de una secuencia de proteína comprende, preferentemente, al menos 6, en particular, al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos de la secuencia proteica.

El término "porción" se refiere a un elemento continuo y/o no continuo. Una porción de una secuencia de proteína comprende, preferentemente, al menos 6, en particular, al menos 8, al menos 12, al menos 15, al menos 20, al menos 30, al menos 50 o al menos 100 aminoácidos consecutivos y/o no consecutivos de la secuencia de proteína.

De acuerdo con la enseñanza, la Seprasa no se expresa (sustancialmente) en una célula si el nivel de expresión está por debajo del límite de detección y/o si el nivel de expresión es demasiado bajo para permitir la unión de los agentes de unión específicos para la Seprasa añadidos a las células.

De acuerdo con la enseñanza, la Seprasa se expresa en una célula si el nivel de expresión está por encima del límite de detección y/o si el nivel de expresión es suficientemente alto para permitir la unión de los agentes de unión específicos para la Seprasa añadidos a la célula. Preferentemente, la Seprasa que se expresa en una célula se expresa o expone sobre la superficie de dicha célula.

Un nudo de cistina es un motivo estructural proteico que contiene al menos tres puentes disulfuro (formados a partir de pares de moléculas de cisteína). Comprende un anillo incorporado formado por dos enlaces disulfuro y sus segmentos de cadena principal de conexión que se enhebran mediante un tercer enlace disulfuro. Esta estructura se asocia, preferentemente, con una estructura de lámina beta. Los péptidos que contienen un nudo de cistina tienen, preferentemente, 25-60, preferentemente, 25-50 o 25-40 residuos de aminoácidos de longitud.

Los nudos de cistina se encuentran en muchos péptidos o proteínas en muchas especies y proporcionan una estabilidad estructural considerable. Existen tres tipos de nudos de cistina, que difieren en la topología de los enlaces disulfuro: Nudo de cistina del factor de crecimiento (GFCK), nudo de cistina inhibidor (ICK) y nudo de cistina cíclico, o ciclótido.

Un nudo de cistina inhibidor (ICK) o knotina es un motivo estructural de proteínas que contiene tres puentes disulfuro. Junto con las secciones de polipéptido entre ellos, dos disulfuros (que unen la primera y cuarta cisteína y la segunda y quinta cisteína, respectivamente) forman un lazo a través del cual pasa el tercer enlace disulfuro (que une la tercera y sexta cisteína en la secuencia), lo que forma un nudo. El motivo es común en las toxinas de invertebrados, tales como las de los arácnidos y los moluscos. El motivo se encuentra, además, en algunas proteínas inhibidoras encontradas en las plantas.

Por lo tanto, de acuerdo con la enseñanza, un motivo ICK involucra dos segmentos de la cadena principal intracisteína y sus enlaces disulfuro de conexión, CysI-CysIV y CysII-CysV, que forman un anillo que es penetrado por el tercer enlace disulfuro, CysIII-CysVI.

El motivo ICK es similar al nudo de cistina cíclico o ciclótido, pero carece de la ciclación de la cadena principal del polipéptido que se presenta en la última familia. El nudo de cistina del factor de crecimiento (GFCK) comparte el motivo,

pero su topología es de manera que es el enlace entre la primera y la cuarta cisteína el que se enhebra a través del lazo (formado entre la segunda y quinta cisteína y la tercera y sexta cisteína, respectivamente).

Los ciclótidos se dividen en dos subfamilias estructurales principales. Los ciclótidos de Moebius, los menos comunes de los dos, contienen una cis-prolina en el lazo 5 que induce un giro de la cadena principal local de 180 °, mientras que los ciclótidos de brazalete no. Los ciclótidos inhibidores de la tripsina se clasifican en su propia familia en base a la variación de secuencia y la actividad natural. Los ciclótidos inhibidores de la tripsina son más homólogos a una familia de inhibidores de la tripsina no cíclicos de plantas de calabaza conocidas como knotinas o nudos de cistina inhibidores que a los otros ciclótidos.

MCoTI-I y MCoTI-II son polipéptidos naturales de las semillas de la calabaza amarga espinosa Momordica cochinchinensis. Estos polipéptidos son inhibidores de las proteasas similares a la tripsina y contienen un lazo adicional que conecta el amino terminal y el carboxi terminal y una disposición anudada de tres enlaces disulfuro conservados. El nudo de cistina se define por tres enlaces disulfuro intramoleculares, donde CysICysIV y CysII-CysV de la secuencia de péptido lineal forman un anillo que es penetrado por el tercer enlace disulfuro, CysIII-CysVI. Esta disposición proporciona un andamio bien definido y extremadamente estable que presenta una extraordinaria estabilidad térmica y proteolítica. Debido a la similitud estructural y la actividad biológica común, es decir, la inhibición de las proteasas de la familia de la tripsina, MCoTI-I y MCoTI-II se han agrupado en la familia de nudos de cistina inhibidores (ICK) de la calabaza de inhibidores pequeños de proteasa. Los miembros de esta familia son moléculas de cadena abierta que forman una pequeña lámina β de triple cadena y una hélice corta 3_{10}, que se mantienen unidas mediante tres enlaces disulfuro intramoleculares para dar lugar a una armazón de nudo de cistina. MCoTI-I y MCoTI-II son los únicos miembros conocidos de la gran familia de inhibidores de la calabaza que son cíclicos. Se han sintetizado variantes de cadena abierta de MCoTI-II que carecen del lazo de ciclación.

De acuerdo con la enseñanza, los péptidos descritos en la presente descripción pueden producirse sintéticamente mediante métodos de síntesis química los cuales se conocen bien en la técnica, tanto como un péptido aislado o como parte de otro péptido o polipéptido. Alternativamente, un péptido puede producirse en un microorganismo que produce el péptido el cual después se aísla y, si se desea, se purifica posteriormente. De esta forma, el péptido puede producirse en microorganismos tales como bacterias, levaduras, u hongos; en células eucariotas tales como células de mamífero o de insecto; o en un vector de virus recombinante tal como adenovirus, poxvirus, herpesvirus, virus del bosque de Semliki, baculovirus, bacteriofago, virus sindbis, o virus sendai. Las bacterias adecuadas para producir el péptido incluyen Escherichia coli, Bacillus subtilis, o cualquier otra bacteria que sea capaz de expresar péptidos. Los tipos de levaduras adecuadas para expresar el péptido incluyen, pero no se limitan a, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Candida, o cualquier otra levadura capaz de expresar péptidos. Los métodos para el uso de las bacterias, vectores virales recombinantes, células eucariotas, para producir péptidos se conocen bien en la técnica.

Para producir un péptido, el ácido nucleico que codifica el péptido está preferentemente en un plásmido y el ácido nucleico se une operativamente a un promotor que efectúa la expresión del péptido en un microorganismo. Los promotores adecuados incluyen, pero no se limitan a, promotor del fago T7, promotor del fago T3, promotor de la β-galactosidasa, y el promotor del fago Sp6. Los métodos para aislar y purificar péptidos se conocen bien en la técnica e incluyen métodos tales como filtración en gel, cromatografía de afinidad, cromatografía de intercambio iónico, o centrifugación.

Los péptidos de la enseñanza, tanto por sí solos o como parte de un péptido de fusión, pueden conjugarse a un péptido o proteína heterólogos. Dichas proteínas heterólogas incluyen, pero no se limitan a, proteínas portadoras tales como albúmina de suero bovino (BSA), y enzimas indicadoras que incluyen, pero no se limitan a, peroxidasa de rábano o fosfatasa alcalina. Además, los péptidos o péptidos de fusión que comprenden el péptido pueden conjugarse químicamente a moléculas indicadoras fluorescentes que incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína o R-ficoeritrina. Los métodos para conjugar proteínas portadoras, enzimas, y moléculas indicadoras fluorescentes a péptidos y péptidos de fusión se conocen bien en la técnica.

Para facilitar el aislamiento del péptido, puede producirse un polipéptido de fusión en donde el péptido se fusiona traduccionalmente (se une covalentemente) a una etiqueta heteróloga tal como un polipéptido o polihistidina heterólogos, preferentemente seis residuos de histidina, lo que permite la recuperación simplificada del polipéptido de fusión, por ejemplo, su aislamiento por cromatografía de afinidad o cromatografía de afinidad a metal, preferentemente, cromatografía de afinidad por níquel. En algunos casos, puede ser conveniente eliminar la etiqueta después de la purificación. Por lo tanto, se contempla, además, que el polipéptido de fusión comprende un sitio de escisión en la unión entre el péptido y la etiqueta heteróloga. El sitio de corte consiste en una secuencia de aminoácidos que se corta con una enzima específica para la secuencia de aminoácidos en el sitio.

Los agentes de unión a la Seprasa descritos en la presente descripción pueden usarse en ensayos para analizar la presencia o cantidad de la Seprasa o anticuerpos de la Seprasa. Dichos ensayos pueden llevarse a cabo en una serie de formas, que incluyen, pero no se limitan a, inmunodetección, e incluyen ELISA, en particular ELISA de péptidos, ensayos de unión competitiva y RIA. Los métodos de la enseñanza permiten evaluaciones cuantitativas y/o cualitativas, por ejemplo, evaluaciones absolutas y/o relativas, de la Seprasa o anticuerpos de la Seprasa.

En general, los ensayos se realizan mediante el uso de una modalidad del ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA).

El término "ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas o ELISA", como se usa en la presente descripción, se refiere a un método para determinar cuantitativamente o semicuantitativamente las concentraciones de proteína de una muestra, por ejemplo, plasma sanguíneo, suero o extractos de célula/tejido, en un formato de placa de múltiples pocillos (usualmente 96 pocillos por placa). En general, las proteínas en solución se adsorben a las placas ELISA. Los anticuerpos específicos para la proteína de interés pueden usarse para sondear la placa. El fondo se minimiza por optimización de los métodos de bloqueo y lavado (como para IHC), y la especificidad se asegura mediante la presencia de controles positivos y negativos. Los métodos de detección son usualmente colorimétricos o basados en quimioluminiscencia.

Puede proporcionarse una placa de microtitulación que contiene una pluralidad de pocillos en donde un primer pocillo o serie de pocillos contiene un anticuerpo monoclonal contra la Seprasa inmovilizado a la superficie de este. Puede añadirse una muestra a los pocillos que contienen el anticuerpo monoclonal unido. La Seprasa en la muestra se une al anticuerpo monoclonal. El ELISA se incuba durante un tiempo suficiente para que se formen los complejos con el anticuerpo. Puede añadirse adicionalmente un péptido de la enseñanza. El péptido puede ser parte de un polipéptido de fusión. A continuación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier material no unido. Los pocillos pueden luego incubarse con un anticuerpo marcado o un anticuerpo conjugado a una molécula indicadora que se une al polipéptido de fusión para formar un complejo que puede detectarse. Una señal detectable del marcador o indicador indica que la muestra contiene la Seprasa mientras que la ausencia de una señal puede indicar que la muestra no contiene la Seprasa. Cuando el polipéptido de fusión comprende un marcador o molécula indicadora tal como una enzima indicadora tal como fosfatasa alcalina, el complejo de anticuerpo puede detectarse directamente sin la necesidad de un anticuerpo marcado.

Alternativamente, puede proporcionarse una placa de microtitulación que contiene una pluralidad de pocillos en donde un primer pocillo o serie de pocillos contiene el péptido de la enseñanza, que puede conjugarse a una proteína portadora o polipéptido de fusión, inmovilizado a la superficie de estos. La muestra puede añadirse a los pocillos que contienen los péptidos unidos. La Seprasa en la muestra y el péptido unido a las superficies de los pocillos se incuban durante un tiempo suficiente para que se formen complejos. A continuación, los pocillos se lavan para eliminar cualquier material no unido. La cantidad de Seprasa que se une a los péptidos inmovilizados en el pocillo se determina mediante la incubación de los pocillos con un anticuerpo marcado o un anticuerpo conjugado a una molécula indicadora que se une a la Seprasa para formar un complejo que puede detectarse. Una señal detectable del indicador indica que la muestra contiene la Seprasa, mientras que la ausencia de una señal indica que la muestra no contiene la Seprasa. La intensidad de la señal puede proporcionar un estimado de la concentración de la Seprasa en la muestra.

De acuerdo con la enseñanza, la Seprasa que va a analizarse puede expresarse en la superficie de una célula.

Los péptidos de la enseñanza pueden usarse, además, en métodos para detectar la presencia de anticuerpos contra la Seprasa. El diseño de inmunoensayos adecuados para poner en práctica estos métodos puede estar sujeto a mucha variación, y una variedad de estos inmunoensayos se conocen en la técnica. Los protocolos adecuados de inmunoensayos pueden basarse, por ejemplo, en ensayos de competencia, o reacción directa, o tipo sándwich. Los protocolos de inmunoensayos que se usan pueden también, por ejemplo, usar soportes sólidos, o pueden ser por inmunoprecipitación. Los ensayos pueden involucrar el uso de anticuerpos marcados y los marcadores pueden ser, por ejemplo, fluorescentes, quimioluminiscentes, radiactivos, o moléculas colorantes. Los ensayos particulares preferidos son los inmunoensayos marcados y mediados por enzimas, tal como los ensayos ELISA.

En consecuencia, los péptidos pueden usarse, además, en un ensayo tal como un ensayo ELISA para determinar el anticuerpo contra la Seprasa en una muestra. Para este propósito, los pocillos de las placas de ELISA pueden recubrirse con los péptidos. La Seprasa y el péptido unido a las superficies de los pocillos pueden incubarse durante un tiempo suficiente para que se formen complejos. Posteriormente, puede añadirse una muestra tal como plasma y puede realizarse la detección de los anticuerpos específicos de la Seprasa (anticuerpo primario) con un anticuerpo secundario marcado dirigido contra el anticuerpo primario.

Cuando se usa como un reactivo de ensayo como se describe en la presente descripción, un péptido de la enseñanza puede conjugarse a un marcador.

De acuerdo con la enseñanza, un marcador es cualquier entidad cuya presencia puede detectarse fácilmente. Preferentemente, el marcador es un marcador directo. Los marcadores directos son entidades que, en su estado natural, son visibles fácilmente tanto a simple vista, o con la ayuda de un filtro óptico y/o estimulación aplicada, por ejemplo, luz UV para generar fluorescencia. Los ejemplos incluyen compuestos radiactivos, quimioluminiscentes, electroactivos (tales como marcadores redox), y fluorescentes. Los marcadores de partículas directos, tales como soles de colorantes, soles metálicos (por ejemplo oro) y partículas de látex coloreadas, son también muy adecuados y son, junto con los compuestos fluorescentes, los preferidos. De estas opciones, las partículas de látex coloreadas y los compuestos fluorescentes son los de mayor preferencia. La concentración del marcador en una zona o volumen pequeño debe originar una señal fácilmente detectable, por ejemplo un área coloreada fuertemente. Los marcadores indirectos, tales como enzimas, por ejemplo, la fosfatasa alcalina y la peroxidasa de rábano picante, pueden usarse también, aunque estas requieren

usualmente la adición de uno o más reactivos reveladores tales como los sustratos antes que pueda detectarse una señal visible.

De acuerdo con la enseñanza, un marcador puede funcionar para: (i) proporcionar una señal detectable; (ii) interactuar con un segundo marcador para modificar la señal detectable proporcionada por el primer o el segundo marcador, por ejemplo, FRET (transferencia de energía por resonancia de fluorescencia); (iii) afectar la movilidad, por ejemplo, la movilidad electroforética, mediante carga, hidrofobicidad, forma, u otros parámetros físicos; o (iv) proporcionar un resto de captura, por ejemplo, de afinidad, anticuerpo/antígeno, o formación de complejos iónicos. Adecuados como marcadores son las estructuras, tales como marcadores fluorescentes, marcadores luminiscentes, marcadores cromóforos, marcadores radioisotópicos, marcadores isotópicos, preferentemente, marcadores isotópicos estables, marcadores isobáricos, marcadores enzimáticos, marcadores de partículas, en particular marcadores de partículas metálicas, marcadores de partículas magnéticas, marcadores de partículas poliméricas, moléculas orgánicas pequeñas tales como biotina, ligandos de receptores o de moléculas de unión tales como proteínas de adhesión celular o lecitinas, secuencias de marcadores que comprenden ácidos nucleicos y/o residuos de aminoácidos que pueden detectarse mediante el uso de agentes de unión, etcétera. Los marcadores comprenden, en una manera no limitante, sulfato de bario, ácido iocetámico, ácido iopanoico, ipodato de calcio, diatrizoato de sodio, diatrizoato de meglumina, metrizamida, tiropanoato de sodio y de radiodiagnóstico, lo que incluye los emisores de positrones tales como flúor-18 y carbono-11, emisores gamma tales como yodo-123, tecnecio-99m, yodo-131 e indio-111, núclidos para resonancia magnética nuclear, tales como flúor y gadolinio. En modalidades preferidas, un marcador comprende un radionúclido tal como lutecio-177 o galio-68 que puede formar un complejo con un ligando tal como DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) unido a un agente de unión a la Seprasa.

La conjugación del marcador al péptido de la enseñanza puede ser mediante enlace covalente o no covalente (que incluye hidrofóbico), o por adsorción. Las técnicas para tal conjugación son comunes en la técnica y pueden adaptarse fácilmente para los reactivos particulares que se emplean.

El término "muestra", como se usa en la presente descripción, incluye cualquier muestra biológica que puede aislarse de un paciente y usarse para propósitos de análisis. Dicha muestra puede ser una muestra de fluido corporal, una muestra de tejido, o una muestra celular. Por ejemplo, las muestras abarcadas por la presente enseñanza son muestras de tejidos (por ejemplo, corte histológico o explante), muestras de células individuales, muestras de colonias celulares, muestras de cultivo celular, muestras sanguíneas (por ejemplo, sangre total o fracción de sangre tal como fracción de células sanguíneas, suero o plasma), muestras de orina, o muestras de otras fuentes periféricas. Dichas muestras pueden mezclarse o combinarse, por ejemplo, una muestra puede ser una mezcla de una muestra sanguínea y muestra de orina. Dichas muestras pueden proporcionarse mediante la extracción de un fluido corporal, célula(s), colonias de células, un explante, o un corte histológico de un paciente, pero pueden también proporcionarse mediante el uso de una muestra aislada previamente. Por ejemplo, una muestra de tejido puede extraerse de un paciente mediante técnicas convencionales de biopsia o una muestra de sangre puede tomarse de un paciente mediante técnicas convencionales para colectar la sangre. La muestra, por ejemplo muestra de tejido o muestra sanguínea, puede obtenerse de un paciente previo al inicio del tratamiento terapéutico, durante el tratamiento terapéutico, y/o después del tratamiento terapéutico.

En una modalidad, la muestra es una muestra de fluido corporal. El término "muestra de fluido corporal", como se usa en la presente descripción, se refiere a cualquier muestra líquida derivada del cuerpo de un paciente. Dicha muestra de fluido corporal puede ser una muestra sanguínea, una muestra de orina, una muestra de esputo, una muestra de leche materna, muestra de fluido cerebroespinal (CSF), muestra de cerumen (cera de los oídos), muestra de endolinfa, muestra de perilinfa, muestra de jugo gástrico, muestra de moco, muestra de fluido peritoneal, muestra de fluido pleural, muestra de saliva, muestra de sebo (aceite de la piel), muestra de semen, muestra de sudor, muestra de lágrimas, muestra de secreción vaginal, o muestra de vómito que incluye componentes o sus fracciones. Dichas muestras de fluidos corporales pueden mezclarse o combinarse. Por lo tanto, una muestra de fluido corporal puede ser una mezcla de una muestra de sangre y orina o una mezcla de una muestra de sangre y fluido cerebroespinal. Dicha muestra de fluido corporal puede proporcionarse mediante la extracción de un líquido corporal de un paciente, pero también puede proporcionarse mediante el uso de material de muestra de fluido corporal previamente aislado. En una modalidad preferida, la muestra es una muestra de sangre entera o una muestra de fracción de sangre tal como una fracción de células de la sangre, suero de la sangre, o muestra de plasma de la sangre.

En una modalidad, una muestra biológica es una muestra obtenida de un tejido sospechoso de estar afectado por una enfermedad tal como el cáncer. En una modalidad, una muestra biológica es una muestra tumoral, por ejemplo, una muestra obtenida de un tumor y que comprende células tumorales. De acuerdo con la enseñanza, el término "muestra biológica" incluye, además, muestras biológicas procesadas tales como fracciones o aislados de muestras biológicas, por ejemplo, ácidos nucleicos y aislados de péptidos/proteínas.

De acuerdo con la enseñanza, puede usarse una "referencia", tal como una muestra de referencia o un organismo de referencia, para correlacionar y comparar los resultados obtenidos en los métodos de la enseñanza de una muestra de prueba u organismo de prueba, es decir, un paciente. Típicamente, el organismo de referencia es un organismo sano, en particular, un organismo que no padece de una enfermedad tumoral.

Un "valor de referencia" o "nivel de referencia" puede determinarse empíricamente a partir de una referencia mediante la medición de una cantidad suficientemente grande de referencias. Preferentemente, el valor de referencia se determina mediante la medición de al menos 2, preferentemente, al menos 3, preferentemente, al menos 5, preferentemente, al menos 8, preferentemente, al menos 12, preferentemente, al menos 20, preferentemente al menos 30, preferentemente, al menos 50, o preferentemente, al menos 100 referencias.

Como se usa en la presente descripción, "reducir", "disminuir" o "inhibir" significa una disminución global o la capacidad para causar una disminución global, preferentemente, de 5 % o mayor, 10 % o mayor, 20 % o mayor, con mayor preferencia, de 50 % o mayor, y con la máxima preferencia, de 75 % o mayor, en el nivel, por ejemplo, en el nivel de expresión o en el nivel de proliferación de las células. La cantidad de una sustancia se reduce, además, en una muestra de prueba, tal como en una muestra biológica, en comparación con una muestra de referencia si es detectable en la muestra de prueba, pero está ausente o no es detectable en la muestra de prueba.

Los términos tales como "aumentar" o "potenciar", preferentemente, se refieren a un aumento o potenciación de aproximadamente al menos un 10 %, preferentemente, al menos 20 %, preferentemente, al menos 30 %, con mayor preferencia, al menos 40 %, con mayor preferencia, al menos 50 %, aún con mayor preferencia, al menos 80 %, y con la máxima preferencia, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10 000 % o incluso más. La cantidad de una sustancia se aumenta, además, en una muestra de prueba, tal como en una muestra biológica, en comparación con una muestra de referencia si es detectable en la muestra de prueba, pero está ausente o no es detectable en la muestra de referencia.

Los agentes de unión a la Seprasa tales como péptidos de la enseñanza pueden unirse a un soporte sólido, por ejemplo, la superficie de un pocillo de inmunoensayo o de una tira reactiva, y/o empacarse en kits en un contenedor adecuado junto con reactivos, controles o instrucciones adecuadas.

En consecuencia, la presente enseñanza proporciona, además, un kit que comprende al menos un agente de unión a la Seprasa de la presente enseñanza. En una modalidad preferida, el kit además comprende al menos un agente adicional tal como uno o más reactivos adecuados para realizar un inmunoensayo, un control, o instrucciones para el uso del kit.

De acuerdo con la enseñanza se proporciona, además, un dispositivo de ensayo que comprende al menos un agente de unión a la Seprasa de la presente enseñanza. En una modalidad, el dispositivo de ensayo se selecciona del grupo que consiste en un dispositivo de ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas.

Tal dispositivo puede tomar diferentes formas, y puede variar en dependencia de la naturaleza precisa del ensayo que se realiza. Por ejemplo, el péptido de la enseñanza puede recubrirse en un soporte sólido, típicamente, de nitrocelulosa u otro material poroso hidrofóbico. Alternativamente, el péptido puede recubrirse sobre un material plástico sintético, una placa de ensayo de microtitulación, un chip de microarreglo, una perla de látex, un filtro que comprende un material polimérico sintético o celulósico, un portaobjetos de vidrio o plástico, una tira reactiva, un dispositivo de llenado por capilaridad. El recubrimiento de los péptidos a estas superficies puede lograrse mediante métodos que se conocen en la técnica. Los portadores proteicos se usan típicamente para formar complejos, y los BSA o péptidos adhesivos son los más preferidos. En una modalidad, el péptido de la enseñanza se inmoviliza de manera liberable sobre el soporte sólido. En una modalidad preferida adicional, el péptido de la enseñanza se inmoviliza de forma no liberable sobre el soporte sólido.

Debe entenderse que los péptidos que se describen en la presente descripción pueden suministrarse a un paciente mediante la administración de un ácido nucleico tal como ARN que codifica al péptido y/o mediante la administración de una célula huésped que comprende un ácido nucleico tal como ARN que codifica al péptido. Por lo tanto, un ácido nucleico que codifica un péptido cuando se administra a un paciente puede presentarse en la forma desnuda o en un vehículo adecuado para el suministro tal como en la forma de liposomas o partículas virales, o dentro de una célula huésped. El ácido nucleico proporcionado puede producir el péptido en períodos de tiempo prolongados en una manera sostenida. Los ácidos nucleicos para suministrarse a un paciente pueden producirse por medios recombinantes. Si un ácido nucleico se administra a un paciente sin estar presente dentro de una célula huésped, es captado, preferentemente, por las células del paciente para la expresión del péptido codificado por el ácido nucleico. Si un ácido nucleico se administra a un paciente mientras está presente dentro de una célula huésped, es expresado, preferentemente, por la célula huésped dentro del paciente para producir el péptido codificado por el ácido nucleico.

El término "ácido nucleico", como se usa en la presente, pretende incluir ácido desoxirribonucleico (ADN) y ácido ribonucleico (ARN) tales como ADN genómico, ADNc, ARNm, producidos de manera recombinante y moléculas sintetizadas químicamente. Un ácido nucleico puede ser monocatenario o bicatenario. El ARN incluye transcritos in vitro de ARN (IVT ARN) o ARN sintético.

Como se usa en la presente descripción, el término "ARN" significa una molécula que comprende residuos de ribonucleótidos. Por "ribonucleótido" se entiende un nucleótido con un grupo hidroxilo en la posición 2' de un resto beta-D-ribofuranosa. El término incluye ARN bicatenario, ARN monocatenario, ARN aislado tales como ARN parcialmente purificado, ARN sustancialmente puro, ARN sintético o ARN producido recombinantemente, así como también ARN alterado que se diferencia del ARN de origen natural por la adición, deleción, sustitución y/o alteración de uno o más

nucleótidos. Dichas alteraciones pueden incluir la adición de material no nucleotídico, tal como al(los) extremo(s) de un ARN o internamente, por ejemplo, a uno o más nucleótidos del ARN. Los nucleótidos en las moléculas de ARN pueden comprender también nucleótidos no estándar, tales como nucleótidos que no son de origen natural o nucleótidos o desoxinucleótidos sintetizados químicamente. Estos ARN alterados pueden referirse como análogos o análogos de ARN de origen natural.

De acuerdo con la presente enseñanza, el término "ARN" incluye y se refiere, preferentemente, a "ARNm" que significa "ARN mensajero" y se refiere a un "transcripto" que puede producirse mediante el uso de ADN como molde y codifica un péptido o proteína. El ARNm comprende típicamente una región no traducida 5' (UTR 5'), una región que codifica la proteína o el péptido y una región no traducida 3' (UTR 3'). En una modalidad de la enseñanza, el ARN se obtiene por transcripción in vitro o síntesis química. Preferentemente, el ARNm se produce por transcripción in vitro mediante el uso de un molde de ADN. La metodología de la transcripción in vitro se conoce por la persona experta. Por ejemplo, existe una variedad de kits de transcripción in vitro disponibles de manera comercial.

Para aumentar la expresión y/o la estabilidad del ARN usado de acuerdo con la presente enseñanza, este puede modificarse, preferentemente, sin alterar la secuencia del péptido o la proteína expresados.

El término "modificación", en el contexto del ARN, como se usa de acuerdo con la presente enseñanza, incluye cualquier modificación del ARN que no se presenta naturalmente en dicho ARN.

En una modalidad de la enseñanza, el ARN utilizado de acuerdo con la enseñanza no tiene 5'-trifosfatos sin caperuza. La eliminación de tales 5'-trifosfatos sin caperuza puede lograrse al tratar el ARN con una fosfatasa.

El ARN de acuerdo con la enseñanza puede tener ribonucleótidos modificados de origen natural o sintéticos para aumentar su estabilidad y/o disminuir su citotoxicidad. Por ejemplo, en una modalidad, en el ARN usado de acuerdo con la enseñanza se sustituye parcialmente o completamente, preferentemente, completamente, la 5-metilcitidina por citidina. Alternativa o adicionalmente, en una modalidad, en el ARN usado de acuerdo con la enseñanza se sustituye parcialmente o completamente, preferentemente, completamente, la pseudouridina por uridina.

En una modalidad, el término "modificación" se refiere a proporcionar un ARN con una caperuza 5' o un análogo de la caperuza 5'. El término "caperuza 5'" se refiere a una estructura de caperuza que se encuentra en el extremo 5' de una molécula de ARNm y consiste, generalmente, en un nucleótido de guanosina que se conecta al ARNm a través de un enlace trifosfato inusual 5' a 5'. En una modalidad, esta guanosina se metila en la posición 7. El término "caperuza 5' convencional" se refiere a una caperuza 5' de ARN de origen natural, preferentemente, a la caperuza 7-metilguanosina (m7G). En el contexto de la presente enseñanza, el término "caperuza 5'" incluye un análogo de la caperuza 5' que se asemeja a la estructura de la caperuza de ARN y se modifica para que posea la capacidad de estabilizar el ARN si se une a este, preferentemente, in vivo y/o en una célula.

Proporcionar un ARN con una caperuza 5' o análogo de la caperuza 5' puede lograrse por transcripción in vitro de un molde de ADN en presencia de dicha caperuza 5' o análogo de la caperuza 5', en donde dicha caperuza 5' se incorpora cotranscripcionalmente a la cadena de ARN generada, o el ARN puede generarse, por ejemplo, por transcripción in vitro, y la caperuza 5' puede unirse al ARN de manera postranscripcional mediante enzimas que añaden la caperuza, por ejemplo, las enzimas que añaden la caperuza del virus vaccinia.

El ARN puede comprender modificaciones adicionales. Por ejemplo, una modificación adicional del ARN que se usa en la presente enseñanza puede ser una extensión o truncamiento de la cola de poli(A) de origen natural o una alteración de las regiones no traducidas (UTR) 5' o 3' tal como la introducción de una UTR que no se relaciona con la región codificante de dicho ARN, por ejemplo, la inserción de una o más, preferentemente, dos copias de una UTR 3' derivada de un gen de globina, tal como alfa2 globina, alfa1 globina, betaglobina, preferentemente, betaglobina, con mayor preferencia, betaglobina humana.

En el contexto de la presente enseñanza, el término "transcripción" se refiere a un proceso, en donde el código genético en una secuencia de ADN se transcribe a ARN. Posteriormente, el ARN puede traducirse en proteína. De acuerdo con la presente enseñanza, el término "transcripción" comprende "transcripción in vitro", en donde el término "transcripción in vitro" se refiere a un proceso en donde el ARN, en particular el ARNm, se sintetiza in vitro en un sistema libre de células, preferentemente, mediante el uso de extractos celulares apropiados. Preferentemente, los vectores de clonación se aplican para la generación de transcritos. Estos vectores de clonación se designan generalmente como vectores de transcripción y son abarcados, de acuerdo con la presente enseñanza, por el término "vector".

El término "traducción", de acuerdo con la enseñanza, se refiere al proceso en los ribosomas de una célula mediante el cual una cadena de ARN mensajero dirige el ensamblaje de una secuencia de aminoácidos para producir un péptido o proteína.

El término "expresión" se usa, de acuerdo con la enseñanza, en su significado más general y comprende la producción de ARN y/o péptidos o proteínas, por ejemplo, por transcripción y/o traducción. Con respecto al ARN, el término "expresión" o "traducción" se refiere en particular a la producción de péptidos o proteínas. Comprende también la

expresión parcial de ácidos nucleicos. Además, la expresión puede ser transitoria o estable. De acuerdo con la enseñanza, el término expresión incluye, además, una "expresión aberrante" o "expresión anormal".

De acuerdo con la enseñanza, "expresión aberrante" o "expresión anormal" significa que la expresión se altera, preferentemente, se aumenta, en comparación con una referencia, por ejemplo, un estado en un individuo que no tiene una enfermedad asociada con la expresión aberrante o anormal de una cierta proteína, por ejemplo, la Seprasa. Un aumento en la expresión se refiere a un aumento de al menos 10 %, en particular al menos 20 %, al menos 50 %, al menos 100 %, al menos 200 %, al menos 500 %, al menos 1000 %, al menos 10 000 % o más. En una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime.

El término "expresado específicamente" significa que una proteína se expresa esencialmente solo en un tejido u órgano específico. Por ejemplo, una proteína expresada específicamente en la mucosa gástrica significa que dicha proteína se expresa principalmente en la mucosa gástrica, y no se expresa en otros tejidos o no se expresa en un grado significativo en otros tipos de tejidos u órganos. Por lo tanto, una proteína que se expresa exclusivamente en las células de la mucosa gástrica y en un grado significativamente menor en cualquier otro tejido, tal como el testículo, se expresa específicamente en las células de la mucosa gástrica.

De acuerdo con la enseñanza, el término "ácido nucleico codificante" significa que el ácido nucleico, si se presenta en el ambiente apropiado, preferentemente, dentro de una célula, puede expresarse para producir una proteína o péptido que codifica.

Los ácidos nucleicos descritos de acuerdo con la descripción, se han aislado, preferentemente. El término "ácido nucleico aislado" significa de acuerdo con la descripción que el ácido nucleico se (i) amplificó in vitro, por ejemplo, mediante reacción en cadena de la polimerasa (PCR), (ii) se produjo recombinantemente mediante clonación, (iii) se purificó, por ejemplo, mediante escisión y fraccionamiento electroforético en gel, o (iv) se sintetizó, por ejemplo, mediante síntesis química. Un ácido nucleico aislado es un ácido nucleico que está disponible para su manipulación mediante técnicas de ADN recombinante.

El término "variante" con respecto a, por ejemplo, secuencias de ácido nucleico o aminoácidos, de acuerdo con la enseñanza, incluye cualesquiera variantes, en particular, mutantes, variantes de empalme, conformaciones, isoformas, variantes alélicas, variantes de especies y homólogos de especies, en particular aquellos que son de origen natural. Una variante alélica se refiere a una alteración en la secuencia normal de un gen, cuya relevancia frecuentemente no está clara. La secuenciación génica completa a menudo identifica numerosas variantes alélicas para un gen determinado. Un homólogo de especie es una secuencia de ácido nucleico o aminoácido con una especie de origen diferente de una secuencia determinada de un ácido nucleico o aminoácido.

Con respecto a las moléculas de ácido nucleico, el término "variante" incluye secuencias de ácido nucleico degeneradas, en donde un ácido nucleico degenerado de acuerdo con la enseñanza es un ácido nucleico que difiere de un ácido nucleico de referencia en la secuencia de codones debido a la degeneración del código genético.

Además, una "variante" de una secuencia de ácido nucleico específica de acuerdo con la enseñanza incluye secuencias de ácido nucleico que comprenden una o múltiples sustituciones, deleciones y/o adiciones de nucleótidos tales como al menos 2, al menos 4, o al menos 6 y, preferentemente, hasta 3, hasta 4, hasta 5, hasta 6, hasta 10, hasta 15, o hasta 20.

Preferentemente, el grado de identidad entre una secuencia de ácido nucleico dada y una secuencia de ácido nucleico que es una variante de dicha secuencia de ácido nucleico dada será al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. El grado de identidad está dado, preferentemente, para una región que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia del ácido nucleico de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de ácido nucleico de referencia consiste en 200 nucleótidos, el grado de similitud o de identidad se da, preferentemente, para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 nucleótidos, preferentemente, nucleótidos continuos. En modalidades preferidas, el grado de identidad está dado por la longitud completa de la secuencia del ácido nucleico de referencia.

"Identidad de secuencia" entre dos secuencias de ácido nucleico indica el porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de nucleótidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, obtenido después del mejor alineamiento, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de nucleótidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por

"ventana de comparación" para identificar y comparar las regiones locales con similitud de la secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, se divide este número entre el número de posiciones comparadas, y se multiplica el resultado obtenido por 100 de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Preferentemente, una secuencia de ácido nucleico dada y una secuencia de ácido nucleico que es una variante de dicha secuencia de ácido nucleico dada será capaz de hibridarse.

Un ácido nucleico es "capaz de hibridarse" o "se hibrida" con otro ácido nucleico si las dos secuencias son complementarias entre sí. Un ácido nucleico es "complementario" a otro ácido nucleico si las dos secuencias son capaces de formar un dúplex estable entre sí. De acuerdo con la enseñanza, la hibridación se lleva a cabo, preferentemente, en condiciones que permiten la hibridación específica entre polinucleótidos (condiciones rigurosas). Las condiciones rigurosas se describen, por ejemplo, en Molecular Cloning: A Laboratory Manual, J. Sambrook y otros, Editores, 2a Edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York, 1989 o Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel y otros, Editores, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York y se refieren, por ejemplo, a una hibridación a 65 °C en un tampón de hibridación (3,5 x SSC, Ficoll al 0,02 %, polivinilpirrolidona al 0,02 %, albúmina de suero bovino al 0,02 %, NaH_2PO_4 2,5 mM (pH 7), SDS al 0,5 %, EDTA 2 mM). SSC es cloruro de sodio 0,15 M/citrato de sodio 0,15 M, pH 7. Después de la hibridación, se lava la membrana a la que se ha transferido el ADN, por ejemplo, en 2 x SSC a temperatura ambiente y después en 0,1-0,5 x SSC/0,1 x SDS a temperaturas de hasta 68 °C.

Un porcentaje de complementariedad indica el porcentaje de residuos contiguos en una molécula de ácido nucleico que pueden formar enlaces de hidrógeno (por ejemplo, apareamiento de bases de Watson-Crick) con una segunda secuencia de ácido nucleico (por ejemplo, 5, 6, 7, 8, 9, 10 de 10 que son 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 % y 100 % complementarias). "Perfectamente complementario" o "completamente complementario" significa que todos los residuos contiguos de una secuencia de ácido nucleico se unirán por enlaces de hidrógeno con la misma cantidad de residuos contiguos en una segunda secuencia de ácido nucleico. Preferentemente, el grado de complementariedad de acuerdo con la enseñanza es al menos 70 %, preferentemente, al menos 75 %, preferentemente, al menos 80 %, con mayor preferencia, al menos 85 %, aún con mayor preferencia, al menos 90 % o con la máxima preferencia, al menos 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 %. Con la máxima preferencia, el grado de complementariedad de acuerdo con la enseñanza es del 100 %.

El término "derivado" comprende la formación de un derivado químico de un ácido nucleico en una base nucleótida, en el azúcar o en el fosfato. El término "derivado" comprende, además, ácidos nucleicos que contienen nucleótidos y análogos de nucleótidos que no son de origen natural. Preferentemente, la formación de un derivado de un ácido nucleico aumenta su estabilidad.

Los ácidos nucleicos pueden, de acuerdo con la enseñanza, presentarse solos o en combinación con otros ácidos nucleicos, en particular con ácidos nucleicos heterólogos. Preferentemente, un ácido nucleico que codifica un péptido o proteína expresa dicho péptido o proteína. En modalidades preferidas, un ácido nucleico se enlaza funcionalmente a secuencias de control de expresión o a secuencias reguladoras que pueden ser homólogas o heterólogas con respecto a dicho ácido nucleico. Una secuencia de codificación y una secuencia reguladora se unen "funcionalmente" entre sí, si se enlazan covalentemente entre sí de tal forma que la expresión o transcripción de dicha secuencia de codificación está bajo el control o bajo la influencia de dicha secuencia reguladora. Si la secuencia de codificación debe traducirse en una proteína funcional, entonces, con una secuencia reguladora unida funcionalmente a dicha secuencia de codificación, la inducción de dicha secuencia reguladora resulta en la transcripción de dicha secuencia de codificación, sin provocar un cambio de marco en la secuencia de codificación o sin que dicha secuencia de codificación pueda traducirse en la proteína o péptido deseado.

El término "secuencia de control de la expresión" o "secuencia reguladora" comprende, de acuerdo con la descripción, promotores, potenciadores y otros elementos de control que regulan la expresión de un gen. En modalidades particulares de la descripción, pueden regularse las secuencias de control de la expresión. La estructura exacta de las secuencias reguladoras puede variar en función de la especie o del tipo de célula, pero comprende, generalmente, secuencias 5' no transcritas y 5' no traducidas que se implican en el inicio de la transcripción y de la traducción, respectivamente, tales como la caja TATA, la secuencia caperuza, y la secuencia CAAT. Más específicamente, las secuencias reguladoras 5' no transcritas comprenden una región promotora que incluye una secuencia promotora para el control transcripcional del gen unido funcionalmente. Las secuencias reguladoras pueden comprender, además, secuencias potenciadoras o secuencias activadoras aguas arriba.

De acuerdo con la presente enseñanza, un ácido nucleico puede, además, estar presente en combinación con otro ácido nucleico que codifica un péptido que controla la secreción de la proteína o el péptido codificado por dicho ácido nucleico

de una célula huésped. De acuerdo con la presente enseñanza, un ácido nucleico puede estar presente, además, en combinación con otro ácido nucleico que codifica para un péptido que provoca que la proteína o el péptido codificado se ancle a la membrana celular de la célula huésped o se compartimentalice en orgánulos particulares de dicha célula. De manera similar, es posible una combinación con un ácido nucleico que representa un gen indicador o cualquier "etiqueta".

En una modalidad preferida, una molécula de ácido nucleico recombinante es, de acuerdo con la enseñanza, un vector, cuando sea apropiado con un promotor, que controla la expresión del ácido nucleico. El término "vector" se usa en la presente en su significado más general y comprende cualquier vehículo intermediario para un ácido nucleico que permite que dicho ácido nucleico, por ejemplo, se introduzca en células procariotas y/o eucariotas y, cuando sea apropiado, se integre en un genoma. Preferentemente, los vectores de este tipo se replican y/o se expresan en las células. Puede adaptarse un vehículo intermediario, por ejemplo, para su uso en la electroporación, en el bombardeo con microproyectiles, en la administración liposomal, en la transferencia con la ayuda de agrobacterias o en la inserción a través de virus ADN o ARN. Los vectores comprenden plásmidos, fagémidos, bacteriófagos o genomas virales.

Los ácidos nucleicos de acuerdo con la enseñanza pueden usarse para la transfección de células huésped. Los ácidos nucleicos en la presente significan tanto ADN como ARN recombinante. El ARN recombinante puede prepararse mediante una transcripción in vitro de un molde de ADN. Además, puede modificarse mediante secuencias de estabilización, formación de la caperuza y poliadenilación antes de su aplicación.

El término "recombinante", en el contexto de la presente enseñanza, significa "producido mediante ingeniería genética". Preferentemente, un "objeto recombinante" tal como un ácido nucleico recombinante en el contexto de la presente enseñanza, no es de origen natural.

El término "de origen natural", como se usa en la presente, se refiere al hecho de que un objeto puede encontrarse en la naturaleza. Por ejemplo, es de origen natural un péptido o ácido nucleico que está presente en un organismo (lo que incluye los virus) y que puede aislarse a partir de una fuente en la naturaleza y que no se ha modificado intencionalmente por el hombre en el laboratorio.

El término "célula" o "célula huésped" se refiere, preferentemente, a una célula intacta, es decir, una célula con una membrana intacta que no libera sus componentes intracelulares normales tales como enzimas, organelos, o material genético. Una célula intacta, preferentemente, es una célula viable, es decir, una célula viva capaz de llevar a cabo sus funciones metabólicas normales. Preferentemente, dicho término se refiere, de acuerdo con la enseñanza, a cualquier célula que puede transfectarse con un ácido nucleico exógeno. Preferentemente, la célula cuando se transfecta con un ácido nucleico exógeno puede expresar el ácido nucleico.

El término "célula huésped" comprende de acuerdo con las enseñanza células procariotas (por ejemplo, E. coli) o eucariotas (por ejemplo, células dendríticas, células B, células CHO, células COS, células K562, células de levadura y células de insectos). Se prefieren particularmente células de mamífero, tales como células de humanos, ratones, hámsteres, cerdos, cabras y primates. Las células pueden derivarse de una multiplicidad de tipos de tejidos y comprenden células primarias y líneas celulares. Los ejemplos específicos comprenden queratinocitos, leucocitos de sangre periférica, células madre de la médula ósea y células madre embrionarias. Un ácido nucleico puede estar presente en la célula huésped en la forma de una sola copia o de dos o más copias y, en una modalidad, se expresa en la célula huésped.

El término "péptido" comprende oligo y polipéptidos y se refiere a sustancias que comprenden dos o más, preferentemente, 3 o más, preferentemente, 4 o más, preferentemente, 6 o más, preferentemente, 8 o más, preferentemente, 10 o más, preferentemente, 13 o más, preferentemente, 16 o más, preferentemente, 21 o más y hasta preferentemente, 8, 10, 20, 30, 40 o 50, en particular 100 aminoácidos unidos covalentemente mediante enlaces peptídicos. El término "proteína" se refiere a péptidos grandes, preferentemente, a péptidos con más de 100 residuos de aminoácidos, pero en general los términos "péptidos" y "proteínas" son sinónimos y se usan indistintamente en la presente descripción.

De acuerdo con la enseñanza, un péptido puede incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales. En una modalidad, un péptido simplemente incluye aminoácidos naturales.

De acuerdo con la enseñanza, el término "aminoácido no natural" se refiere a un aminoácido que tiene una estructura diferente de las de las 20 especies de aminoácidos naturales. Dado que los aminoácidos no naturales tienen estructuras similares a las de los aminoácidos naturales, los aminoácidos no naturales pueden clasificarse como derivados o análogos de determinados aminoácidos naturales.

De acuerdo con la enseñanza, el término "péptido cíclico" se refiere a una cadena de péptido o polipéptido que forma un anillo. Un péptido puede ciclarse de cuatro maneras diferentes: cabeza a cola (C-terminal a N-terminal), cabeza a cadena lateral, cadena lateral a cola o cadena lateral a cadena lateral. Los péptidos particularmente preferidos de acuerdo con la enseñanza son los que contienen dos o más residuos que contienen grupos tioles tales como cisteínas que pueden formar puentes disulfuros intramoleculares lo que resulta en péptidos cíclicos.

De acuerdo con la enseñanza, un péptido puede unirse covalentemente o no covalentemente a uno o más de otros compuestos. Tales compuestos incluyen compuestos peptídicos tales como péptidos y proteínas así como también compuestos no peptídicos tal como polietilenglicol (PEG).

En una modalidad, los péptidos que se describen en la presente descripción son PEGilados. La PEGilación es el proceso de unión covalente de las cadenas del polímero polietilenglicol (PEG) a otra molécula, tal como un péptido o proteína. La unión covalente de PEG puede "enmascarar" el agente del sistema inmunitario del huésped (inmunogenicidad y antigenicidad reducidas), y aumentar el tamaño hidrodinámico (tamaño en solución) del agente lo que prolonga su tiempo en circulación mediante la reducción del aclaramiento renal. La PEGilación puede proporcionar también solubilidad en agua a fármacos y proteínas hidrofóbicas.

Preferentemente, las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la descripción se han aislado. Los términos "proteína aislada" o "péptido aislado" significan que la proteína o el péptido se han separado de su ambiente natural. Una proteína o un péptido aislado pueden estar en un estado purificado esencialmente. El término "purificado esencialmente" significa que la proteína o péptido está libre esencialmente de otras sustancias con las que se asocia en la naturaleza o in vivo. Dichas proteínas y péptidos pueden usarse, por ejemplo, en un ensayo inmunológico o de diagnóstico o como agentes terapéuticos. Las proteínas y péptidos descritos de acuerdo con la invención pueden aislarse a partir de muestras biológicas tales como tejidos u homogenatos celulares y pueden expresarse, además, de forma recombinante en una multiplicidad de sistemas de expresión procariotas o eucariotas.

El término "anticuerpo" incluye una glicoproteína que comprende al menos dos cadenas pesadas (H) y dos cadenas ligeras (L) que se interconectan por enlaces disulfuro, y cualquier molécula que comprende una porción de unión a antígeno de dicha glicoproteína. El término "anticuerpo" incluye anticuerpos monoclonales, anticuerpos recombinantes, anticuerpos humanos, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, moléculas que comprenden fragmentos de unión o derivados de anticuerpos, lo que incluye, sin limitación, anticuerpos monocatenarios, por ejemplo, scFv y fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno tales como fragmentos Fab y Fab' e incluye, además, todas las formas recombinantes de los anticuerpos, por ejemplo, anticuerpos que se expresan en procariotas, anticuerpos no glicosilados y cualquiera de los fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno y derivados como se describe en la presente descripción. Cada cadena pesada comprende una región variable de cadena pesada (abreviada en la presente descripción como VH) y una región constante de cadena pesada. Cada cadena ligera comprende una región variable de cadena ligera (abreviada en la presente descripción como VL) y una región constante de cadena ligera. Las regiones VH y VL pueden subdividirse adicionalmente en regiones de hipervariabilidad, denominadas regiones determinantes de la complementariedad (CDR), intercaladas con regiones que están más conservadas, denominadas regiones marco (FR). Cada VH y VL se compone de tres CDR y cuatro FR, dispuestas desde el extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal en el siguiente orden: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, FR4. Las regiones variables de las cadenas pesadas y ligeras contienen un dominio de unión que interactúa con un antígeno. Las regiones constantes de los anticuerpos pueden mediar la unión de la inmunoglobulina a los tejidos o factores del huésped, que incluyen varias células del sistema inmunitario (por ejemplo, células efectoras) y al primer componente (Clq) del sistema clásico del complemento.

Para los propósitos de la presente enseñanza, las "variantes" de una secuencia de aminoácidos comprenden variantes de inserción de aminoácidos, variantes de adición de aminoácidos, variantes de deleción de aminoácidos y/o variantes de sustitución de aminoácidos. Las variantes de deleción de aminoácidos que comprenden la deleción en el extremo N-terminal y/o C-terminal de la proteína se denominan también variantes de truncamiento N-terminal y/o C-terminal.

Las variantes de inserción de aminoácidos comprenden inserciones de uno o dos o más aminoácidos en una secuencia de aminoácidos particular. En el caso de las variantes de secuencias de aminoácidos que tienen una inserción, se insertan uno o más residuos de aminoácidos en un sitio particular en una secuencia de aminoácidos, aunque es posible también una inserción aleatoria con el tamizaje apropiado del producto resultante.

Las variantes de adición de aminoácidos comprenden fusiones aminoterminales y/o carboxiterminales de uno o más aminoácidos, tales como 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos.

Las variantes de deleción de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de uno o más aminoácidos de la secuencia, tales como por la eliminación de 1, 2, 3, 5, 10, 20, 30, 50, o más aminoácidos. Las deleciones pueden estar en cualquier posición del péptido o proteína.

Las variantes de sustitución de aminoácidos se caracterizan por la eliminación de al menos un residuo en la secuencia y la inserción de otro residuo en su lugar. La preferencia está dada a las modificaciones que están en las posiciones de la secuencia de aminoácidos que no se conservan entre las proteínas o péptidos homólogos y/o al reemplazo de aminoácidos con otros que tienen propiedades similares. Preferentemente, los cambios de aminoácidos en las variantes de proteína son cambios conservadores de aminoácidos, es decir, sustituciones de aminoácidos cargados o no cargados de manera similar. Un cambio conservador de aminoácidos involucra la sustitución de uno de una familia de aminoácidos que se relacionan en sus cadenas laterales. Los aminoácidos de origen natural se dividen generalmente en cuatro familias: aminoácidos ácidos (aspartato, glutamato), básicos (lisina, arginina, histidina), no polares (alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano) y polares sin carga (glicina, asparagina, glutamina, cisteína, serina,

treonina, tirosina). En ocasiones la fenilalanina, el triptófano y la tirosina se clasifican conjuntamente como aminoácidos aromáticos.

Preferentemente, el grado de similitud, preferentemente, de identidad entre una secuencia de aminoácidos determinada y una secuencia de aminoácidos que es una variante de la secuencia de aminoácidos determinada será de al menos aproximadamente 60 %, 65 %, 70 %, 80 %, 81 %, 82 %, 83 %, 84 %, 85 %, 86 %, 87 %, 88 %, 89 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 %. El grado de similitud o de identidad está dado, preferentemente, para una región del aminoácido que es al menos aproximadamente 10 %, al menos aproximadamente 20 %, al menos aproximadamente 30 %, al menos aproximadamente 40 %, al menos aproximadamente 50 %, al menos aproximadamente 60 %, al menos aproximadamente 70 %, al menos aproximadamente 80 %, al menos aproximadamente 90 % o aproximadamente 100 % de la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. Por ejemplo, si la secuencia de aminoácidos de referencia consiste en 200 aminoácidos, el grado de similitud o de identidad se da, preferentemente, para al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 80, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 120, al menos aproximadamente 140, al menos aproximadamente 160, al menos aproximadamente 180, o aproximadamente 200 aminoácidos, preferentemente, aminoácidos continuos. En modalidades preferidas, el grado de similitud o identidad está dado por la longitud completa de la secuencia de aminoácidos de referencia. El alineamiento para determinar la similitud de secuencia, preferentemente, la identidad de secuencia, puede realizarse con herramientas conocidas en la técnica, preferentemente, mediante el uso del mejor alineamiento de secuencia, por ejemplo, mediante el uso de Align, mediante el uso de configuraciones estándar, preferentemente, EMBOSS::needle, Matrix: Blosum62, Gap Open 10.0, Gap Extend 0.5.

"Similitud de secuencia" indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos o que representan sustituciones conservadoras de aminoácidos. "Identidad de secuencia" entre dos secuencias de aminoácidos indica el porcentaje de aminoácidos que son idénticos entre las secuencias.

El término "porcentaje de identidad" pretende indicar un porcentaje de residuos de aminoácidos que son idénticos entre las dos secuencias a comparar, se obtiene después del mejor alineamiento, este porcentaje es puramente estadístico y las diferencias entre las dos secuencias se distribuyen en forma aleatoria y en toda su longitud. Las comparaciones de secuencias entre dos secuencias de aminoácidos se llevan a cabo convencionalmente mediante la comparación de estas secuencias después de haberlas alineado de forma óptima, dicha comparación se lleva a cabo por segmento o por "ventana de comparación" con el fin de identificar y comparar las regiones locales con similitud de secuencia. El alineamiento óptimo de las secuencias para la comparación puede producirse, además de manualmente, por medio del algoritmo de homología local de Smith y Waterman, 1981, Ads App. Math. 2, 482, por medio del algoritmo de homología local de Needleman y Wunsch, 1970, J. Mol. Biol. 48, 443, por medio del método de búsqueda de similitud de Pearson y Lipman, 1988, Proc. Natl Acad. Sci. EE.UU. 85, 2444, o por medio de programas de ordenador que usan estos algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA, BLAST P, BLAST N y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Drive, Madison, Wis.).

El porcentaje de identidad se calcula mediante la determinación del número de posiciones idénticas entre las dos secuencias que se comparan, se divide este número entre el número de posiciones comparadas, y se multiplica el resultado obtenido por 100 de forma que se obtiene el porcentaje de identidad entre estas dos secuencias.

Las variantes de aminoácido y péptidos descritas anteriormente pueden prepararse fácilmente con la ayuda de técnicas de síntesis de péptidos conocidas tales como, por ejemplo, mediante síntesis en fase sólida (Merrifield, 1964) y métodos similares o mediante manipulación de ADN recombinante. La manipulación de secuencias de ADN para la preparación de proteínas y péptidos que tienen sustituciones, inserciones o deleciones, se describe en detalle en Sambrook y otros, (1989), por ejemplo.

Los agentes de unión a la Seprasa de la enseñanza pueden usarse en enfoques terapéuticos. Para este fin, los agentes de unión a la Seprasa de la enseñanza pueden unirse covalentemente y/o no covalentemente a uno o más restos efectores terapéuticos y/o combinarse con diversos componentes para producir composiciones aceptables farmacéuticamente. Los agentes tales como el péptido descrito en la presente descripción pueden administrarse en la forma de cualquier composición farmacéutica adecuada.

"Célula objetivo" significará cualquier célula no deseada tal como una célula cancerosa. En modalidades preferidas, la célula objetivo expresa la Seprasa.

De acuerdo con la enseñanza, el término "resto efector terapéutico" significa cualquier molécula que pueda ejercer un efecto terapéutico. De acuerdo con la enseñanza, un resto efector terapéutico es, preferentemente, guiado selectivamente a una célula que expresa la Seprasa. Cualquier agente que ejerza un efecto terapéutico sobre las células cancerosas puede usarse como fármaco para la conjugación con un agente de unión a la Seprasa. Preferentemente, la conjugación del fármaco no altera o no altera significativamente las características de unión, en particular la especificidad, del agente de unión a la Seprasa, como se analiza en la presente descripción.

De acuerdo con la enseñanza, un resto efector terapéutico incluye agentes contra el cáncer, radioisótopos tales como compuestos marcados con yodo radiactivo, toxinas, fármacos citostáticos o citolíticos, etcétera. Los agentes contra el cáncer comprenden, por ejemplo, aminoglutetimida, azatioprina, sulfato de bleomicina, busulfán, carmustina, clorambucilo, cisplatino, ciclofosfamida, ciclosporina, citarabidina, dacarbacina, dactinomicina, daunorrubicina, doxorrubicina, taxol, etopósido, fluorouracilo, interferon-α, lomustina, mercaptopurina, metotrexato, mitotano, procarbacina HCl, tioguanina, sulfato de vinblastina y sulfato de vincristina. Otros agentes contra el cáncer se describen, por ejemplo, en Goodman y Gilman, “The Pharmacological Basis of Therapeutics”, 8a edición, 1990, McGraw-Hill Inc., en particular el Capítulo 52 (Antineoplastic Agents (Paul Calabresi y Bruce A. Chabner). Las toxinas pueden ser proteínas como la proteína antiviral de la hierba carmín, la toxina del cólera, la toxina pertussis, la ricina, la gelonina, la abrina, la exotoxina diftérica o exotoxina de Pseudomonas. Los residuos de toxinas también pueden ser radionúclidos emisores de gran energía como el cobalto-60.

Los restos efectores terapéuticos incluyen, en particular, citotoxinas o agentes citotóxicos. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial a y, en particular, mate a las células.

Las clases útiles de agentes citotóxicos incluyen, por ejemplo, agentes antitubulinas, agentes de unión a los surcos menores de ADN (por ejemplo, enediínas y lexitropsinas), inhibidores de la replicación del ADN, agentes alquilantes (por ejemplo, complejos de platino como cisplatino, mono(platino), bis(platino) y complejos de platino trinucleares y carboplatino), antraciclinas, antibióticos, antifolatos, antimetabolitos, sensibilizadores de quimioterapia, duocarmicinas, etopósidos, pirimidinas fluoradas, ionóforos, nitrosoureas, platinoles, compuestos de preformación, antimetabolitos de purina, puromicinas esteroides, sensibilizadores a la radiación, esteroides, taxanos (por ejemplo, paclitaxel y docetaxel), inhibidores de topoisomerasa, alcaloides de la vinca o similares.

Los agentes citotóxicos individuales incluyen, por ejemplo, un andrógeno, antramicina (AMC), asparaginasa, 5-azacitidina, azatioprina, bleomicina, busulfán, butionina sulfoximina, camptotecina, carboplatino, carmustina (BSNU), CC-1065, clorambucilo, cisplatino, colchicina, ciclofosfamida, citarabina, arabinósido de citidina, citocalasina B, dacarbazina, dactinomicina (anteriormente actinomicina), daunorubicina, decarbazina, docetaxel, doxorubicina, un estrógeno, 5-fluordesoxiuridina, 5-fluorouracilo, gramicidina D, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina (CCNU), mecloretamina, melfalán, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitramicina, mitomicina C, mitoxantrona, nitroimidazol, paclitaxel, plicamicina, procarbizina, estreptozotocina, tenopósido, 6-tioguanina, tioTEPA, topotecano, vinblastina, vincristina, vinorelbina, VP-16 y VM-26.

Los ejemplos de agentes antitubulina incluyen, entre otros, dolastatinas (por ejemplo, auristatina E, AFP, MMAF, MMAE, AEB, AEVB), maitansinoides, taxanos (por ejemplo, paclitaxel, docetaxel), T67 (Tularik), alquiloides de vinca (por ejemplo, vincristina, vinblastina, vindesina y vinorelbina), derivados de bacatina, análogos de taxanos (por ejemplo, epotilona A y B), nocodazol, colchicina y colcimida, estramustina, criptofisinas, cemadotina, combretastatina, discodermolida y eleuterobina.

Los radioisótopos para generar radiofármacos citotóxicos incluyen, por ejemplo, yodo-131, itrio-90 o indio-111.

Las técnicas para conjugar dicho resto efector terapéutico (fármaco) con péptidos se conocen bien. La generación de conjugados péptido-fármaco puede lograrse mediante cualquier técnica conocida por el experto en la técnica. Un péptido y un fármaco pueden unirse directamente entre sí a través de sus propios grupos enlazadores o indirectamente a través de un enlazador u otra sustancia.

Se dispone de varias reacciones diferentes para la unión covalente de fármacos a péptidos. Esto a menudo se logra mediante la reacción de los residuos de aminoácidos de la molécula peptídica, que incluyen los grupos amina de lisina, los grupos de ácido carboxílico libre de ácido glutámico y aspártico, los grupos sulfhidrilo de cisteína y los diversos restos de los aminoácidos aromáticos. Uno de los métodos no específicos de unión covalente más comúnmente usado es la reacción de carbodiimida para unir un grupo carboxi (o amino) de un compuesto a grupos amino (o carboxi) del péptido. Adicionalmente, se han usado agentes bifuncionales tales como dialdehídos o imidoésteres para unir el grupo amino de un compuesto a los grupos amino de la molécula peptídica. Además, se dispone para la unión de fármacos a péptidos la reacción de base de Schiff. Este método implica la oxidación con peryodato de un fármaco que contiene grupos glicol o hidroxilo, lo que forma de esta manera un aldehído que reacciona después con la molécula de péptido. La unión se produce mediante la formación de una base de Schiff con grupos amino de la molécula peptídica. Además, pueden usarse los isotiocianatos como agentes de acoplamiento para unir covalentemente los fármacos a los péptidos. Los expertos en la técnica conocen otras técnicas y están dentro del alcance de la presente enseñanza.

Existen muchos grupos de enlace conocidos en la técnica para hacer conjugados péptido-fármaco. Un enlazador comprende, preferentemente, uno o más grupos funcionales que reaccionan tanto con el péptido y el fármaco como con uno de ellos. Los ejemplos de grupos funcionales incluyen grupos amino, carboxilo, mercapto, maleimida y piridinilo.

En una modalidad de la enseñanza, un péptido se une a un fármaco a través de un reactivo de reticulación bifuncional. Como se usa en la presente, un "reactivo de reticulación bifuncional" se refiere a un reactivo que posee dos grupos reactivos, uno de los cuales es capaz de reaccionar con un péptido, mientras que el otro es capaz de reaccionar con el fármaco para unir el péptido con el fármaco, lo que forma de esta manera un conjugado. Puede usarse cualquier reactivo

de reticulación bifuncional adecuado en relación con la enseñanza, siempre que el reactivo enlazador proporcione la conservación de las características del fármaco, por ejemplo, citotoxicidad, y de direccionamiento del péptido. Preferentemente, la molécula enlazadora une el fármaco al péptido a través de enlaces químicos, de manera que el fármaco y el péptido se acoplan químicamente (por ejemplo, se unen covalentemente) entre sí.

En una modalidad, el reactivo de reticulación bifuncional comprende enlazadores no escindibles. Un enlazador no escindible es cualquier resto químico que sea capaz de enlazar un fármaco a un péptido de una manera covalente, estable. Preferentemente, un enlazador no escindible no es escindible en condiciones fisiológicas, en particular dentro del cuerpo y/o dentro de una célula. Por lo tanto, los enlazadores no escindibles son sustancialmente resistentes a la escisión inducida por ácido, escisión inducida por luz, escisión inducida por peptidasa, escisión inducida por esterasa, y escisión del enlace disulfuro, en condiciones en las cuales el fármaco o el péptido permanece activo. Los reactivos de reticulación adecuados que forman enlaces no escindibles entre un fármaco y un péptido se conocen bien en la técnica. En una modalidad, el fármaco se une al péptido a través de un enlace tioéter.

En una modalidad particularmente preferida, el reactivo enlazador es un enlazador escindible. Preferentemente, un enlazador escindible es escindible en condiciones fisiológicas, en particular dentro del cuerpo y/o dentro de una célula. Ejemplos de enlazadores escindibles adecuados incluyen enlazadores disulfuro, enlazadores lábiles con ácidos, enlazadores fotolábiles, enlazadores lábiles con peptidasa y enlazadores lábiles con esterasa.

Los ejemplos de enlazadores incluyen, pero no se limitan a, N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato (SPDB), N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (Sulfo-SMCC), N-succinimidil-4-(maleimidometil)ciclohexanocarboxilato (SMCC), N-succinimidil-4-(N-maleimidometil)-ciclohexano-1-carboxi-(6-amidocaproato) (LC-SMCC), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 4-maleimidobutírico (GMBS), éster de N-hidroxisuccinimida del ácido 3-maleimidocaproico (EMCS), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS), éster de N-(α-maleimidoacetoxi)-succinimida (AMAS), succinimidil-6-(P-maleimidopropionamido)hexanoato (SMPH), N-succinimidil-4-(p-maleimidofenil)-butirato (SMPB), N-(p-maleimidofenil)isocianato (PMPI), 6-maleimidocaproilo (MC), maleimidopropanoilo (MP), p-aminobenciloxicarbonilo (PAB), N-succinimidil-4-(2-piridiltio)pentanoato (SPP) y N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB). Además, puede usarse un enlazador peptídico tal como valina-citrulina (Val-Cit) o alanina-fenilalanina (ala-phe), y cualquiera de los enlazadores mencionados anteriormente puede usarse en una combinación adecuada.

Los enlazadores que contienen disulfuro son enlazadores escindibles a través del intercambio de disulfuro, que puede producirse en condiciones fisiológicas. En aún otras modalidades, el enlazador es escindible en condiciones reductoras (por ejemplo, un enlazador disulfuro). Se conoce una variedad de enlaces disulfuro en la técnica, que incluyen, por ejemplo, los que pueden formarse mediante el uso de SATA (N-succinimidil-5-acetiltioacetato), SPDP (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato), SPDB (N-succinimidil-3-(2-piridilditio)butirato) y SMPT (N-succinimidil-oxicarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)tolueno).

Los enlazadores lábiles con ácido son enlazadores escindibles a pH ácido. Por ejemplo, ciertos compartimentos intracelulares, tales como los endosomas y lisosomas, tienen un pH ácido (pH 4-5), y brindan las condiciones adecuadas para escindir los enlazadores lábiles con ácido. Los enlazadores lábiles con ácido son relativamente estables en condiciones de pH neutro, tal como el de la sangre, pero son inestables a un pH inferior a 5,5 o 5,0. Por ejemplo, puede usarse una hidrazona, semicarbazona, tiosemicarbazona, amida cis-aconítica, ortoéster, acetal, cetal o similares.

Los enlazadores que son foto-lábiles son útiles en la superficie del cuerpo y en muchas cavidades del cuerpo que son accesibles a la luz. Además, la luz infrarroja puede penetrar el tejido.

Los enlazadores lábiles con peptidasa pueden usarse para escindir ciertos péptidos dentro o fuera de las células. En una modalidad, el enlazador escindible se escinde en condiciones suaves, es decir, en condiciones dentro de una célula en las cuales la actividad del agente citotóxico no se afecta.

El enlazador puede ser o puede comprender, por ejemplo, un enlazador de peptidilo que se escinde mediante una enzima peptidasa o proteasa intracelular, que incluye, pero no se limita a, una proteasa lisosómica o endosómica. Típicamente, el enlazador de peptidilo tiene una longitud de al menos dos aminoácidos o al menos tres aminoácidos. Los agentes de escisión pueden incluir catepsinas B y D y plasmina, todos los cuales se sabe que hidrolizan los derivados del fármaco dipeptídico lo que resulta en la liberación del fármaco activo dentro de las células objetivo. Por ejemplo, puede usarse un enlazador de peptidilo que es escindible mediante la proteasa dependiente de tiol catepsina B, que se expresa altamente en el tejido canceroso (por ejemplo, un enlazador de Phe-Leu o de Gly-Phe-Leu-Gly). En modalidades específicas, el enlazador de peptidilo escindible por una proteasa intracelular es un enlazador de valina-citrulina (Val-Cit; vc) o un enlazador de fenilalanina-lisina (Phe-Lys). Una ventaja de usar la liberación proteolítica intracelular del agente terapéutico es que el agente normalmente se atenúa típicamente cuando se conjuga y la estabilidad sérica de los conjugados es típicamente alta.

Los términos “individuo” y “sujeto” se usan indistintamente en la presente descripción. Se refieren a seres humanos, primates no humanos u otros mamíferos (por ejemplo ratón, rata, conejo, perro, gato, ganado, porcino, oveja, caballo o primate) que pueden afectarse con o son susceptibles a una enfermedad o trastorno (por ejemplo, cáncer) pero pueden

o no pueden tener la enfermedad o el trastorno. En muchas modalidades, el individuo es un ser humano. A menos que se indique de cualquier otra manera, los términos "individuo" y "sujeto" no indican una edad particular, y por tanto abarcan adultos, ancianos, niños, y recién nacidos. En modalidades preferidas de la presente enseñanza, el "individuo" o "sujeto" es un "paciente". El término "paciente" significa de acuerdo con la enseñanza un sujeto para el tratamiento, en particular un sujeto enfermo.

El término "enfermedad" se refiere a una condición anormal que afecta el cuerpo de un individuo. Una enfermedad a menudo se interpreta como una condición médica que se asocia con signos y síntomas específicos. Una enfermedad puede causarse por factores originalmente de una fuente externa, tal como enfermedad infecciosa, o puede causarse por disfunciones internas, tal como enfermedades autoinmunitarias. En humanos, "enfermedad" se usa a menudo más ampliamente para referirse a cualquier condición que causa dolor, disfunción, sufrimiento, problemas sociales, o la muerte al individuo afectado, o problemas similares para aquellos en contacto con el individuo. En este sentido más amplio, algunas veces incluye heridas, discapacidades, trastornos, síndromes, infecciones, síntomas aislados, comportamientos anormales, y variaciones atípicas de la estructura y función, mientras que en otros contextos y para otros propósitos estas pueden considerarse categorías distinguibles. Las enfermedades usualmente afectan a los individuos no solo físicamente, si no también emocionalmente, ya que contraer y vivir con muchas enfermedades puede alterar la perspectiva de uno de la vida y la personalidad de uno. De acuerdo con la enseñanza, el término "enfermedad" incluye cáncer, en particular aquellas formas de cáncer descritas en la presente descripción. Cualquier referencia en la presente descripción a cáncer o formas particulares de cáncer también incluye la metástasis del cáncer de estas. En una modalidad preferida, una enfermedad a tratar de acuerdo con la presente solicitud involucra células que expresan la Seprasa.

"Enfermedades que involucran células que expresan la Seprasa" o expresiones similares significan, de acuerdo con la enseñanza, que la Seprasa se expresa en células de un tejido u órgano enfermo. En una modalidad, la expresión de la Seprasa en células de un tejido u órgano enfermo aumenta en comparación con el estado en un tejido u órgano sano. En una modalidad, la expresión solo se encuentra en un tejido enfermo, mientras que la expresión en un tejido sano se reprime. De acuerdo con la enseñanza, las enfermedades que involucran células que expresan la Seprasa incluyen enfermedades cancerosas. Además, de acuerdo con la enseñanza, las enfermedades cancerosas son, preferentemente, aquellas en donde las células expresan la Seprasa.

Los términos "enfermedad cancerosa" o "cáncer" se refieren a o describen el estado fisiológico en un individuo que se caracteriza típicamente por un crecimiento celular no regulado. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma y leucemia. Más particularmente, los ejemplos de tales cánceres incluyen cáncer óseo, cáncer sanguíneo, cáncer de pulmón, cáncer de hígado, cáncer de páncreas, cáncer de piel, cáncer de la cabeza o cuello, melanoma cutáneo o intraocular, cáncer uterino, cáncer de ovarios, cáncer rectal, cáncer de la región anal, cáncer de estómago, cáncer de colon, cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer uterino, carcinoma de los órganos sexuales y reproductivos, Enfermedad de Hodgkin, cáncer del esófago, cáncer del intestino delgado, cáncer del sistema endocrino, cáncer de la glándula tiroides, cáncer de la glándula paratiroides, cáncer de la glándula adrenal, sarcoma de tejido blando, cáncer de la vejiga, cáncer de los riñones, carcinoma celular renal, carcinoma de la pelvis renal, neoplasias del sistema nervioso central (CNS), cáncer neuroectodermal, tumores del eje espinal, glioma, meningioma, y adenoma pituitario. El término "cáncer" de acuerdo con la presente invención comprende, además, las metástasis del cáncer. Preferentemente, una "enfermedad cancerosa" se caracteriza por células que expresan la Seprasa.

Por "metástasis" se entiende la propagación de las células cancerosas desde su sitio original a otra parte del cuerpo. La formación de metástasis es un proceso muy complejo y depende del desprendimiento de las células malignas del tumor primario, la invasión de la matriz extracelular, la penetración de las membranas basales del endotelio para entrar en la cavidad y en los vasos del cuerpo, y después, tras haberse transportado por la sangre, la infiltración en los órganos objetivo. Finalmente, el crecimiento de un nuevo tumor en el sitio objetivo depende de la angiogénesis. A menudo la metástasis del tumor ocurre incluso después de la remoción del tumor primario porque las células o componentes tumorales pueden permanecer y desarrollar un potencial metastásico. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la descripción se refiere a "metástasis distante" que se relaciona con una metástasis que se halla remota del tumor primario y del sistema de nódulos linfáticos regional. En una modalidad, el término "metástasis" de acuerdo con la enseñanza se refiere a la metástasis en ganglios linfáticos.

De acuerdo con la enseñanza, el término "tumor" o "enfermedad tumoral" se refiere a un crecimiento anormal de células (llamadas células neoplásicas, células tumorígenas o células tumorales) que forman, preferentemente, una hinchazón o lesión. Por "célula tumoral" se entiende una célula anormal que crece mediante una proliferación celular rápida y descontrolada y continúa su crecimiento después de que cesa el estímulo que inició el nuevo crecimiento. Los tumores muestran una pérdida parcial o completa de organización estructural y coordinación funcional con el tejido normal, y generalmente forman una masa distinta de tejido, que puede ser ya sea benigna, premaligna o maligna. De acuerdo con la enseñanza, una "enfermedad cancerosa" es preferentemente, una "enfermedad tumoral". Sin embargo, en general, los términos "cáncer" y "tumor" se usan indistintamente en la presente descripción.

Preferentemente, una enfermedad tumoral, de acuerdo con la enseñanza, es una enfermedad cancerosa, es decir, una enfermedad maligna y una célula tumoral es una célula cancerosa. Preferentemente, una enfermedad tumoral o enfermedad cancerosa se caracteriza por células en las que la Seprasa se expresa o se expresa anormalmente y/o una célula tumoral o célula cancerosa se caracteriza por la expresión o expresión anormal de la Seprasa.

Una recaída o recurrencia se produce cuando una persona se ve afectada nuevamente por una afección que la afectó en el pasado. Por ejemplo, si un paciente ha sufrido una enfermedad tumoral, ha recibido un tratamiento exitoso de dicha enfermedad y desarrolla nuevamente dicha enfermedad, dicha enfermedad recientemente desarrollada puede considerarse una recaída o recurrencia. Sin embargo, de acuerdo con la enseñanza, una recaída o recurrencia de una enfermedad tumoral puede, pero no necesariamente, producirse en el sitio de la enfermedad tumoral original. Una recaída o recurrencia de un tumor incluye, además, situaciones en donde un tumor se produce en un sitio diferente al sitio del tumor original, así como también en el sitio del tumor original. Preferentemente, el tumor original para el que el paciente ha recibido un tratamiento es un tumor primario y el tumor en un sitio diferente al sitio del tumor original es un tumor secundario o metastásico.

El término "tratamiento" o "tratamiento terapéutico" se refiere a cualquier tratamiento que mejora el estado de salud y/o prolonga (aumenta) la esperanza de vida de un individuo.

Dicho tratamiento puede eliminar la enfermedad en un individuo, detener o enlentecer el desarrollo de una enfermedad en un individuo, inhibir o enlentecer el desarrollo de una enfermedad en un individuo, disminuir la frecuencia o gravedad de los síntomas en un individuo, y/o disminuir la recurrencia en un individuo quien actualmente tiene o quien previamente tuvo una enfermedad.

Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se refieren a cualquier tratamiento que pretende prevenir la aparición de una enfermedad en un individuo. Los términos "tratamiento profiláctico" o "tratamiento preventivo" se usan en la presente descripción indistintamente. Por ejemplo, un sujeto que está en riesgo de padecer cáncer sería un candidato para la terapia para prevenir el cáncer.

Por "que está en riesgo" se entiende un sujeto que se identifica que tiene una posibilidad mayor de la normal de desarrollar una enfermedad, en particular cáncer, en comparación con la población general. Además, un sujeto que ha tenido, o que actualmente tiene, una enfermedad, en particular cáncer, es un sujeto que tiene un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad, ya que tal sujeto puede continuar el desarrollo de una enfermedad. Los sujetos que actualmente tienen o han tenido un cáncer tienen, además, un riesgo aumentado de metástasis de cáncer.

Puede seleccionarse un tratamiento (terapéutico) del cáncer del grupo que consiste en cirugía, quimioterapia, radioterapia y terapia dirigida.

El término "cirugía", como se usa en la presente, incluye la extracción de tumores en una operación. Es un tratamiento común para el cáncer. Un cirujano puede extirpar los tumores mediante el uso de escisión local.

El término "quimioterapia", como se usa en la presente, se refiere al uso de agentes quimioterapéuticos o combinaciones de agentes quimioterapéuticos, preferentemente, para detener el crecimiento de células cancerosas, ya sea al destruir las células o al detener su división. Cuando la quimioterapia se toma por vía oral o se inyecta en una vena o músculo, los fármacos ingresan al torrente sanguíneo y pueden alcanzar las células cancerosas en todo el cuerpo (quimioterapia sistémica). Cuando la quimioterapia se coloca directamente en el fluido cerebroespinal, un órgano o una cavidad corporal tal como el abdomen, los fármacos afectan principalmente a las células cancerosas en esas áreas (quimioterapia regional).

Los agentes quimioterapéuticos de acuerdo con la enseñanza incluyen compuestos citostáticos y compuestos citotóxicos. Los agentes quimioterapéuticos tradicionales actúan al destruir las células que se dividen rápidamente, una de las principales propiedades de la mayoría de las células cancerosas. Esto significa que la quimioterapia daña, además, las células que se dividen rápidamente en circunstancias normales, tales como las células de la médula ósea, el tracto digestivo y los folículos capilares. Esto resulta en los efectos secundarios más comunes de la quimioterapia. Los agentes que se dirigen a proteínas que se expresan de manera anormal en un cáncer (como la Seprasa) y que actúan a través de un resto terapéutico o un agente conjugado con el agente pueden verse como una forma de quimioterapia. Sin embargo, en el sentido más estricto, el término "quimioterapia", de acuerdo con la enseñanza, no incluye la terapia dirigida.

De acuerdo con la enseñanza, el término "terapia dirigida" se refiere a cualquier terapia que pueda usarse para atacar preferentemente células enfermas, tales como las células cancerosas, mientras que las células no enfermas no se toman como objetivo o se toman como objetivo en menor medida. El direccionamiento hacia las células enfermas, preferentemente, resulta en la destrucción y/o afectación de la proliferación o la viabilidad de las células enfermas. Dicha terapia incluye i) agentes que se conjugan con un resto terapéutico que se dirige a ciertos objetivos de la superficie celular, por ejemplo, la Seprasa, para administrar el resto terapéutico (por ejemplo, agentes de unión a la Seprasa conjugados a un resto terapéutico) o ii) agentes que se dirigen a ciertos objetivos de la superficie celular, por ejemplo, la Seprasa, y afectan la proliferación o viabilidad de las células enfermas simplemente al unirse a ellas (por ejemplo, agentes de unión a la Seprasa conjugados a un resto terapéutico o no conjugados a un resto terapéutico).

Las composiciones farmacéuticas y los métodos de tratamiento descritos de acuerdo con la enseñanza pueden usarse para tratar terapéuticamente o prevenir una enfermedad descrita en la presente descripción. Es posible usar modelos animales para probar un efecto sobre el cáncer. Por ejemplo, las células cancerosas humanas pueden introducirse en un ratón para generar un tumor. El efecto sobre las células cancerosas (por ejemplo, reducción del tamaño del tumor) puede medirse como una medida de la eficacia de un agente administrado al animal.

Los péptidos pueden administrarse de una manera conocida per se. Generalmente, se formulan y administran dosis de un péptido de 1 ng a 1 mg, preferentemente, de 10 ng a 100 µg.

Si se desea la administración de ácidos nucleicos (ADN y ARN), pueden formularse y administrarse dosis de 1 ng a 0,1 mg.

En una modalidad, los ácidos nucleicos se administran mediante métodos ex vivo, es decir, mediante la extracción de células de un paciente, la modificación genética de dichas células para incorporar un ácido nucleico y la reintroducción en el paciente de las células alteradas. Esto generalmente comprende la introducción in vitro de una copia funcional de un gen en las células de un paciente y la reintroducción de las células alteradas genéticamente en el paciente. La copia funcional del gen está bajo el control funcional de elementos reguladores que permiten que el gen se exprese en las células alteradas genéticamente. La transfección y los métodos de transducción se conocen por el experto en la técnica.

La presente enseñanza proporciona, además, la administración de ácidos nucleicos in vivo mediante el uso de, por ejemplo, vectores tales como virus y liposomas con control de objetivo.

En una modalidad preferida, se selecciona un virus o un vector viral para la administración de un ácido nucleico del grupo que consiste en adenovirus, virus adenoasociados, pox virus, lo que incluye el virus vaccinia y pox virus atenuados, virus del bosque de Semliki, retrovirus, virus Sindbis y partículas similares a los Virus Ty. En especial, se da particular preferencia a los adenovirus y los retrovirus. Los retrovirus son típicamente deficientes para la replicación (es decir, son incapaces de generar partículas infecciosas).

Los métodos para la introducción in vitro o in vivo de ácidos nucleicos en las células comprenden la transfección de ácidos nucleicos precipitados por fosfato de calcio, la transfección de ácidos nucleicos asociados con DEAE, transfección o infección con los virus indicados anteriormente que portan los ácidos nucleicos de interés, y la transfección mediada por liposomas. En modalidades particulares, se da preferencia a dirigir el ácido nucleico a células particulares. En dichas modalidades, el portador usado para la administración de un ácido nucleico en una célula (por ejemplo, un retrovirus o un liposoma) puede presentar una molécula de control del objetivo unida. Por ejemplo, puede incorporarse una molécula, tal como un anticuerpo específico para una proteína de la membrana de la superficie en la célula objetivo o un ligando para un receptor de la célula objetivo en el interior o unido al portador de ácido nucleico. Los anticuerpos preferidos comprenden anticuerpos que se unen selectivamente a un antígeno tumoral. Si se desea la administración de un ácido nucleico a través de liposomas, pueden incorporarse proteínas que se unen a una proteína de la membrana de la superficie asociada con la endocitosis en la formulación del liposoma para hacer posible el control y/o la captación del objetivo. Dichas proteínas comprenden, por ejemplo, proteínas de la cápsida o fragmentos de estas que son específicas para un tipo particular de células, anticuerpos para proteínas que se internalizan, y proteínas que se dirigen a un sitio intracelular.

Los compuestos activos terapéuticamente pueden administrarse mediante una de las vías convencionales, lo que incluye la inyección o la infusión. La administración puede llevarse a cabo, por ejemplo, oralmente, intravenosamente, intraperitonealmente, intramuscularmente, subcutáneamente o transdérmicamente. La administración puede ser local o sistémica, preferentemente, sistémica.

El término "administración sistémica" se refiere a la administración de un agente de manera que el agente se distribuya ampliamente en el cuerpo de un individuo en cantidades significativas y desarrolle un efecto deseado. Por ejemplo, el agente puede desarrollar su efecto deseado en la sangre y/o alcanza su sitio de acción deseado a través del sistema vascular. Las rutas de administración sistémica típicas incluyen la administración mediante la introducción del agente directamente en el sistema vascular o la administración oral, pulmonar, o intramuscular en donde el agente se adsorbe, entra al sistema vascular, y se transporta a uno o más sitio(s) de acción deseado(s) a través de la sangre.

De acuerdo con la presente enseñanza, se prefiere que la administración sistémica sea mediante la administración parenteral. El término "administración parenteral" se refiere a la administración de un agente de manera que el agente no pase por el intestino. El término "administración parenteral" incluye la administración intravenosa, la administración subcutánea, la administración intradérmica o la administración intraarterial, pero no se limita a estas.

Las composiciones farmacéuticas de la enseñanza son, preferentemente, estériles y contienen una cantidad eficaz de los agentes descritos en la presente descripción y opcionalmente de agentes adicionales como se analiza en la presente descripción para generar la reacción deseada o el efecto deseado.

Las composiciones farmacéuticas se proporcionan usualmente en una forma de dosificación uniforme y pueden prepararse en una forma conocida per se. Una composición farmacéutica puede estar por ejemplo en la forma de una solución o una suspensión.

Una composición farmacéutica puede comprender sales, sustancias tamponantes, conservantes, portadores, diluyentes y/o excipientes todos los cuales son preferentemente aceptables farmacéuticamente. El término "aceptable farmacéuticamente" se refiere a la no toxicidad de un material que no interactúa con la acción del componente activo de la composición farmacéutica.

Las sales que no son aceptables farmacéuticamente pueden usarse para preparar sales aceptables farmacéuticamente y se incluyen en la enseñanza. Las sales aceptables farmacéuticamente de este tipo comprenden de manera no limitante, aquellas preparadas a partir de los ácidos siguientes: ácidos clorhídrico, bromhídrico, sulfúrico, nítrico, fosfórico, maleico, acético, salicílico, cítrico, fórmico, malónico y succínico. Las sales aceptables farmacéuticamente pueden prepararse también como sales de metales alcalinos o sales de metales alcalinotérreos, tales como sales de sodio, sales de potasio o sales de calcio.

Las sustancias tampón adecuadas para su uso en una composición farmacéutica incluyen ácido acético en una sal, ácido cítrico en una sal, ácido bórico en una sal y ácido fosfórico en una sal.

Los conservantes adecuados para su uso en una composición farmacéutica incluyen cloruro de benzalconio, clorobutanol, parabeno y timerosal.

El término "portador" se refiere a un componente orgánico o inorgánico, de una naturaleza natural o sintética, en el que el componente activo se combina con el fin de facilitar, potenciar o habilitar la aplicación. De acuerdo con la enseñanza, el término "portador" incluye, además, uno o más agentes de relleno sólidos o líquidos, diluyentes o sustancias de encapsulación, que son adecuadas para la administración a un paciente.

Las sustancias portadoras posibles para la administración parenteral son, por ejemplo, agua estéril, Ringer, lactato de Ringer, solución de cloruro de sodio estéril, polialquilenglicoles, naftalenos hidrogenados y, en particular, polímeros biocompatibles de lactida, copolímeros de lactida/glicolida o copolímeros de polioxietileno/polioxipropileno.

Una formulación inyectable puede comprender un excipiente aceptable farmacéuticamente tal como Lactato de Ringer.

El término "excipiente" cuando se usa en la presente descripción pretende indicar todas las sustancias que pueden presentarse en una composición farmacéutica y que no son ingredientes activos tales como, por ejemplo, portadores, aglutinantes, lubricantes, espesantes, agentes activos de superficie, conservantes, emulsionantes, tampones, agentes saborizantes, o colorantes.

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción se administran en cantidades eficaces. Una "cantidad eficaz" se refiere a la cantidad que logra una reacción deseada o un efecto deseado solo o junto con dosis adicionales. En el caso del tratamiento de una enfermedad particular o de una afección particular, la reacción deseada se relaciona, preferentemente, con la inhibición del curso de la enfermedad. Esto comprende ralentizar el progreso de la enfermedad y, en particular, interrumpir o revertir el progreso de la enfermedad. La reacción deseada en un tratamiento de una enfermedad o de una afección puede ser también un retraso en la aparición o una prevención de la aparición de dicha enfermedad o de dicha afección.

Una cantidad eficaz de un agente o composición descrito en la presente descripción dependerá de la afección a tratar, la gravedad de la enfermedad, los parámetros individuales del paciente, que incluyen la edad, la condición fisiológica, la talla y el peso, la duración del tratamiento, el tipo de una terapia de acompañamiento (si se presenta), la vía específica de administración y factores similares. En consecuencia, las dosis administradas de los agentes que se describen en la presente descripción pueden depender de varios de tales parámetros. En el caso que una reacción en un paciente sea insuficiente con una dosis inicial pueden usarse dosis más altas (o dosis eficazmente mayores alcanzadas por una vía de administración diferente, más localizada).

Los agentes y composiciones descritas en la presente descripción pueden administrarse a los pacientes, por ejemplo, in vivo, para tratar o prevenir una variedad de trastornos tales como aquellos que se describen en la presente descripción. Los pacientes que se prefieren incluyen pacientes humanos que tienen trastornos que pueden corregirse o mejorarse mediante la administración de los agentes y composiciones descritas en la presente descripción. Esto incluye trastornos que involucran las células caracterizadas por un patrón de expresión alterado de la Seprasa.

Por ejemplo, en una modalidad, los agentes descritos en la presente descripción pueden usarse para tratar un paciente con una enfermedad cancerosa, por ejemplo, una enfermedad cancerosa tal como se describe en la presente descripción, caracterizada por la presencia de células que expresan la Seprasa.

La presente invención se describe en detalle mediante las figuras y los ejemplos más abajo, que se usan solamente para propósitos ilustrativos y no pretenden ser limitativos. Debido a la descripción y los ejemplos, las modalidades adicionales que se incluyen del mismo modo en la invención son asequibles para el trabajador experto.

Figuras

Figura 1: Secuencia de aminoácidos de MC-FA-010. Los puentes disulfuro se representan como líneas grises. Las cistinas se resaltan en amarillo y se numeran de N a C-terminal (números romanos).

Figura 2: A: Resumen de los datos de unión por barrido de alanina de MC-FA-010. La primera columna muestra la posición de la secuencia parental específica. La segunda a la cuarta columna muestra la Kd aparente calculada a través de un

modelo de unión de saturación de un sitio y el error calculado y valor R^2 de ajuste. La unión conservada/aumentada (pérdida de unión débil, respectivamente) se muestra en colores verdes, la unión débil y moderada en naranja y la ausencia de unión (pérdida completa de unión) en rojo. B: Secuencia de tipo silvestre de MC-FA-010 con la posición de unión específica resaltada con verde, naranja y rojo como se describió anteriormente.

Figura 3: Análisis de unión de Trx-MC-FA-010 a la Seprasa humana. A: Análisis ELISA de la unión de Trx-MC-FA-010 a la Seprasa humana en un intervalo de 0,39 a 50 nM. B: Análisis de ELISA de competencia. La unión de Trx-MC-FA-010 3 nM a la Seprasa humana compitió con MC-FA-010 monovalente soluble en un intervalo de 0,64 - 3167 nM.

Figura 4: Análisis SPR de la unión de MC-FA-010 a la Seprasa humana inmovilizada. A: Gráfico superior: Datos ajustados de etapas de asociación y disociación. Superposición de todas las concentraciones analizadas. Gráfico inferior: Vista residual de las curvas medidas y ajustadas. B: Resumen de datos medidos y calculados.

Figura 5: Análisis de la selectividad del MC-FA-010 hacia la FAPα humana. A: Superposición estructural de la DPP VI representada en cian o gris y la Seprasa representada en verde (Pymol). B: Análisis por ELISA de la unión de Trx-MC-FA-010 a la Seprasa humana (rhuSeprasa, barras de color gris oscuro) y la DPP IV (barras de color gris claro). El conjunto de datos que se muestra se basa en duplicados.

Figura 6: Inmunofluorescencia para la investigación de la especificidad del MC-FA-010. Se analizó la unión del MC-FA-010 conjugado con estreptavidina-Cy3 a células CHO-K1 que sobreexpresan la Seprasa (CHO-K1-Seprasa). Antes de la incubación con las células el MC-FA-010 y el Microcuerpo® control se biotinilaron y preensamblaron en estreptavidina conjugada con Cy3. Como controles negativos, se usaron un Microcuerpo™ no relacionado (a-Hepsin-bio) y células CHO-K1-FALSA negativas al objetivo. Complejo Microcuerpo™-Estreptavidina-Cy3 (rojo) y localización de núcleos (azul).

Figura 7: Tinción de líneas celulares CT26 embebidas en parafina después de acondicionamiento ex vivo. Después de 14 días de implantación, todos los cortes histológicos se tiñeron con el marcador CAF anti-α-SMA (verde) y DAPI para la localización de núcleos (azul). En (A) los cortes histológicos se trataron adicionalmente con MC-FA-010 que se biotiniló y se preensambló en estreptavidina conjugada con Cy3. En (B) los cortes histológicos se tiñeron con el Microcuerpo™ control MC-Myc-010, que también se tetramerizó con estreptavidina-Cy3.

Figura 8: Propiedades de unión del MC-FA-010 monovalente y tetravalente. (A) FACS para la determinación del valor de EC_{50} del MC-FA-010 monovalente (consiste en un casete de tiorredoxina-His6) en células que expresan la Seprasa humana (CHO-K1-Seprasa). El MC-FA-010 se detectó con un anticuerpo conjugado con PE específico de His. (B) FACS para la determinación del valor de EC_{50} de estreptavidina-APC acoplada al MC-FA-010 tetravalente en células que expresan la Seprasa humana (CHO-K1-Seprasa). Las mediciones se realizaron en tres experimentos independientes.

Figura 9: A) Representación esquemática del trímero DOTA-(MC-FA-012)$_3$. El peso molecular de la molécula se indica más abajo. El trímero se analizó funcionalmente mediante el uso de un ensayo de competición basado en FACS (B) en comparación con el Microcuerpo® monomérico MC-FA-012 (C).

Figura 10: Direccionamiento al tumor en CHO-Xenoinjerto que expresa Seprasa con MC-FA-012 conjugado con IRDye. Se inocularon por vía subcutánea células humanas positivas para Seprasa (CHO-K1-huSeprasa) en los flancos de ratones Foxn1(nu). Como control negativo, se usaron células huSeprasa-negativas (CHO-K1-FALSA) en paralelo. Después de 3 semanas, los ratones se asignaron al azar al control negativo (MC-CM-010-IRDye800CW) o al tratamiento MC-FA-010-IRDye800CW. Se administraron por vía intravenosa 5 nmol de cada Microcuerpo™. 0,5 h y 2 h después de la inyección, se sacrificaron los ratones y se aisló el tumor. La señal IR se midió ex vivo en un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS óptico in vivo.

Figura 11: Espectroscopía de resonancia de plasmón superficial de Microcuerpos y trímeros de estos que se unen a la rhuSeprasa: A: Espectrograma de asociación y disociación de MC-FA-010, ajuste 1:1; B: Espectrograma de asociación y disociación de MC-FA-012, ajuste 1:1; C:Espectrograma: Medición de ciclo único y ajuste 1:1 de DOTA-(MC-FA-012)$_3$, Diagrama: Análisis de estado estacionario correspondiente y ajuste 1:1; D: Espectrograma: Medición de ciclo único y ajuste 1:1 de AF680-(MC-FA-012)$_3$, Diagrama: Análisis de estado estacionario correspondiente y ajuste 1:1.

Figura 12: Espectroscopía de resonancia de plasmón superficial de variantes de Microcuerpo® MC-FA-012 que se unen a la rhuSeprasa: A: Espectrograma de asociación y disociación de FA8-D06, ajuste 1:1. B: Espectrograma de asociación y disociación de FA7-A05, ajuste 1:1; C:Espectrograma de asociación y disociación de FA8-C09, ajuste 1:1; D: Espectrograma de asociación y disociación de FA8-D03, ajuste 1:1; E: Espectrograma de asociación y disociación de FA8-D05, ajuste 1:1; F: Espectrograma de asociación y disociación de FA8-F04, ajuste 1:1; G: Espectrograma de asociación y disociación de FA8-G12, ajuste 1:1.

Figura 13: Espectroscopía de resonancia de plasmón superficial de andamios alternativos de unión a la Seprasa ET-FA-012 y MO-FA-012: A:Espectrograma de asociación y disociación de ET-FA-012, ajuste 1:1; B: Espectrograma de asociación y disociación de MO-FA-012.

Figura 14: Análisis de biodistribución de AF680- $(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ y AF680-$(MC\text{-}FA\text{-}0116)_3$, A: Obtención de imágenes in vivo de direccionamiento al tumor y distribución en órganos. B: Obtención de imágenes ex vivo de tumores y órganos diseccionados. Flecha: captación tumoral.

Figura 15: Comparación de señales de fluorescencia de AF680 acoplado a trímeros MC-FA-012 y MC-FA-0116 medido ex vivo después de 1, 2, 4, 6, 24 y 96 h después de la inyección. Se muestran los valores de eficiencia radiante total por peso en tumor, riñón, hígado y pulmón.

Figura 16: Tinción por inmunofluorescencia de cortes histológicos de TNBC que expresan Seprasa. Los microcuerpos usados se habían tetramerizado a través de conjugado de estreptavidina-Cy3 (SA-Cy3). Los fibroblastos activados se tiñeron con un anticuerpo anti-actina de músculo liso (SMA).

Figura 17: Las actividades de los órganos se midieron de 30 min a 24 h después de la administración intravenosa de $^{177}Lu\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$, calculado como el porcentaje de la dosis inyectada por peso de órgano [%ID/g].

Figura 18: Proyecciones de intensidad máxima (MIP) después de la administración iv de ~10 MBq de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ (fila superior: primer ratón, fila inferior: segundo ratón). La ubicación del tumor CT26-huSeprasa se indica por las flechas.

Figura 19: Valores de captación estandarizados (SUV) después de la administración iv de ~10 MBq de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ (fila superior: primer ratón, fila inferior: segundo ratón). La ubicación del tumor CT26-huSeprasa se indica por las flechas.

Figura 20: Obtención de imágenes por PET de animales pequeños: Valores de captación estandarizados de órganos seleccionados (ratón 1), Riñones izq: riñón izquierdo, Riñones der: riñón derecho; Tumor CT26 wt: Tumor CT26; Tumor CT26-FAP: Tumor CT26-huSeprasa.

Figura 21: Distribución en órganos de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx) en el paciente 1 (der = derecho, izq = izquierdo).

Figura 22: Distribución en órganos de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx) en el paciente 2 (der = derecho, izq = izquierdo).

Figura 23: Distribución en órganos de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ 1 y 2 horas después de la administración (SUV máx) en el paciente 3 (der = derecho, izq = izquierdo).

Figura 24: Distribución en órganos de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ 1 y 2,5 horas después de la administración (SUV máx) en el paciente 4 (der = derecho, izq = izquierdo).

Figura 25: Distribución en órganos de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx) en el paciente 5 (der = derecho, izq = izquierdo).

Figura 26: Vistas transaxiales, coronales y sagitales de una exploración con PET ilustrativa (paciente 3) 1 hora después de la inyección de 64 MBq de $^{68}Ga\text{-}(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$. La exploración muestra una clara captación en el tumor pancreático primario y la metástasis hepática. Ubicación del tumor y metástasis marcadas por círculos blancos.

Figura 27: Cortes histológicos de carcinoma pancreático y tejido normal teñidos con anticuerpo específico de Seprasa.

Figura 28: Cortes histológicos de carcinoma de mama triple negativo (TNBC) y tejido normal teñido con anticuerpo específico de Seprasa.

Figura 29: Cortes histológicos de carcinoma de pulmón y tejido normal teñido con anticuerpo específico de Seprasa.

EJEMPLOS

Las técnicas y métodos usados en la presente descripción se llevan a cabo de la forma conocida per se y como se describen, por ejemplo, en Sambrook y otros, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2da Edición (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, Nueva York. Todos los métodos, incluido el uso de kits y reactivos, se llevan a cabo de acuerdo con la información del fabricante a menos que se indique específicamente.

Ejemplo 1: Materiales y Métodos

Construcciones de plásmidos

La Seprasa humana de longitud completa optimizada en codones para CHO (número de acceso NCBI NP_004451) se sintetizó por Geneart y se subclonó en el vector pENTRcht (Invitrogen). El plásmido se verificó por secuenciación de ADN y se denominó pENTR-huSeprasa. Posteriormente, el inserto respectivo se transportó a un vector de transposón piggyBac

(serie PB53x EF1) mediante clonación Gateway (Invitrogen) para generar plásmidos de expresión de transposón. Estos plásmidos contienen un promotor EF1alfa para promover la expresión del ADNc, un casete IRES-EGFP e higromicina como marcador de selección. El plásmido se usó para la generación de una línea celular de expresión de Seprasa estable.

Mediante el uso del ADN del plásmido pENTR-huSeprasa como plantilla de PCR, se amplificó un fragmento de ADNc que codifica el dominio extracelular de la Seprasa (aminoácidos 29-760) con un cebador directo (5'-GCGCAAGCTTGCTGCGGCCCTCCCGGGTGCAC-3') y un cebador inverso (5'-GCGCAGCGGCCGCGTCGGACAGGGAGAAGCACTGC-3'). El producto de PCR, que excluye las secuencias de codificación tanto del dominio citoplasmático corto (aminoácidos 1-6) como del dominio transmembrana hidrófobo de la Seprasa (aminoácidos 7-29), se insertó en un vector pCEP4 modificado (Invitrogen). En comparación con pCEP4, el vector modificado contiene adicionalmente una secuencia consenso de Kozak, una etiqueta de fusión de hexahistidina (H6) y la secuencia de codificación de una señal de secreción de la región V-J2-C de la cadena kappa de Ig de ratón para la secreción eficiente de la proteína recombinante. La secuencia de ADNc del dominio extracelular de la Seprasa se insertó, en marco, junto con la señal de secreción N-terminal y la etiqueta H6 C-terminal, lo que permite una secreción eficiente, detección fácil (por anticuerpo anti-His; Invitrogen) y purificación rápida (mediante cromatografía de afinidad con quelato de Ni) de la Seprasa recombinante. El constructo final se verificó mediante secuenciación de ADN, se denominó pCEP4-IgKappa-huSeprasa-coCHO_26-760aa-H6 y se usó para la generación de la Seprasa humana recombinante soluble (rhuSeprasa).

Líneas celulares

Las células de ovario de hámster chino (CHO-K1) se obtuvieron de ATCC y se cultivaron en medio DMEM/F-12 suplementado con penicilina (100 unidades/ml), estreptomicina (100 mg/ml) y suero fetal bovino (FBS) al 10 % (v/v) inactivado por calor (Invitrogen). Las células se mantuvieron a 37 °C en atmósfera de aire humidificado con 5 % de CO_2 y se pasaron cada 48-72 horas. Las células CHO-K1 que expresan la Seprasa humana o las FALSAS (CHO-KI-FALSA y CHO-K1-huSeprasa) se cultivaron en las mismas condiciones que las células de tipo silvestre con la adición de 200 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). Para la producción de rhuSeprasa se usó la línea celular Freestyle™ CHO-S de Invitrogen. Esta línea celular en suspensión se ha distinguido como un subclon separado de la línea celular CHO-K1 común (D'Anna, 1996; D'Anna y otros, 1997; Deaven y Petersen, 1973). Las células se cultivaron en un matraz Erlenmeyer estéril desechable de policarbonato con tapa ventilada (125 ml o 500 ml) mediante el uso de 15-25 % del volumen nominal a 120-135 rpm (agitador de incubadora Minitron, Infors-HT) en condiciones humidificadas estándar (37 °C y 8 % de CO_2). Las células se subcultivaron cuando la densidad era aproximadamente 1-1,5 x 10^6 células viables/ml, típicamente cada 48-72 horas en medio químicamente definido libre de proteínas para células CHO (medio CD para CHO, Invitrogen) complementado con suplemento 1 X HT y glutamina 4 mM (Invitrogen).

Producción de Seprasa humana recombinante

Para la expresión a gran escala de la proteína Seprasa humana recombinante soluble (rhuSeprasa), se usó el sistema de expresión FreeStyle™ MAX CHO (Invitrogen); de acuerdo con las instrucciones del fabricante. En resumen, las células CHO-S se pasaron a 5-6 x 10^5 células/ml, se incubaron en condiciones humidificadas estándar a 120 rpm-135 rpm durante toda la noche en un agitador de incubadora Minitron (Infors-HT). Al día siguiente, las células se diluyeron a 1 x 10^6 células/ml en 150 ml en un matraz de agitación de 500 ml el día de la transfección. Se añadieron 187,5 µg de ADN de plásmido pCEP4-IgKappa-huSeprasa-coCHO_26-760aa-H6 a 3 ml de OptiPro™ SFM y se mezclaron. Se diluyeron 187,5 µl del reactivo de transfección FreeStyle™ MAX en 3 ml de OptiProSFM (Invitrogen) y se mezclaron suavemente. El reactivo de transfección FreeStyle™ MAX diluido se añadió a una solución de ADN diluida, se mezcló suavemente y se incubó durante 10 minutos a temperatura ambiente. El complejo reactivo DNA-FreeStyle™ MAX se añadió lentamente en el matraz de 500 ml que contenía células mientras se agitaba lentamente el matraz. Posteriormente, el cultivo celular transfectado se incubó en condiciones estándar. Cinco a siete días después de la transfección, el sobrenadante se cosechó y se purificó mediante cromatografía convencional de afinidad con quelato de Ni y cromatografía de exclusión por tamaño mediante el uso de una columna HisTrap HP (GE Healthcare) y HiLoad 26/600 Superdex 200 grado preparativa para SEC (GE Healthcare), respectivamente. Una porción de la proteína purificada se biotiniló por incubación con un exceso molar de 10 veces de EZ-Link Sulfo-NHS-LC-Biotin (Pierce) en PBS pH 8,8 durante 2 h en hielo. La proteína se almacenó a -20 °C después del intercambio de tampón a PBS suplementado con manitol al 5 % (Roth) y trehalosa al 5 % (Applichem).

Generación de líneas celulares que expresan Seprasa estables

Se usó el reactivo Polietilenimina, lineal, MW 25000 (PEI) (Polysciences. Inc) como el reactivo de transfección. Se establecieron líneas celulares estables con el sistema de transposón PiggyBac. Brevemente, este sistema consiste en un vector donante que porta un transposón artificial con un casete de expresión de mamífero para el transgén recombinante y un vector auxiliar que promueve la expresión transitoria de la transposasa PB (PBasa) (Invitrogen). Un día antes de la transfección, se sembraron en placas 3 × 10^5 células CHO-K1 en 2 ml de medio de crecimiento por pocillo en una placa de seis pocillos. Las células CHO-K1 se cotransfectaron con 2 µg de plásmido vector de transposón y 0,8 µg de plásmido vector de transposasa. Tres días después de la transfección, las células se dividieron y se colocaron en medios que contenían 200 µg/ml de higromicina B (Invitrogen). Después de 2 semanas de selección por higromicina, se analizó la eficiencia de la transfección y la expresión del objetivo mediante citometría de flujo, transferencia de Western y análisis

de inmunofluorescencia. La funcionalidad se probó mediante un ensayo de actividad enzimática mediante el uso del sustrato Z-Gly-Pro-AMC (Bachem).

Análisis de citometría de flujo

Para la citometría de flujo, se colectaron 1 x 10^6 células, se lavaron una vez con tampón de FACS (PBS + EDTA 0,5 M + FBS al 5 %) y se incubaron con un anticuerpo contra la Seprasa humana (clon 1E5, Abnova; dilución 1:50) o con concentraciones diferentes de fusiones Tiorredoxina-A (Trx)-miniproteína durante 1 h en hielo. Para analizar la unión de miniproteínas tetramerizadas, las miniproteínas biotiniladas se preincubaron con un exceso molar de cinco veces de Estreptavidina-APC (Affymetrix eBioscience) durante 10 minutos a temperatura ambiente. Después de la incubación, las células se lavaron tres veces con tampón de FACS. Las células tratadas con miniproteínas tetramerizadas se usaron directamente para el análisis de citometría de flujo. Para analizar la expresión de la Seprasa o la unión de la miniproteína monovalente, las células se tiñeron con un anticuerpo anti-ratón secundario marcado con Cy5 (Dianova) o con anticuerpo anti-H6 marcado con PE (R&D Systems, detecta la etiqueta H6 interna dentro de la fusión Trx-miniproteína). Después de 30 minutos, las células se lavaron nuevamente con tampón de FACS y se analizaron mediante el uso de un dispositivo FACS Canto II (Becton Dickinson). La clasificación del análisis se estableció en células viables identificadas de acuerdo con las características de dispersión frontal/dispersión lateral. Los datos se analizaron mediante el uso del programa informático FlowJo (Versión 10, Tree Star Inc.).

Inmunohistoquímica

Los tumores se extirparon inmediatamente, se transfirieron a casetes de inclusión y se fijaron durante toda la noche a 4 °C en Roti-Histo-Fix al 4 % (pH 7) (Roth). Después de la fijación, los tumores se lavaron en etanol al 70 % para eliminar el exceso de solución de fijación. Posteriormente, los tumores se deshidrataron en una serie ascendente de alcohol y se incluyeron en parafina en un procesador de tejidos. El corte histológico en serie (3 µm de grosor) de los tumores embebidos se realizó con un micrótomo. Los cortes histológicos se montaron en portaobjetos de vidrio y se desparafinaron y rehidrataron en una serie descendente de alcohol. Después, los cortes histológicos se hirvieron durante 20 minutos con tampón citrato 10 mM (pH 6) en un microondas. Después de lavar con 1 x PBST, la unión inespecífica se bloqueó con BSA al 3 % en PBST durante 30 minutos. Se añadió anticuerpo policlonal anti-SMA 1:500 (Abcam) o miniproteína biotinilada 1 µM, que se preincubó con Estreptavidina-Cy3 (Rockland) antes para la tetramerización, y se incubó durante toda la noche a 4 ºC. Después de lavar los cortes histológicos tres veces con 1 X PBST, se detectó la unión del anticuerpo anti-SMA con el anticuerpo secundario IgG anti-conejo-FITC diluido 1:200 (Dianova). Los anticuerpos secundarios se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente en la oscuridad. Finalmente, los cortes histológicos se lavaron tres veces con PBS y posteriormente se incubaron con colorante Hoechst (Sigma-Aldrich), se diluyeron 1:5000 en 1 X PBS durante 10 minutos y se montaron en medio de montaje (Darko).

Para evaluar los niveles de expresión de la Seprasa en TNBC, se realizaron análisis inmunohistoquímicos de carcinoma de pulmón y de páncreas. Como control positivo se usaron tejidos de CHO-K1-huSeprasa con niveles de expresión positivos de Seprasa y como control negativo cortes histológicos de colon humano.

Para la inclusión en parafina, se desparafinaron cortes histológicos de tejido de páncreas de 3 µm de espesor con xileno y etanol graduado. La recuperación del antígeno se realizó al calentar los cortes histológicos en tampón citrato de sodio 10 mM, pH 6,0 + Tween-20 al 0,05 % a 120 °C, enfriado durante 10 min. Las muestras se enfriaron durante 15 minutos en PBS + H_2O_2 al 0,3 %. Los cortes histológicos de tejido congelado (tejido de mama y pulmón) se cortaron a 5 - 8 µm en un criostato. Los cortes histológicos se descongelaron durante 10 minutos a temperatura ambiente, se rehidrataron durante 5 minutos en PBS y se enfriaron durante 10 minutos en BLOXALL (Vectorlabs).

Todos los cortes histológicos se incubaron con suero de cabra normal al 10 % a temperatura ambiente durante 30 minutos para bloquear las reacciones no específicas. Esto se siguió por incubación con anticuerpo policlonal de conejo anti-Seprasa humana (Sigma) diluido a 0,5 µg/ml durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de lavar con PBS, los cortes histológicos se incubaron durante 30 minutos con el anticuerpo secundario (anti-conejo HRP Power-Vision). La localización de la inmunotinción se demostró por incubación con el sistema Vector NovaRED (Vector Laboratories). La contratinción con hematoxilina de Mayer y la deshidratación de los cortes histológicos se realizaron con un Multistainer ST5020 (Leica). Posteriormente, los portaobjetos se montaron con medio de montaje XTRA-Kitt Medite.

Selecciones de presentación de fagos frente a rhuSeprasa

Una biblioteca aleatoria de knotina que comprende aproximadamente 1 x 10^{10} variantes individuales se aplicó para las selecciones de presentación de fagos frente a rhuSeprasa. La biblioteca se basa en el inhibidor de tripsina II de cadena abierta de Momordica cochinchinensis (oMCoTi-II, (Avrutina, Schmoldt y otros, 2005)). Se llevaron a cabo tres rondas de selección mediante el uso de rhuSeprasa inmovilizada en tubos inmunológicos Maxisorp™ (Thermo Scientific) o mediante perlas magnéticas recubiertas con estreptavidina (Dynabeads 280 Streptavidin, Life Technologies).

Producción de variantes de miniproteína

Las variantes de miniproteína biotinilada se compraron de Pepscan. En estos casos, las miniproteínas se generaron mediante síntesis convencional de péptidos en fase sólida seguida de plegamiento termodinámico a la estructura de nudo de cistina nativa. En todos los demás casos, las miniproteínas se produjeron recombinantemente mediante el uso de un sistema de fusión basado en Tiorredoxina-A (Trx) en combinación con cepa Shuffle™ T7 Express (NEB) de E. coli que permite la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma del huésped bacteriano (Lobstein, Emrich y otros, 2012). Para la síntesis recombinante semipreparativa o analítica, los genes que codifican la variante de miniproteína se clonaron en el vector pET-32-LibEx mediante sitios de restricción únicos Bam HI y Apa I para producir una fusión tetrapartita que consiste de tiorredoxina-A, una etiqueta His (H6), una etiqueta S y el gen de la miniproteína. Para la producción semi-preparativa de miniproteínas, la expresión se realizó en matraces de agitación 1 1 mediante el uso de medio de caldo de lisogenia estándar (LB), mientras que la producción a escala analítica (por ejemplo, para la identificación de aciertos o el análisis de mutantes de alanina de MC-FA-010) se realizó en placas de 96 pocillos mediante el uso del medio de autoinducción (MagicMedia™, Life Technology). Después de la expresión, las células se cosecharon y se lisaron con lisozima o mediante sonificación en combinación con un ciclo de congelación/descongelación. En ambos casos, los lisados celulares clarificados se sometieron a una etapa de calentamiento a 80 °C durante 10 minutos para eliminar una gran cantidad de proteínas de la célula huésped. La preparación de proteína resultante se usó directamente para el análisis de unión por ELISA (por ejemplo, para fines de identificación de aciertos) o se purificó adicionalmente mediante cromatografía de afinidad con quelato de Ni mediante el uso de columnas de centrifugación Ni-NTA (Qiagen, escala analítica) o columnas HisTrap HP de 5 ml (GE Healthcare, escala semi-preparativa). Para la generación de miniproteínas sin etiqueta, las fusiones de trx-miniproteína se escindieron con trombina (Sigma) mediante incubación durante toda la noche a 37 °C con 0,5 U de Trombina/mg de proteínas de fusión. Las miniproteínas pudieron entonces aislarse por HPLC mediante el uso de una columna TSKgel ODS-120T (Tosoh Bioscience). Las preparaciones finales de miniproteína, obtenidas después de la liofilización de las respectivas fracciones de HPLC, se analizaron mediante espectrometría de masas y cromatografía de exclusión por tamaño analítica mediante el uso de una columna BioSep-SEC-S2000 (Phenomenex). Los rendimientos se calcularon por pesaje o mediciones de DO (280 nm).

Transferencia de Western

Se cultivaron 1 x 10^5 células en una placa de cultivo, se lavaron una vez con 1 X PBS frío y se lisaron en 500 µl de tampón de lisis 4 X SDS (Tris-HCl 250 mM, glicerol al 34 %, SDS al 8,2 %, β-mercaptoetanol al 5 %). Las células se rasparon con un raspador de células y para eliminar los restos celulares, los lisados se centrifugaron durante pocos minutos a 14 000 x g a 4 °C. Posteriormente, los lisados se sonicaron. Una alícuota del lisado se hirvió con 4 X tampón de lisis SDS añadido con azul de bromofenol y se analizó por SDS-PAGE y posteriormente por transferencia de Western. Los siguientes anticuerpos se usaron para la detección: como anticuerpo primario: anti-Seprasa (Abcam), anti-His (Abcam) o anti-β-Actina y como un anticuerpo secundario anti-ratón-HRP (clon).

Identificación de aciertos

Después de tres rondas de selección de presentación en fagos, los grupos resultantes se subclonaron en el vector de expresión pET-32-LibEx para permitir la identificación de supuestos agentes de unión a rhuSeprasa independientemente del fondo de fago. Para este fin, los grupos de genes de miniproteína respectivos se amplificaron por PCR con oligonucleótidos específicos. El producto de PCR resultante se purificó, se escindió con enzimas de restricción Bam HI y Apa I y se ligó con vector de expresión de digestión de manera similar. Después de la transformación de Shuffle™ T7 Express de E. coli se seleccionaron los clones individuales y se produjeron proteínas de fusión con Trx en un formato de 96 pocillos como se describió anteriormente. Para el análisis de unión se realizó un ensayo ELISA. Por lo tanto, una placa MaxiSorp de 96 pocillos (Nunc/Thermo Fisher Scientific) se revistió con proteína objetivo o BSA (cada 100 µl de solución de proteína 5 µg/ml en carbonato de sodio 50 mM, pH 9,4). La unión a la proteína objetivo corresponde a la "señal" y la unión a BSA corresponde al "ruido". Para la normalización de placas individuales, se analizó por triplicado la unión de MC-Myc-010 (miniproteína de nudo de cistina de unión a Myc) y el anticuerpo anti-cMyc (clon 9E10). El recubrimiento se realizó durante toda la noche a 4 °C. Los pocillos se lavaron 3 veces con 300 µl de solución salina tamponada con fosfato que contenía Tween 20 al 0,1 % (pH 7,4, PBS-T). Después, se bloquearon los pocillos durante 2 h con solución de bloqueo (Sigma Aldrich). Después de una etapa de lavado (3x PBS-T), los lisados que contenían proteína de fusión Trx se diluyeron 1:5 y se incubaron durante 1 h a 4 °C con proteínas recubiertas. La etapa de lavado e incubación se repitió mediante el uso de anticuerpo anti-etiqueta S (1:2000 en PBS, abcam). Antes de la detección, la etapa de lavado se realizó dos veces (3x PBS-T y 3x PBS). La detección se llevó a cabo mediante el uso de sustrato líquido 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (solución TMB, Sigma-Aldrich) y un aumento de la absorción a 450 nm (detectado en el lector de ELISA Tecan M200 Pro). La expresión de clones individuales se analizó mediante electroforesis E-PAGE de 96 pocillos (Life Technologies) y cuantificación de bandas de proteínas mediante el paquete de programa informático ImageQuant TL (GE Healthcare). Para clasificar las proteínas, se calcularon las relaciones de señal con respecto al ruido de los ELISA y se correlacionaron con los valores de expresión. Después, los 30 clones principales se usaron para un análisis posterior.

Análisis de unión mediante ELISA

Se realizaron ELISA para evaluar y comparar las propiedades de unión y la especificidad de las variantes de miniproteínas. Para este fin, se han usado ya sea proteínas recombinantes o células enteras. Para el análisis ELISA de células enteras se sembraron 5 x 10^5 células en cada pocillo de una placa de fondo plano de 96 pocillos (Coming). Después, las células se incubaron durante 20 horas a 37 °C en atmósfera de aire humidificado-5 % de CO_2. Posteriormente, los pocillos se

bloquearon con leche en polvo al 5 %/PBS durante 1 hora a temperatura ambiente. Después de eliminar el tampón de bloqueo, se añadió una solución de Trx-miniproteína a cada pocillo, y se incubó con las células durante 1 hora a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron 6 veces exhaustivamente con PBS-T (PBS + Tween-20 al 0,1 %) y se detectó la cantidad de miniproteínas unidas con anticuerpo anti-etiqueta de S conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP). Se usó 3,3',5,5'-tetrametilbencidina (TMB) (Sigma) como sustrato cromogénico. Las reacciones de la enzima HRP se detuvieron con HCl 0,2 M después de aproximadamente 20 min y la placa se midió en un lector de placas Victor V3 (Perkin Elmer) a 450 nm. Para los estudios de competición, la proteína de fusión Trx-MC-FA-010 0,1 µM se mezcló previamente con diferentes concentraciones de miniproteína MC-FA-010 en solitario (1 - 200 µM) antes de la incubación con las células.

Para el análisis ELISA basado en proteínas, se inmovilizaron 5 µg de la proteína recombinante respectiva (rhuSeprasa; estreptavidina: Sigma; DPP-IV: R&D Systems, BSA: Eurobio) por pocillo de una placa MaxiSorp™ (Nunc) por incubación durante toda la noche en tampón de recubrimiento a 4 ºC. Después de lavar tres veces con 300 µl de PBS-T/pocillo en un lavador de placas Hydrospeed (Tecan), los pocillos se bloquearon con solución 1 X caseína (Sigma, diluida en PBS) durante 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente, los pocillos se lavaron como se indicó anteriormente. A continuación, se añadieron 100 µl de la fusión de Trx-miniproteína respectiva diluida en PBS-T y se incubaron durante 1 hora a 4 ºC. La proteína purificada simplemente por etapa de calor se diluyó 1:5, las proteínas purificadas por afinidad se aplicaron en concentraciones definidas que variaban de 0,39 - 50 nM. Para los ELISA de competición, se mezcló una concentración fija de fusión Trx-miniproteína 3 nM con una concentración variable (0,64 - 3167 nM) de miniproteína en solitario antes de la incubación. La unión de la fusión con Trx se detectó después de un procedimiento de lavado con PBS-T mediante el uso del anticuerpo anti-etiqueta S acoplado a HRP como se describió anteriormente. La Kd aparente se calculó mediante el uso de Sigma plot 10 y un modelo de unión de saturación de un sitio para el ajuste de los datos.

Análisis por SPR

Para obtener información sobre las propiedades de unión cinéticas, se realizó un análisis de resonancia de plasmón superficial (SPR) en un dispositivo Biacore T100 (GE Healthcare). Después, la rhuSeprasa se inmovilizó en un chip CM5 a través de un acoplamiento mediado por NHS/EDC como lo describe el fabricante a 10 µl/min durante 420 seg. La unión de MC-FA-010 en concentraciones variables (37, 111,1, 333,3, 1000 y 3000 nM) a la rhuSeprasa inmovilizada se midió durante un período de tiempo de 90 segundos para la asociación y disociación. Los valores de Kd se calcularon mediante el uso del programa informático proporcionado.

La cinética y la afinidad de MC-FA-010 monomérico y oligomérico y las variantes de este a la Seprasa humana recombinante (rhuSeprasa) se determinaron mediante espectroscopía de resonancia de plasmón superficial (Biacore T-100, GE Healthcare). Se inmovilizó rhuSeprasa (20 µg/ml en PBS, manitol al 5 %, trehalosa al 5 %) en un chip sensor de la serie S CM5 amino reactivo (GE Healthcare). Para el análisis de unión de microcuerpos monoméricos se cargó rhuSeprasa a un máximo de 7500 RU, para microcuerpos oligoméricos a un máximo de 700 RU. Los microcuerpos monoméricos se midieron mediante el uso de un método cinético de múltiples ciclos en un intervalo de concentración de 3,125 a 1000 nM basado en la constante de disociación esperada. La etapa de asociación se midió durante un período de tiempo de 60-90 segundos, la disociación durante 420 segundos. Los microcuerpos triméricos se midieron mediante el uso de un método de cinética de ciclo único en un intervalo de concentración de 0,3125 a 5 nM (asociación durante 90 segundos, disociación 420 segundos). La cinética de unión y el análisis de estado estacionario se calcularon mediante el uso de un modelo de unión 1:1 (programa informático de evaluación Biacore T-100, GE Healthcare).

Mutagénesis por barrido de alanina de MC-FA-010

Para obtener información sobre la relación estructura-actividad del agente de unión a la Seprasa MC-FA-010, se realizó una mutagénesis por barrido de alanina. Por lo tanto, cada aminoácido individual de la región variable se intercambió por alanina a nivel de ADN. Geneart sintetizó los genes mutantes como Strings™ de ADN y se clonaron directamente en el vector de expresión pET-32-LibEx mediante sitios de restricción únicos Bam HI y Apa I. La producción de variantes de alanina se realizó en placas de microtitulación de 96 pocillos mediante el uso de la cepa Shuffle™ T7 Express de E. coli como se describió anteriormente. Después de la purificación con columnas de centrifugación Ni-NTA (Qiagen), se analizaron las propiedades de unión de las variantes mediante ELISA y en comparación con la miniproteína de tipo silvestre MC-FA-010.

Maduración de la afinidad

En base a los datos obtenidos a partir de la mutagénesis por barrido de alanina y el motivo de unión identificado de MC-FA-010/-012, se generó una segunda biblioteca de fagos. En esta biblioteca, las posiciones fundamentales de aminoácidos para la unión a la Seprasa se mantuvieron constantes (Y, W y la secuencia GRGP), mientras que todas las otras posiciones del lazo de unión se aleatorizaron mediante el uso de todos los aminoácidos posibles, excepto la cisteína. Esta biblioteca se examinó nuevamente contra la Seprasa humana soluble recombinante, al aplicar cuatro condiciones diferentes que varían con respecto a la rigurosidad (presentación monovalente o polivalente, con o sin competencia con la miniproteína MC-FA-012 libre, diferentes condiciones de lavado). Después de tres ciclos de selección, todos los grupos se clonaron en el vector de expresión pET-32. Para cada grupo, se expresaron y analizaron 96 clones mediante el uso

del proceso de identificación de aciertos descrito anteriormente. Se seleccionaron 26 de los clones mejor clasificados, se produjeron en mayores cantidades y se analizaron con más detalle.

Análisis de biodistribución y direccionamiento al tumor de Conjugados Microcuerpo® AlexaFluor-680 mediante el uso de obtención de imágenes ópticas in vivo en el infrarrojo cercano

Para los ensayos de obtención de imágenes in vivo se usaron ratones Fox nl nu hembras (6-8 semanas de edad, Harlan, Envigo). Los experimentos se realizaron de acuerdo con las regulaciones nacionales y se aprobaron por el comité de ética local de experimentos con animales. Las células subconfluentes CHO-K1-huSeprasa se cosecharon y resuspendieron en PBS a una densidad de 1 x 10^7 células/ml. Antes de la inoculación, la viabilidad celular se probó mediante un ensayo de exclusión con azul de tripano al 0,4 % (células viables > 90 %). Para la inyección subcutánea, se mezclaron 1 x 10^6 células CHO-K1-huSeprasa en 100 µl de PBS con 100 µl de Matrigel (Corning) y se inyectaron en el lado derecho de la extremidad posterior. Cuando los volúmenes tumorales alcanzaron 600-800 mm^3, los animales se separaron al azar en varios grupos para diferentes tratamientos (n = 3 para cada grupo). Después, se inyectaron por vía intravenosa 1,67 nmol de AF680-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ o el control Microcuerpo® AF680-$(MC\text{-}FA\text{-}0116)_3$. En diferentes puntos temporales después de la inyección, los ratones se anestesiaron por inhalación de isoflurano. La obtención de imágenes in vivo se realizó mediante el uso de un sistema de obtención de imágenes Xenogen IVIS Spectrum (Perkin Elmer, EE.UU.). Las señales máximas del infrarrojo cercano (NIRF) se cuantificaron mediante el uso del programa informático de análisis de imágenes Living Image 2.5 (Xenogen, Perkin Elmer). Para la obtención de imágenes ex vivo de NIRF, los ratones se sacrificaron, y el tumor y los órganos principales de cada ratón se extirparon, se pesaron y se analizaron por el sistema Xenogen IVIS.

Análisis de inmunofluorescencia

El MC-FA-012 biotinilado 1 µM y el control MC-FA-0116 se preincubaron con Estreptavidina-Cy3 (Rockland) (relación molar 5:1) durante 30 min a temperatura ambiente. Los criocortes histológicos (6 µm) de tejidos se fijaron con acetona y se bloquearon con BSA/PBS al 3 % para evitar la unión no específica. Después, los tejidos se tiñeron con anticuerpo anti-SMA (Abcam) para detectar fibroblastos activados y con la mezcla Microcuerpo-Estreptavidina durante 30 min a 37 °C. Los cortes histológicos se enjuagaron después y se incubaron durante 30 min con anticuerpos secundarios conjugados Alexa 488 (Abcam) a 37 °C. Finalmente, los cortes histológicos se lavaron nuevamente, se incubaron con Hoechst 33258 (Sigma-Aldrich) para detectar núcleos, se lavaron nuevamente dos veces y se montaron en medio de montaje para fluorescencia (Dako). Después, se examinaron los cortes histológicos con un microscopio de fluorescencia invertido (Zeiss AxioObserver.Zl).

Obtención de imágenes por PET y distribución en órganos en animales pequeños

Marcaje con ^{177}Lu de DOTA-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$

Se disolvieron 2,5 nmol de trímero MC-FA-012 en 50 µl de tampón de acetato de sodio 0,1 M pH 5,0 y se mezclaron con 1 µl de una solución acuosa de ácido ascórbico al 20 %. Se añadieron 2,5 µl de $^{177}LuCl_3$ en tampón de acetato de sodio 0,4 M pH 5,0 (~ 25 MBq). La mezcla se calentó durante 15 min a 95 ºC y se diluyó hasta un volumen total de 2,5 ml mediante el uso de solución salina al 0,9 %. El radiomarcaje se realizó sin ninguna separación del compuesto marcado y no marcado. El rendimiento radioquímico se determinó por RP-HPLC analítica. ^{177}Lu-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ corresponde a DOTA-$(MC\text{-}FA\text{-}012)^3$ marcada con $_{177}Lu$.

Marcaje con ^{68}Ga de DOTA-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$

^{68}Ga se obtuvo de un generador $^{68}Ge/^{68}Ga$ como $[^{68}Ga]GaCl_3$ en HCl 0,6 M. Se mezclaron 5 nmol de trímero MC-FA-012 y 10 µl de una solución acuosa de ácido ascórbico al 20 % con 550 µl del eluato-^{68}Ga y se neutralizaron con 160 µl de tampón de acetato de sodio 2,5 M (pH 8) a un pH final de 3,5. La mezcla se calentó durante 13 minutos a 95 °C, se purificó mediante el uso de un cartucho de extracción en fase sólida (Agilent Varian Bond Elut Plexa) y se diluyó en solución salina al 0,9 %. El radiomarcaje se realizó sin ninguna separación del compuesto marcado y no marcado. El rendimiento radioquímico se determinó por RP-HPLC analítica. ^{68}Ga-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ corresponde a DOTA-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ marcado con ^{68}Ga.

Pruebas in vivo de DOTA-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$ radiomarcado

Para los experimentos in vivo, ratones BALB/c nu/nu de 8 semanas de edad (Charles River) se inocularon por vía subcutánea en el tronco derecho con 5 × 10^6 células CT26-huSeprasa, respectivamente. Para los experimentos de obtención de imágenes (n = 2), se inyectaron adicionalmente 5 × 10^6 células CT26 de tipo salvaje en el tronco izquierdo como control. Cuando el tamaño del tumor alcanzó aproximadamente 1 cm^3, el compuesto radiomarcado se inyectó a través de la vena de la cola (~10 MBq para la obtención de imágenes por PET de animales pequeños; ~1 MBq para distribución en órganos).

Distribución en órganos de ^{177}Lu-$(MC\text{-}FA\text{-}012)_3$

Para la distribución en órganos, los animales (n = 3 para cada punto temporal) se sacrificaron después de los puntos temporales indicados (de 30 min a 24 h). La radioactividad distribuida se midió en todos los órganos diseccionados y en sangre mediante el uso de un contador γ. Los valores se expresan como porcentaje de dosis inyectada por gramo (%ID/g).

Obtención de imágenes por PET de animales pequeños con ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$

La obtención de imágenes por PET se realizó mediante el uso del escáner PET de animales pequeños Inveon PET (Siemens). Después de una exploración de transmisión de 15 minutos, los ratones anestesiados se inyectaron con aproximadamente 2,5 nmol de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ (~10 MBq). Dentro de los primeros 60 minutos se realizó una exploración dinámica, seguida de una exploración estática de 120 a 140 min después de la inyección. Las imágenes se reconstruyeron de forma iterativa mediante el uso del método 3D-OSEM+MAP (Siemens) y se convirtieron en imágenes de valor de captación estandarizado (SUV). La cuantificación se realizó mediante el uso de una técnica de ROI y se expresó como media de SUV.

Fines diagnósticos y terapéuticos

Marcaje con ^{68}Ga de DOTA-(MC-FA-012)$_3$

El ^{68}Ga (vida media 68 min; energía de positrones máx. 1,9 MeV [β^+ 89 %]) se obtuvo a partir de un generador ^{68}Ge/^{68}Ga como [^{68}Ga]GaCl$_3$ en HCl 0,6 M. Se añadieron 2,5 nmol de DOTA-(MC-FA-012)$_3$ y 10 µl de una solución acuosa de ácido ascórbico al 20 % a 1 ml del eluato-^{68}Ga (~ 0,8 - 1 GBq) y se diluyó con 280 µl de tampón de acetato de sodio 2,5 M (pH 8) hasta un pH final de 3,5. La mezcla se incubó a 95 °C durante 15 min, se purificó mediante el uso de un cartucho de extracción en fase sólida (Agilent Varian Bond Elut Plexa) y se diluyó en solución salina al 0,9 %. El radiomarcaje se realizó sin ninguna separación del compuesto marcado y no marcado. El rendimiento radioquímico se determinó mediante RP-HPLC analítica.

Marcaje con ^{177}Lu de DOTA-(MC-FA-012)$_3$

El ^{177}Lu (vida media 6,71 d; energía de electrones máx. 497 keV [β^- 79 %]; energía de fotones máx. 113 keV [6 %], 208 keV [11 %]) se adquirió de ITG GmbH Garching como [^{177}Lu]LuCl$_3$ en solución acuosa de HCl 0,04 M. Se disolvieron 15 nmol de DOTA-(MC-FA-012)$_3$ en 100 µl de tampón de acetato de sodio 0,4 M pH 5,0 y se mezclaron con 10 µl de una solución acuosa de ácido ascórbico al 20 %. Se añadieron 70 µl de ^{177}LuCl$_3$ en tampón de acetato de sodio 0,4 M pH 5,0 (~2,5 GBq). La mezcla se incubó a 95 °C durante 15 min y se diluyó hasta un volumen total de 5 ml mediante el uso de solución salina al 0,9 %. El radiomarcaje se realizó sin ninguna separación del compuesto marcado y no marcado. El rendimiento radioquímico se determinó mediante RP-HPLC analítica y cromatografía de capa fina instantánea (ITLC-SG) con una solución de citrato de sodio 0,5 M pH 5 con y sin metanol al 10 % como solvente.

Obtención de imágenes por PET

La obtención de imágenes para diagnóstico se realizó mediante el uso de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$, el cual se aplicó por vía intravenosa (2,5 nmol, 63-359 MBq). La variación de la actividad del radiomarcador inyectado se produjo por la vida media corta de ^{68}Ga y las eficiencias de elución variables obtenidas durante la vida útil del generador de ^{68}Ge/^{68}Ga. Los pacientes se investigaron 1 y aprox. 3 horas después de la administración de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ mediante el uso del escáner PET/CT Siemens Biograph-mCT Flow. Después de realizar una tomografía computarizada para la corrección de la atenuación, se adquirieron barridos de emisión estática, corregidos por tiempo muerto, dispersión y decaimiento. Las imágenes se reconstruyeron de forma iterativa y se convirtieron en imágenes de valor de captación estandarizado (SUV).

La obtención de imágenes médicas después de la administración de ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$ se realizó mediante el uso de la cámara gamma GE Millenium VG5 Hawkeye un día después de la inyección intravenosa de aprox. 2,5 GBq.

Ejemplo 2: Ingeniería del mutante oMCoTi-II de unión a la FAPα humana MC-FA-010

La miniproteína de nudo de cistina de unión a FAPα MC-FA-010 se aisló de una biblioteca de oMCoTi-II basada en fagos muy diversa (que contiene 1 x 10^{10} variantes individuales). El análisis de secuencia de un clon enriquecido después de tres rondas de selección reveló una secuencia de miniproteína con 35 aminoácidos (aa) de longitud (Figura 1).

Para analizar la relación estructura función de la miniproteína identificada se realizó una mutagénesis por barrido de alanina (Figuras 2A+B). La unión dependiente de la concentración de las variantes MC-FA-010 a la Seprasa humana se midió en una configuración ELISA directo mediante el uso de proteína objetivo recombinante y los valores de EC50 se calcularon por medio de un modelo de unión de saturación de un sitio (Sigma plot 10). La Figura 2A muestra un resumen de todos los datos de unión. La unión de mutantes de alanina se muestra como unión relativa en comparación con la secuencia original de MC-FA-010. La unión conservada/aumentada (pérdida de unión débil, respectivamente) se muestra en colores verdes, la unión débil y moderada en naranja y la ausencia de unión (pérdida completa de unión) en rojo.

La mutagénesis por barrido de alanina reveló un motivo de unión que consiste en dos aminoácidos aromáticos y cuatro alifáticos (YXXWXXGRGP, Figura 2B). La alta especificidad de la secuencia dada se muestra como un único intercambio

de alanina que elimina completamente la unión de MC-FA-010 a la Seprasa humana. Una variante, MC-FA-012 (K2A), mostró una afinidad aún mayor (160 %) a la Seprasa en comparación con el Microcuerpo™ de tipo silvestre MC-FA-010. Esta variante se incluyó también en enfoques de funcionalización posteriores.

Ejemplo 3: Unión al objetivo del mutante oMCoTi-II de unión a la FAPα humana MC-FA-010 y variantes de este

MC-FA-010 muestra afinidad por la Seprasa humana en un rango nanomolar

La afinidad de la unión de MC-FA-010 a la Seprasa humana recombinante se midió mediante el uso de un ELISA dependiente de la concentración. Las placas se revistieron con la fracción soluble de la Seprasa humana y se añadió MC-FA-010 como una proteína de fusión a la tiorredoxina (Trx-MC-FA-010) en un intervalo de concentración de 0,39 a 50 nM. La detección de la miniproteína unida se logró a través del anticuerpo conjugado anti-etiqueta de S-HRP (la etiqueta de S se proporciona por el sistema de expresión de fusión de tiorredoxina, Figura 3A). Los valores de EC_{50} se calcularon mediante el uso del modelo de unión de saturación de un sitio en Sigma plot 10. Además, la unión de Trx-MC-FA-010 3 nM compitió con el MC-FA-010 monovalente soluble en un intervalo de 0,64 a 3167 nM (Figura 3B) lo que mostró una competencia específica de la unión. Ambos valores, EC50 e IC50, muestran una afinidad de unión de MC-FA-010 a la Seprasa humana en el rango nanomolar.

Esos experimentos muestran una unión específica de MC-FA-010 a la Seprasa humana en general. Como siguiente etapa, se realizó un análisis más detallado de la cinética de unión mediante el uso de la tecnología de resonancia de plasmón superficial (SPR). Por lo tanto, la Seprasa humana recombinante se inmovilizó en un chip CM5 (GE Healthcare) con una superficie aminorreactiva. La asociación y disociación del MC-FA-010 monovalente soluble se midió en una serie de concentraciones (37, 111,1, 333,3, 1000 y 3000 nM) mediante el uso de un sistema Biacore T100. Se ajustaron los datos de asociación y disociación y se calcularon los valores cinéticos y de constante de disociación correspondientes (Kon, Koff y Kd) mediante el uso del programa informático proporcionado del sistema (Figuras 4A y B). El análisis por SPR revela una constante de disociación de aproximadamente 560 nM y, por lo tanto, confirma la afinidad medida previamente en el rango nanomolar según se analizó mediante ELISA.

MC-FA-010 muestra una alta selectividad para la Seprasa humana

Para analizar la selectividad del MC-FA-010 por la Seprasa humana, se estudió la unión a la dipeptidil peptidasa IV (DPP IV, CD26) estrechamente relacionada. DPP IV es una glicoproteína unida a la membrana de 88 kDa que también puede escindirse proteolíticamente en una forma soluble que carece de 38 aa en el extremo amino terminal. La Figura 5A muestra una superposición estructural de la Seprasa representada en verde y la DPP IV representada en cian o gris (Pymol). La Seprasa y la DPP IV comparten 52 % de identidad de secuencia y 71 % de similitud. La selectividad de MC-FA-010 para la Seprasa se analizó mediante ELISA. La Seprasa humana y la DPP IV se recubrieron respectivamente y se midió la unión de Trx-MC-FA-010 en una serie de concentraciones de 0,1 a 100 nM.

Como se esperaba, MC-FA-010 se une fuerte y selectivamente a la Seprasa. Solo pudo detectarse una señal muy débil para la unión de MC-FA-010 a la DPP IV en la concentración más alta medida (Figura 5B). Por lo tanto, MC-FA-010 muestra una alta selectividad por la Seprasa.

MC-FA-010 se une específicamente a las células que expresan la Seprasa

Para investigar la unión de MC-FA-010 a células CHO-K1 que sobreexpresan la Seprasa humana (CHO-K1-Seprasa), se realizó una tinción de inmunofluorescencia. Se usaron células CHO-K1-FALSA negativas al objetivo y un control negativo Microcuerpo™ como controles para excluir la unión no específica del Microcuerpo™ a las proteínas no relacionadas en la superficie celular. Antes de la incubación con las células, MC-FA-010 y el Microcuerpo™ control se biotinilaron y se preensamblaron en estreptavidina conjugada con Cy3. En comparación con CHO-K1-FALSA, se detectó una unión específica de MC-FA-010-bio/SA-Cy3 en CHO-K1-Seprasa. Como se esperaba, el Microcuerpo™ control no se une a las células CHO-K1-Seprasa (Figura 6). Esto demuestra claramente la interacción específica de MC-FA-010 con las células que expresan la Seprasa.

MC-FA-010 se une específicamente a tumores que expresan la Seprasa

Para analizar la unión de MC-FA-010 (tetramerizado mediante Estreptavidina-Cy3) a células tumorales que expresan la Seprasa murina, se inyectaron ratones BALB/c por vía subcutánea con células CT26. Los ratones se sacrificaron 14 días después de la implantación de células tumorales y el tumor se aisló para cortes histológicos en parafina. Posteriormente, se tiñeron cortes histológicos de 3 µm (Figura 7). Para la visualización de los CAF (fibroblastos asociados al cáncer) que expresan Seprasa, se tiñeron cortes histológicos con anticuerpo anti-α-SMA (verde). La localización de los núcleos se tiñó con DAPI (azul). En rojo, la unión específica de MC-FA-010 y el Microcuerpo™ control MC-Myc-010 es detectable. Aquí, pudimos mostrar que el MC-FA-010 se une a los CAF derivados de cortes histológicos de tumor murino. Como se esperaba, el Microcuerpo™ control no se une al corte histológico del tumor CT26. En resumen, es posible abordar los tumores que expresan la Seprasa con el Microcuerpo™ específico de Seprasa MC-FA-010.

La oligomerización de MC-FA-010 aumenta su afinidad

Para estudiar un posible efecto de avidez, se analizó la actividad de unión de MC-FA-010 monovalente y tetravalente contra células que sobreexpresan la Seprasa humana (CHO-K1-Seprasa). Por lo tanto, por un lado, se usó la proteína de fusión Trx-MC-FA-010 monovalente (consiste en un casete Tiorredoxina-His6) y, por otro lado, se usó Microcuerpo™ conjugado con biotina que se oligomerizó mediante el uso de estreptavidina-APC (MC-FA-010-bio/SA-APC). Las propiedades de unión de los constructos MC-FA-010 resultantes contra la Seprasa humana se determinaron mediante FACS y revelaron un valor de EC50 de 177,6 nM del MC-FA-010 monovalente, mientras que la variante tetravalente mostró una afinidad aún mayor con una EC_{50} de 2,367 nM (Figura 8). En conjunto, la oligomerización de MC-FA-010 conduce a un efecto de avidez y aumenta la afinidad del MC-FA-010 a la Seprasa.

Oligomerización química de MC-FA-012

Una versión trimerizada conjugada con DOTA del Microcuerpo™ MC-FA-012 (DOTA-(MC-FA-012)$_3$) se compró de Pepscan. La generación se basó en una estrategia de ligadura por oxima. Por lo tanto, se sintetizó químicamente una variante MC-FA-012 con un grupo aminooxi amino terminal en el extremo N-terminal. Además, se generó una molécula de anclaje que consistía en un resto DOTA unido a un amino terminal y tres tramos de Lisina-Serina separados por una secuencia enlazadora GSGS, respectivamente. Para formar aldehídos reactivos, los grupos hidroxilo terminales de los residuos de serina se oxidaron con peryodato de sodio. Finalmente, el anclaje activado y la variante aminooxi-MC-FA-012 se acoplaron en una reacción de ligadura por oxima para formar el trímero DOTA-(MC-FA-012)$_3$ (ver Figura 9 A).

El trímero se analizó funcionalmente en un ensayo de competición basado en FACS en comparación con el Microcuerpo™ monomérico (ver Figuras 9B y C). En este ensayo, las células CHO-K1-huSeprasa se tiñeron consecutivamente con la proteína de fusión Trx-MC-FA-012 y el anticuerpo anti-H6-PE. La incubación paralela con diferentes concentraciones del trímero condujo a una inhibición significativa con un valor de IC50 de 43,32 nM, mientras que solo pudo verse una ligera competencia con el monómero. Por lo tanto, la orientación espacial de los Microcuerpos™ en el andamio trimérico permite una unión eficiente a la Seprasa unida a la membrana. El efecto de avidez observado indica, además, que la oligomerización química puede ser una forma productiva de aumentar significativamente la afinidad del ligando y, de esta manera, facilitar el aumento de la unión y la retención de la sonda en el sitio del tumor.

Además del conjugado DOTA descrito DOTA-(MC-FA-012)$_3$, se compró una variante conjugada AlexaFluor®680 de Pepscan para su uso en la obtención de imágenes in vivo. Se generó una molécula de anclaje AlexaFluor680-(MC-FA-012)$_3$ (AF680-(MC-FA-012)$_3$) análoga a DOTA-(MC-FA-012)$_3$. El acoplamiento del resto AlexaFluor680 se realizó como un éster activado en solución a la amida N-terminal.

Análisis cinético de la unión del MC-FA-010 monomérico y el MC-FA-012 monomérico y trimérico a la Seprasa humana recombinante

La cinética de unión de los Microcuerpos de unión a la Seprasa monoméricos y triméricos se determinó mediante el uso de espectroscopía de resonancia de plasmón superficial en un sistema Biacore T-100. Para el Microcuerpo® MC-FA-010 monomérico se midió una constante de disociación de 149 nM. La variante MC-FA-012 con un solo intercambio Lys2Ala mostró una afinidad de 340 nM. Ambas variantes triméricas DOTA-(MC-FA-012)$_3$ y AF680-(MC-FA-012)$_3$ mostraron una afinidad significativamente mayor en el intervalo subnanomolar y una velocidad de disociación más lenta en comparación con los Microcuerpos monoméricos. DOTA-(MC-FA-012)$_3$ tiene una constante de disociación de 12,4 pM (análisis de estado estacionario, 249 pM). AF680-(MC-FA-012)$_3$ tiene una constante de disociación de 61,5 pM (análisis de estado estacionario, 669 pM). En comparación con MC-FA-012, la velocidad de disociación de DOTA-(MC-FA-012)$_3$ es alrededor de 530, y la de AF680-(MC-FA-012)$_3$ alrededor de 134 veces más lenta. Debido al pequeño tamaño (~13 000 Da) y lenta velocidad de disociación, ambos constructos triméricos se predestinan para la obtención de imágenes in vivo de tumores con un fondo general bajo. Los datos cinéticos detallados se resumen en la Tabla 3 y la Figura 11 (A-D).

Intercambio de andamios

Para mejorar o modular las propiedades fisicoquímicas de los agentes de unión Microcuerpo® y las características basadas en ellos (por ejemplo, carga neta, estabilidad, disponibilidad oral), las ramificaciones de secuencia responsables de la unión pueden injertarse en otros andamios alternativos. En este estudio, la secuencia de unión de MC-FA-012 ubicada principalmente en el primer lazo se transfirió a dos andamios basados en el inhibidor de tripsina EETI-II de Ecballium elaterium (ET-FA-012) y un andamio McoTI-II optimizado (Momordica cochinchinensis, MO-FA-012). La información de la secuencia correspondiente se enumera en la Tabla 4. Las regiones que codifican el ADN de dichas proteínas se clonaron en la cadena principal del vector de pET32b-LibEx lo que permite una expresión como fusión a la tiorredoxina. La expresión y la purificación se realizaron como se describió anteriormente (Ejemplo 1). Para el análisis por SPR, la tiorredoxina se separó mediante escisión por trombina y purificación adicional con IMAC y RP-HPLC. Para confirmar la síntesis correcta, la masa esperada se verificó mediante espectroscopía de masas. La funcionalidad de los Microcuerpos recién construidos se analizó mediante el uso de SPR. Ambos Microcuerpos mostraron unión específica a la rhuSeprasa inmovilizada con una constante de disociación ligeramente más débil en comparación con MC-FA-012 (Tabla 3 y Figuras 13 A y B). Para ET-FA-012 se determinó una KD de 1,4 µM y para MO-FA-012 una KD de 1,34 µM.

MC-FA-012 se une específicamente al cáncer de mama triple negativo que expresa Seprasa (TNBC)

Para analizar la unión de MC-FA-012 al cáncer de mama triple negativo que expresa Seprasa, se analizaron cortes histológicos de tumor mediante tinción de inmunofluorescencia (Figura 16). Para la visualización de fibroblastos asociados al cáncer (CAF), los cortes histológicos se tiñeron con anticuerpo anti-α-SMA (Figuras 16B y F). Los núcleos se tiñeron con DAPI (Figuras 16C y G) en paralelo. Solo el Microcuerpo® MC-FA-012 biotinilado (tetramerizado mediante Estreptavidina-Cy3) (Figura 16 A) pero no la variante MC-FA-0116 igualmente procesada (Figura 16 E) muestra una unión específica a los cortes histológicos de TNBC. La señal del tetrámero MC-FA-012/SA se colocaliza en gran medida con SMA, lo que indica el direccionamiento específico de Seprasa en los CAF (Figura 16 D).

Ejemplo 4: Direccionamiento al tumor en Xenoinjerto-CHO que expresa Seprasa con MC-FA-012 conjugado con IRDye

Para analizar las propiedades de biodistribución y direccionamiento tumoral del Microcuerpo™ MC-FA-012, se estableció un xenoinjerto en ratones inmunodeficientes Foxn1(nu) mediante el uso de las líneas celulares CHO-K1-huSeprasa y CHO-K1-FALSA. El ligando huSeprasa (MC-FA-012) y un Microcuerpo™ control (MC-CM-010) se conjugaron con IRDye800CW mediante el uso de química de NHS y se inyectaron i.v. en ratones con tumor. Después de 0,5 y 2 h, los ratones se sacrificaron. Se extrajeron los órganos y se midió la señal IR ex vivo en un sistema de obtención de imágenes óptico Xenogen IVIS in vivo (Figura 10). En comparación con el Microcuerpo® control negativo, el Microcuerpo® MC-FA-012-IRDye800CW específico de Seprasa se dirigió al tejido humano que sobreexpresa Seprasa durante un período de circulación de 0,5 h. Después de 2 h, el MC-FA-012-IRDye800CW se separó del tumor con el resultado de un direccionamiento al tumor no detectable. Por lo tanto, el período de tiempo fundamental en el direccionamiento al tumor con MC-FA-012 parece ocurrir durante los primeros 30 minutos después de la inyección. Además, pudo observarse también una unión más débil de MC-FA-012-IRDye800CW en el tejido FALSO. No puede excluirse que el tejido FALSO también exprese la Seprasa murina. En resumen, el direccionamiento al tumor por el Microcuerpo® MC-FA-012-IRDye800CW específico de la Seprasa podría mostrarse durante los primeros minutos después de la inyección. Sobre la base de estos datos deben realizarse otras evaluaciones in vivo.

Análisis de biodistribución y direccionamiento al tumor

Para analizar las propiedades farmacocinéticas y de direccionamiento al tumor del trímero AF680-(MC-FA-012)$_3$ se monitoreó la biodistribución en ratones hembra Fox nl nu en seis puntos temporales después de la inyección (1, 2, 4, 6, 24 y 96 h). AF680-(MC-FA-0116)$_3$ y ratones no tratados sirvieron como controles. Después de cada punto temporal se midió la biodistribución in vivo y ex vivo mediante el uso de un sistema de obtención de imágenes Xenogen (Figura 14 A + B). Durante todo el período de tiempo analizado hasta 24 h después de la inyección, pudo observarse una captación tumoral específica y significativa de AF680-(MC-FA-012)$_3$ (Figura 14, flechas y Figura 15). Por el contrario, el trímero control MC-FA-0116 no se acumuló en el tumor en un grado detectable (Figura 14 y Figura 15). En general, las señales de fondo para el agente de unión y para el control sin unión estaban en el mismo intervalo. Si bien las señales en los pulmones, el corazón, el bazo y el hígado eran generalmente bajas, podían medirse señales renales fuertes para ambos constructos después de 1 hora, que disminuyeron sin embargo, significativamente, después de 2 horas.

Ejemplo 5: Caracterización adicional del lazo de unión e intentos iniciales de maduración por afinidad

Para analizar la interacción entre el Microcuerpo® MC-FA-012 y la Seprasa con mayor detalle e identificar más agentes de unión afines, se generó una biblioteca enfocada sobre la base de los datos de barrido de alanina y se tamizaron contra la Seprasa soluble. Por lo tanto, se aplicaron cuatro condiciones de selección diferentes con rigurosidad variable. Después de tres rondas de selección, los 4 grupos se subclonaron en un vector de expresión. Se expresaron y analizaron 96 clones por grupo con respecto a la tasa de expresión, así como también a las propiedades de unión al objetivo y no específica. El valor s/n (señal con respecto a ruido) se calculó mediante la división de la señal ELISA frente a huSeprasa y BSA e indica la unión específica al objetivo. Además de este valor s/n, se calculó un valor de expresión relativa (Ex) a partir de los datos de SDS-PAGE. Ambos valores se tuvieron en cuenta para la clasificación de los clones. Se calcularon los valores de clasificación 1 y 2 que difieren con respecto a los factores de ponderación del valor s/n. Los clones mejor clasificados de cada grupo (Grupo 1: clones 1-4, Grupo 2: 1-7, Grupo 3: 1-4, Grupo 4: 1-5 de acuerdo con los valores de la clasificación 2) o todos los clones con un valor de clasificación 2 superior a 5 se muestran en las Tablas 1 y 2 más abajo.

Tabla 1: Clones mejor clasificados de cada grupo

>1
GACPYRNWMTGRGPLCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>2
GACMYMNWTPGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>3
GACPYASWADGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>4
GACVYQHWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>5
GACPYSRWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>6
GACPYTRWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>7
GACPYSNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>8
GACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>9
GACPYSNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>10
GACPYTNWRPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>11
GACPYSNWAVGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>12
GACAYSSWSAGRGPMCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>13
GACPYVNWAAGRGPVCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>14
GACPYAVWASGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>15
GACEYSAWLAGRGPECRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>16
GACVYWQWIAGRGPVCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>17
GACWYDPWWLGRGPVCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>18
GACMYDTWAQGRGPNCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>19
GACLYEVWPLGRGPQCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>20
GACAYSNWQPGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG

Tabla 2: Clones con un valor de clasificación 2 superior a 5

>1
GACPYRNWMTGRGPLCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>2
GACMYMNWTPGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>3
GACPYASWADGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>4
GACVYQHWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>5
GACPYSRWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>6
GACPYTRWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>7
GACPYSNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>8
GACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>9
GACPYSNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>10
GACPYTNWRPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>11
GACPYSNWAVGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>12
GACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>13
GACPYANWAVGRGPNCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>14
GACPYTYWHPGRGPGCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>15
GACPYSNWRPGRGPECRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>16
GACPYANWMVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>17
GACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>18
GACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>19
GACPYARWAAGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>20
GACPYSTWQVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG

>21
GACPYTRWTVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>22
GACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>23
GACPYTNWQPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>24
GACPYTNWHPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>25
GACPYTNWQPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>26
GACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>27
GACPYARWVVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>28
GACAYANWQVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>29
GACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>30
GACPYARWVLGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>31
GACPYTNWHPGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>32
GACPYANWAVGRGPNCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>33
GACPYTYWHAGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>34
GACPYSTWAVGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>35
GACPYTNWQPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>36
GACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>37
GACPYRNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>38
GACPYATWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>39
GACPYTNWHPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>40
GACPYTNWQPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>41

GACPYARWNVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>42
GACPYTNWHPGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>43
GACPYANWTIGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>44
GACPYARWHVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>45
GACAYSNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>46
GACPYSTWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>47
GACPYTNWAVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>48
GACPYANWAVGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>49
GACPYRNWQPGRGPTCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>50
GACPYSNWTVGRGPECRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>51
GACPYHTWAVGRGPGCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>52
GACPYRNWSPGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>53
GACPYTFWRVGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>54
GACPYSNWTVGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>55
GACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>56
GACVYWQWIAGRGPVCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>57
GACWYDPWWLGRGPVCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>58
GACMYDTWAQGRGPNCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>59
GACLYEVWPLGRGPQCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>60
GACAYSNWQPGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
>61
GACEYHVWMGGRGPHCRRDSDCPGRCICRGNGYCG

Una caracterización detallada de los clones mejor clasificados especialmente en relación con los parámetros cinéticos (K_d, K_{on}, K_{off}) en comparación con la variante original MC-FA-012 está en curso.

Análisis de unión de variantes de MC-FA-012 con secuencia de unión alterada

Siete clones seleccionados de la clasificación mencionada anteriormente (Tabla 1 y 2, Ejemplo 5) se analizaron adicionalmente mediante el uso de espectroscopía SPR. Las variantes mostraron una constante de disociación en el mismo intervalo (147 - 487 nM) que MC-FA-010 o MC-FA-012 (149 - 340 nM) con una velocidad de disociación comparable. Los datos cinéticos detallados y las informaciones de secuencia se resumen en la Tabla 3 y 4 y en la Figura 12 (A-G). Las siete variantes mostraron unión a la rhuSeprasa lo que confirma el motivo de unión identificado CXYXXWXXGRGPXC.

Ejemplo 6: Biodistribución y direccionamiento al tumor mediante el uso de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ y ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$

Distribución en órganos de ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$

Se monitoreó durante 24 h la distribución en órganos de ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$ en ratones con tumores CT26-huSeprasa. En seis puntos temporales (0,5, 1, 2, 4, 6 y 24 h) se sacrificaron los ratones y se midió la radioactividad en los órganos diseccionados. La dosis medida se resume en la Figura 17 y en la Tabla 5 como porcentaje de la dosis inyectada por gramo [%ID/g]. El trímero analizado mostró un direccionamiento específico al tumor con una alta retención de radioactividad en los riñones. Sin embargo, la señal en el riñón (286,8 a 213,4 %ID/g) y tumor (9,9 - 5,9 %ID/g) disminuyó durante el período de tiempo medido, pero aún pudo medirse después de 24 h.

Obtención de imágenes por PET de animales pequeños mediante el uso de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$

La biodistribución y direccionamiento al tumor de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ se midió durante un período de tiempo de 140 minutos mediante exploración por PET. En ambos ratones analizados ^{68}Ga-(MC-FA-012)3 mostró un direccionamiento específico al tumor (Figuras 18 - 20), altas relaciones tumor con respecto a fondo ya en los primeros 20 min y una señal alta en los riñones. Estos datos confirman los resultados del estudio de distribución en órganos realizado con ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$.

Ejemplo 7: Uso diagnóstico y terapéutico de trímeros Microcuerpo®

Para fines de diagnóstico se inyectaron 2,5 nmol de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ por vía intravenosa. Hasta la fecha, se han examinado cinco pacientes con cáncer de páncreas avanzado. La información detallada sobre la dosis aplicada se resume en la Tabla 6. ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ mostró un alto enriquecimiento en tumores primarios y metástasis (Figuras 21-26 y Tablas 11-16) y como ya se vio en animales pequeños en estudios in vivo, una alta captación en el riñón. En general, pudo observarse un valor basal bajo en el tejido normal. La posible nefroprotección, por ejemplo, en la aplicación terapéutica, podría lograrse mediante la infusión de arginina/lisina, gelofusina o albúmina fragmentada (FRALB) o la aplicación adicional de Microcuerpo® MC-FA-0116 negativo o la variante trimérica (MC-FA-0116)$_3$.

Se inyectó con fines terapéuticos 10-15 nmol de ^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$ por vía intravenosa (Tabla 7). Dos pacientes se han tratado recientemente. Los pacientes no mostraron nefrotoxicidad aguda. El tratamiento aún está en curso.

Ejemplo 8: Análisis inmunohistoquímico de la expresión de la Seprasa en diferentes entidades tumorales

Para proporcionar información sobre la expresión de la Seprasa en diferentes entidades tumorales, se realizó un análisis inmunohistoquímico.

Carcinoma pancreático

La expresión de la Seprasa en el tejido normal del páncreas se limita a los islotes de Langerhans, conductos y vasos. En el carcinoma de páncreas, la expresión de la Seprasa se detecta adicionalmente en células tumorales y fibroblastos (Tabla 8 y Figura 27). En 17/17 muestras de carcinoma de páncreas se detectan 10 - 85 % de células tumorales de tinción citoplasmática/membranosa débil a fuerte. En 12/17 tejidos, se detecta un 5 % de células normales (islotes de Langerhans y conductos) de tinción citoplasmática/membranosa débil a fuerte. En 10/17 tejidos se detectan del 60 al 75 % de vasos con tinción membranosa débil a media. En 11/17 tejidos se detecta 2 - 50 % de tejido fibroso (fibroblastos) con tinción citoplasmática/membranosa débil a fuerte. En conjunto, los datos del presente estudio sugieren que la Seprasa se sobreexpresa en fibroblastos de estroma tumoral pancreático humano en comparación con el tejido normal (tinción de fibroblastos en un solo caso, tinción en islotes de Langerhans, conductos y vasos).

Cáncer de Mama Triple Negativo (TNBC)

En 39/39 muestras de TNBC se detectaron muchos fibroblastos con tinción membranosa y citoplasmática débiles a fuertes (~54 %) dentro del tejido fibroso (a veces con señales más fuertes alrededor de las células tumorales). En un caso se encontraron señales de necrosis/células prenecróticas. En 3/3 muestras de mama humana normal, se detectaron algunos

fibroblastos con tinción media (~3 %) dentro del tejido fibroso (Tabla 9 y Figura 28). La tinción en el tejido normal puede deberse a la localización adyacente al tejido patológico. En conjunto, los datos del presente estudio sugieren que la Seprasa se sobreexpresa en fibroblastos de estroma tumoral TNBC humano en comparación con el tejido normal (expresión débil).

Carcinoma de pulmón

En 29/31 carcinomas de pulmón se detectaron muchos fibroblastos con tinción membranosa y citoplasmática débil a fuerte (~55 %) dentro del tejido fibroso. En cinco casos se encontraron señales de necrosis/células prenecróticas. En 2/3 muestras de pulmón humano normal, se detectaron algunos fibroblastos con tinción débil a fuerte (~17 %) dentro del tejido fibroso (Tabla 10 y Figura 29). La tinción en el tejido normal puede deberse a la localización adyacente al tejido patológico. En conjunto, los datos del presente estudio sugieren que la Seprasa se sobreexpresa en fibroblastos de estroma tumoral de pulmón humano en comparación con el tejido normal (expresión débil).

La Seprasa parece ser un objetivo sobreexpresado en cáncer de páncreas, TNBC y carcinoma de pulmón. Por lo tanto, el uso del ligando de la Seprasa identificado como agente de diagnóstico y terapéutico no se limita a la aplicación clínica descrita.

Tabla 3: Determinación de la afinidad de Microcuerpos de unión a la Seprasa monoméricos y triméricos

Analito	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	$Chi^2(RU^2)$	KD (M, estado estacionario)	$Chi^2(RU^2)$	Figura
MC-FA-010	1,53E+06	0,2006	1,49E-07	0,131	1,06E-07	0,21	11A
MC-FA-012	4,08E+05	0,1385	3,40E-07	0,041	2,46E-07	0,0416	11B
DOTA-(MC-FA-012)$_3$	*2,11E+07*	*2,61E-04*	*1,24E-11*	*0,446*	*2,49E-10*	*14,6*	*11C*
AF680-(MC-FA-012)$_3$	*1,68E+07*	*0,001031*	*6,15E-11*	*0,874*	*6,69E-10*	*9,11*	*11D*
FA8-D06	3,46E+05	0,05303	1,53E-07	1,2	1,13E-07	1,42	12A
FA7-A05	2,46E+05	0,05035	2,05E-07	1,09	1,02E-07	1,11	12B
FA8-C09	9,92E+06	2,935	2,96E-07	0,328	2,43E-07	9,5	12C
FA8-D03	9,39E+05	0,1381	1,47E-07	0,824	1,51E-07	0,137	12D
FA8-D05	4,21E+06	0,8121	1,93E-07	0,441	1,77E-07	0,822	12E
FA8-F04	6,24E+05	0,2003	3,21E-07	0,218	3,32E-07	0,21	12F
FA8-G12	6,51E+05	0,3171	4,87E-07	0,146	4,70E-07	0,0436	12G
ET-FA-012	6,08E+05	0,8528	1,40E-06	0,271	4,54E-06	0,488	13A
MO-FA-012	3,82E+05	0,5128	1,34E-06	1,43	1,16E-06	0,561	13B

Velocidad de disociación resaltada en negritas, *los constructos triméricos* se resaltan en cursiva

Tabla 4: Listado de secuencias

Microcuerpo®	Secuencia de aminoácidos
ET-FA-012	GSGACPYSNWTPGRGPDCSQDSDCLAGCVCGPNGFCG
MO-FA-012	GSGACPYSNWTPGRGPDCSSDSDCPGACICLENGFCG
FA7-A05	GSGACPYSRWMPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-C09	GSGACPYTNWRPGRGPACRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-D03	GSGACPYTRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-D05	GSGACPYTRWQPGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-D06	GSGACPYSRWAVGRGPDCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-F04	GSGACPYSNW AVGRGPSCRRDSDCPGRCICRGNGYCG
FA8-G12	GSGACPYTNWHPGRGP ACRRDSDCPGRCICRGNGYCG

Tabla 5: Distribución en órganos de ^{177}Lu-MC-FA-012)$_3$

Media %ID/g (n=3)						
	30 min	1 h	2 h	4 h	6 h	24 h
Sangre	1,3512	0,3597	0,1353	0,042	0,0374	0,0429
Corazón	0,6152	0,1869	0,1284	0,1015	0,0876	0,0641
Pulmones	1,7729	0,6705	0,6067	0,4514	0,6476	0,189
Hígado	0,6684	0,3983	0,4402	0,4101	0,431	0,3631
Bazo	0,9253	0,5493	0,6561	0,5931	0,6287	0,4561
Riñones	286,7812	222,3177	272,3888	245,1877	259,4467	213,4107
Intestino	0,7435	0,5079	1,0902	0,2913	0,9309	0,3347
Cerebro	0,6895	0,2284	0,5818	0,3159	0,2159	0,2151
Músculo	0,0589	0,0423	0,0317	0,0241	0,1259	0,0253
Tumor	9,8546	6,7929	8,1504	7,7667	7,8057	5,8505
Sitio de inyección	4,2434	15,2418	2,8704	2,6095	1,5742	0,9827

Tabla 6: Marcaje con ^{68}Ga de DOTA-(MC-FA-012)$_3$ para fines diagnósticos

^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$					
Paciente	Fecha	MBq (administrado)	nmol	t_R(HPLC)	Cirugía
1	29.10.15	359	2.5	2,22	No
2	02.11.15	351	2.5	2,22	Pancreatectomía (Whipple, part.)
3	24.11.15	63	2.5	2,24	No
4	14.01.16	166	2.5	2,20	Pancreatectomía/esplenectomía (part.)
5	02.02.16	355	2.5	2,21	No

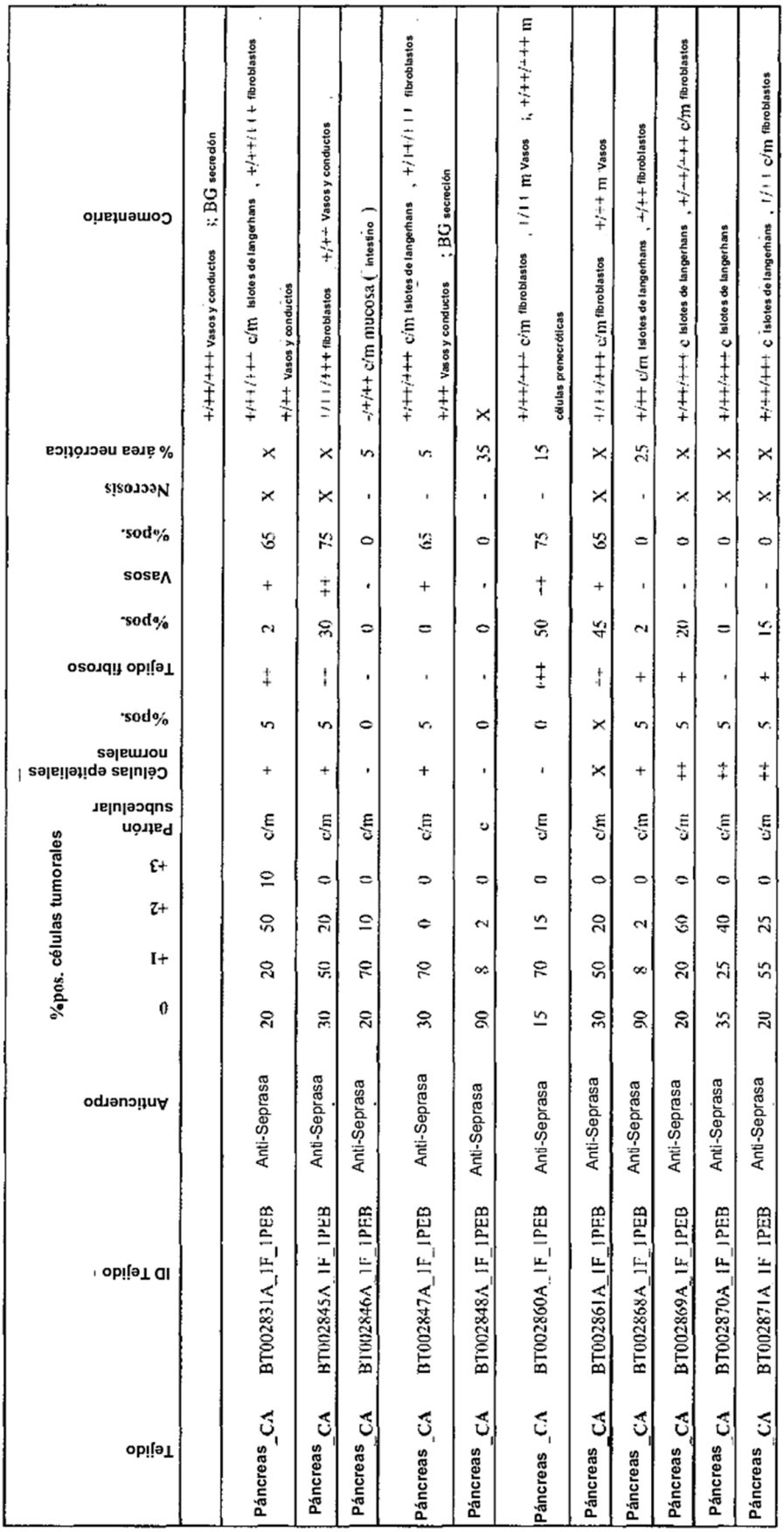
Tabla 7: Marcaje con ^{177}Lu de DOTA-(MC-FA-012)$_3$ para fines terapéuticos

^{177}Lu-(MC-FA-012)$_3$				
Paciente	Fecha	GBq (producto)	nmol	t_R (HPLC)
3	20.01.16	2,318	15	2,04
5	04.02.16	2,530	10	2,06

Tabla 8: Estudio de IHC de expresión de la Seprasa en cáncer pancreático.

Tejido	ID Tejido	1º Anticuerpo	%pos. células tumorales					Células epiteliales normales	%pos.	Tejido fibroso	%pos.	Vasos	%pos.	Necrosis	% área necrótica	Comentario
			0	+1	+2	+3	Patrón subcelular									
Páncreas	BT002857A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	5	-	0	+	75	X	X	Islotes de langerhans, Vasos y conductos
Páncreas	BT002849A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	5	-	0	+	65	-	85	Islotes de langerhans (prenecrótico) Vasos y conductos
Páncreas	BT002850A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	5	-	0	+	70	-	75	Islotes de langerhans (prenecrótico) Vasos y conductos
Páncreas	BT002852A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	-	55	+	60	++	80	X	X	Islotes de langerhans, fibroblastos Vasos y conductos
Páncreas	BT002852A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	55	+	60	++	80	X	X	Islotes de langerhans, fibroblastos Vasos y conductos
Páncreas	BT002853A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	5	-	0	+	80	X	X	Islotes de langerhans, Vasos y conductos BG secreción
Páncreas	BT002854A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	5	-	0	+	75	X	X	Islotes de langerhans Vasos y conductos BG secreción
Páncreas	BT002856A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	-	45	-	0	+	60	X	X	Islotes de langerhans, Vasos y conductos
Páncreas	BT002858A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	-	60	-	0	+	75	X	X	Islotes de langerhans, Vasos y

Tejido	ID Tejido	1º Anticuerpo	%pos células tumorales				Patrón subcelular	Células epiteliales normales	%pos.	Tejido fibroso	%pos.	Vasos	%pos.	Necrosis	% área necrótica	Comentario
			0	+1	+2	+3										conductos
Páncreas	BT002859A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	60	-	0		65	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , -/++ m Vasos y conductos
Páncreas	BT002873A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	45	-	0	++	75	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	BT002874A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	35	-	0	+	70	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	BT002875A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	30	-	0	++	75	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	BT002876A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	20	-	0	+	70	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	BT002877A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	30	-	0	+	70	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	Páncreas 4	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	30	-	0	++	65	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Páncreas	Páncreas 2	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	++	10	-	0	++	65	X	X	+/++ c Islotes de langerhans , +/++ m Vasos y conductos
Colon	Colon 2	Anti-Seprasa	X	X	X	X	X	+	20	-	0	-	0	X	X	BG mucosa
Páncreas _CA	BT002813A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	30	70	0	0	c/m	+	5	++	10	+	65	X	X	+/++ c/m Islotes de langerhans , -/++ c/m fibroblastos , +/+ m Vasos y conductos
Páncreas _CA	BT002829A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	50	40	10	0	c/m	X	X	+	5	+	60	X	X	+/++ c/m fibroblastos , + m vasos , -/++ c/m mucosa (intestino) ; BG músculo
Páncreas _CA	BT002830A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	20	60	20	0	c/m	+	5	-+	20	-+	75	X	X	+/++ c/m Islotes de langerhans , -/++ c/m fibroblastos ,



Tejido	ID Tejido	Anticuerpo	%pos. células tumorales				Patrón subcelular	Células epiteliales normales		Tejido fibroso		Vasos		Necrosis	% área necrótica	Comentario
			0	+1	+2	+3		+/-	%pos.	+/-	%pos.	+/-	%pos.			
																+/++/+++ Vasos y conductos ; BG secretión
Páncreas_CA	BT002831A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	20	20	50	10	c/m	+	5	+/-	2	+	65	X	X	+/++/+++ c/m Islotes de langerhans , +/++/+++ fibroblastos +/++ Vasos y conductos
Páncreas_CA	BT002845A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	30	50	20	0	c/m	+	5	-/-	30	++	75	X	X	+/++/+++ fibroblastos +/++ Vasos y conductos
Páncreas_CA	BT002846A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	20	70	10	0	c/m	-	0	-	0	-	0	-	5	-/+/++ c/m mucosa (intestino)
Páncreas_CA	BT002847A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	30	70	0	0	c/m	+	5	-	0	+	65	-	5	+/++/+++ c/m Islotes de langerhans , +/++/+++ fibroblastos +/++ Vasos y conductos ; BG secreción
Páncreas_CA	BT002848A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	90	8	2	0	c	-	0	-	0	-	0	-	35	X
Páncreas_CA	BT002860A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	15	70	15	0	c/m	-	0	+++	50	-+	75	-	15	+/++/-++ c/m fibroblastos , +/++/-++ m Vasos células prenecróticas
Páncreas_CA	BT002861A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	30	50	20	0	c/m	X	X	-+	45	+	65	X	X	+/++/+++ c/m fibroblastos +/-+ m Vasos
Páncreas_CA	BT002868A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	90	8	2	0	c/m	+	5	+	2	-	0	-	25	+/++ c/m Islotes de langerhans , -/++ fibroblastos
Páncreas_CA	BT002869A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	20	20	60	0	c/m	++	5	+	20	-	0	X	X	+/++/+++ c Islotes de langerhans , +/-+/-++ c/m fibroblastos
Páncreas_CA	BT002870A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	35	25	40	0	c/m	++	5	-	0	-	0	X	X	+/++/+++ c Islotes de langerhans
Páncreas_CA	BT002871A_IF_IPEB	Anti-Seprasa	20	55	25	0	c/m	++	5	+	15	-	0	X	X	+/++/+++ c Islotes de langerhans , +/++ c/m fibroblastos

Tejido	ID Tejido	%Anticuerpo	%pos. células tumorales				Patrón subcelular	Células epiteliales normales	%pos.	Tejido fibroso	%pos.	Vasos	%pos.	Necrosis	% área necrótica	Comentario
			0	+1	+2	+3										
Páncreas_CA	BT002872A_1F_1PEB	Anti-Seprasa	25	45	30	0	c/m	++	5	+	5	+	65	X	X	-/++/+++ c/m Islotes de langerhans , + fibroblastos +/-+ Vasos
Páncreas_CA	15B02208	Anti-Seprasa	30	30	20	20	c/m	++	5	-	0	+	75	X	X	+/++/+++ c/m Islotes de langerhans , +/++ Vasos y conductos BG músculo
Páncreas_CA	12B15338.1	Anti-Seprasa	90	1	0	9	c/m	++	5	-	0	-	0	X	X	+/++/-++ c/m Islotes de langerhans
Páncreas_CA	12B15338.2	Anti-Seprasa	90	3	0	8	c/m	++	5	-	0	-	0	X	X	+/++/-++ c/m Islotes de langerhans
CHO-K1-huSeprasa	15_503	Anti-Seprasa	15	40	30	15	m	-	0	-	0	-	0	++	50	BG necrosis; pequeños puntos teñidos
CHO-K1-huSeprasa	15_503	Anti-Seprasa	15	30	35	20	m	-	0	-	0	-	0	++	50	BG necrosis; pequeños puntos teñidos
CHO-K1-huSeprasa	15_503	Anti-Seprasa	15	35	35	15	m	-	0	-	0	-	0	++	50	BG necrosis; pequeños puntos teñidos

Tabla 9: Estudio de IHC de expresión de la Seprasa en cáncer de mama triple negativo.

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	Comentario
Tumor	Mama	IN000422A_T_121FEB	anti-Seprasa	++	70	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000423A_T_122FEB	anti-Seprasa	++	75	-	10	+/++/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000424A_T_123FEB	anti-Seprasa	+	80	-	20	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000425A_T_124FEB	anti-Seprasa	+	40	-	0	+/+-/ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000426A_T_125FEB	anti-Seprasa	++	30	-	10	+/++ m/c fibroblastos , Tejido parcialmente afectado y no analizable
Tumor	Mama	IN000428A_T_127FEB	anti-Seprasa	++	70	-	5	+/-+/++- m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000430A_T_129FEB	anti-Seprasa	++	35	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000431A_T_130FEB	anti-Seprasa	++	40	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000432A_T_131FEB	anti-Seprasa	++	60	-	0	+/++/+++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000389A_T_88FFB	anti-Seprasa	++	90	+++	10	++ m/c fibroblastos +/++ necrosis, puntos teñidos con necrosis
Tumor	Mama	IN000407A_T_106FFB	anti-Seprasa	++	60	-	5	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000383A_T_82FFB	anti-Seprasa	++	80	-	10	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000384A_T_83FFB	anti-Seprasa	-+	90	-	0	+/-+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000385A_T_84FFB	anti-Seprasa	++	65	-	0	+/++ m/c fibroblastos , Tejido parcialmente perdido y no analizable

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	Comentario
Tumor	Mama	IN000386A_T_85FFB	anti-Seprasa	-	30	-	20	+/+++ m/c fibroblastos , tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Mama	IN000387A_T_86FFB	anti-Seprasa	++	45	-	0	+/++ m/c fibroblastos , tejido parcialmente ausente y no analizable
Tumor	Mama	IN000388A_T_87FFB	anti-Seprasa	+	10	-	0	+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000389A_T_88FFB	anti-Seprasa	-+	90	+++	10	++ m/c fibroblastos , +-/+++ necrosis, puntos teñidos con necrosis
Tumor	Mama	IN000390A_T_89FFB	anti-Seprasa	++	85	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000391A_T_90FFB	anti-Seprasa	+	40	-	0	+ m/c fibroblastos , ++/+++ fibroblastos alrededor de las células tumorales, tejido Parcialmente no analizable
Tumor	Mama	IN000392A_T_91FFB	anti-Seprasa	++	45	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000393A_T_92FFB	anti-Seprasa	++	90	-	5	+/++ m/c fibroblastos , tejido parcialmente ausente y no analizable
Tumor	Mama	IN000394A_T_93FFB	anti-Seprasa	-+	50	-	0	+/+ m/c fibroblastos , tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Mama	IN000399A_T_98FFB	anti-Seprasa	++	95	-	1	+/++ m/c fibroblastos , -+/+++ Fibroblastos alrededor de las células tumorales, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Mama	IN000401A_T_100FFB	anti-Seprasa	++	35	-	0	+/+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN000403A_T_102FFB	anti-Seprasa	+	90	-	0	+/++ m/c fibroblastos , tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Mama	IN000404A_T_103FFB	anti-Seprasa	+	1	-	0	Raramente + m/c fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	comentario
Tumor	Mama	IN0000405A_T_104FFB	anti-Seprasa	++	90	-	25	-/++ m/c fibroblastos
				+				
Tumor	Mama	IN0000406A_T_105FFB	anti-Seprasa	+	40	-	70	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000407A_T_106FFB	anti-Seprasa	++	60	-	5	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000408A_T_107FFB	anti-Seprasa	++	50	-	10	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000409A_T_108FFB	anti-Seprasa	+	30	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000410A_T_109FFB	anti-Seprasa	++	90	-	5	+/-+/+++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000411A_T_110FFB	anti-Seprasa	++	20	-	0	+/++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000412A_T_111FFB	anti-Seprasa	-+	35	-	0	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado o ausente y no analizable
Tumor	Mama	IN0000413A_T_112FFB	anti-Seprasa	+	20	-	10	+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000414A_T_113FFB	anti-Seprasa	++	35	-	0	+/+-/+++ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000415A_T_114FFB	anti-Seprasa	++	50	-	0	+/-+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000416A_T_115FFB	anti-Seprasa	++	80	-	15	+/-+ m/c fibroblastos
Tumor	Mama	IN0000420A_T_119FFB	anti-Seprasa	++	30	-	0	+/-+ m/c fibroblastos

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	comentario
Tumor	Mama	IN000421A_T_120FFB	anti-Seprasa	++	40	-	0	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Mama	IN000389A_T_88FFB	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac solamente control
Tumor	Mama	IN000407A_T_106FFB	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac solamente control
Normal	Mama	3947	anti-Seprasa	++	1	X	X	++ Fibroblastos, señales inespecificas en la secreción
Normal	Mama	3008	anti-Seprasa	++	1	X	X	+ + Fibroblastos, señales inespecificas en la secreción
Normal	Mama	2587	anti-Seprasa	++	10	X	X	++ Fibroblastos, señal inespecifica
Normal	Mama	IN000804A_N_7FFB	anti-Seprasa	++	1	X	X	++ Fibroblastos, señales inespecificas en la secreción
Normal	Mama	IN000805_N_8FFB	anti-Seprasa	++	1	X	X	++ Fibroblastos
Normal	Mama	3008	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac solamente control
Normal	Mama	2587	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac solamente control

Tabla 10: Estudio de IHC de expresión de la Seprasa en cáncer de pulmón.

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	comentario
Tumor	Pulmón	810	anti-Seprasa	+++	30	-	5	++/+— m/c Fibroblastos alrededor de las células tumorales
Tumor	Pulmón	816	anti-Seprasa	++	75	-	0	+/—+ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	820	anti-Seprasa	++	90	-	0	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	828	anti-Seprasa	+	60	-	0	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1021	anti-Seprasa	+	90	-	0	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1023	anti-Seprasa	++	45	-	30	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente plegado y no analizable
Tumor	Pulmón	1025	anti-Seprasa	.	20	-	0	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1027	anti-Seprasa	++	75	-	50	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1031	anti-Seprasa	++	80	-	40	+/++/+++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1041	anti-Seprasa	++	90	-	0	-/—+ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1047	anti-Seprasa	+	60	-	0	-/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1049	anti-Seprasa	++	90	-	0	+/+1 m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1051	anti-Seprasa	+-	75	-	0	+/-+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1061	anti-Seprasa	+	10	-	0	+/-+ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1082	anti-Seprasa	++	60	-	45	+/— m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1296	anti-Seprasa	++	95	-	0	+/+ m/c Fibroblastos

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	comentario
Tumor	Pulmón	1299	anti-Seprasa	++	5	-	5	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1301	anti-Seprasa	++	5	-	0	+/-+ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1304	anti-Seprasa	+	20	-	35	+/+- m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1307	anti-Seprasa	++	95	-	0	+/+- m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1308	anti-Seprasa	++	40	-	5	+/-+/+++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1309	anti-Seprasa	++	35	+	5	+/++ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	1310	anti-Seprasa	+	95	-	25	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	1314	anti-Seprasa	++	85	-	0	+/++ m/c Fibroblastos
Tumor	Pulmón	2164	anti-Seprasa	++	80	+++	15	+/++ m/c Fibroblastos , ++/+++ necrosis, células teñidas dentro de la necrosis
Tumor	Pulmón	2167	anti-Seprasa	-+	70	+++	10	-+/++ m/c Fibroblastos , -+/+++ necrosis, células teñidas dentro de la necrosis
Tumor	Pulmón	2168	anti-Seprasa	++	65	+++	5	+/++ m/c Fibroblastos , ++/+-+ necrosis, células teñidas dentro de la necrosis , Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Tumor	Pulmón	2172	anti-Seprasa	+	10	+++	5	+/++ m/c Fibroblastos , ++/-++ necrosis, células teñidas dentro de la necrosis
Tumor	Pulmón	2174	anti-Seprasa	-	65	+++	20	+/++ m/c Fibroblastos , ++/-++ necrosis, células teñidas dentro de la necrosis
Tumor	Pulmón	2164	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac control
Tumor	Pulmón	1307	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac control
Normal	Pulmón	569	anti-Seprasa	-	0	X	X	No se detecta tinción

Tumor/normal	Tejido	ID Tejido	anticuerpo	Tejido fibroso	% pos.	Necrosis	% pos.	comentario
Normal	Pulmón	575	anti-Seprasa	++	40	X	X	+/++/-+-+ m/c Fibroblastos, tejido parcialmente alterado y no analizable
Normal	Pulmón	581	anti-Seprasa	+	2	X	X	+ m/c Fibroblastos
Normal	Pulmón	575	2° Ac solamente	-	0	X	X	2° Ac control

Tabla 11: Cuantificación de datos de PET: Distribución en órganos de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx/SUV medio) en el paciente 1 (der = derecho, izq = izquierdo).

Órganos	1h		3h	
	SUV máx	SUV medio	SUV máx	SUV medio
Cerebro	0,36	0,06	0,37	0,19
Cola del páncreas (tumor)	7,61	4,54	10,37	5,04
Cabeza del páncreas (tumor)	8,85	4,77	9,78	5,1
Pulmones	0,78	0,41	0,81	0,45
Hígado	6,29	4,51	8,41	4,18
Bazo	3,04	2,18	2,97	1,17
Intestino ROI1	1,58	0,76	1,55	0,57
Intestino ROI2	1,95	1,12	1,96	0,55
Riñones der	69,95	43,87	128,76	74,5
Riñones izq	73,35	47,86	118	76,3
Aorta (Fondo)	3,04	2,09	2,46	1,26
Metástasis pulmonar der	2,04	1,36	1,54	0,97
Metástasis pulmonar der craneal	1,39	0,95	1,19	0,77
Metástasis pulmonar der (2)	2,13	0,75	1,09	0,41
Metástasis pulmonar der basal	1,36	1,07	1,27	0,75

Tabla 12. Cuantificación de datos de PET: Distribución en órganos de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx/SUV medio) en el paciente 2 (der = derecho, izq = izquierdo).

Órganos	1h		3h	
	SUV máx	SUV medio	SUV máx	SUV medio
Cerebro	0,51	0,08	0,46	0,21
Páncreas	2,76	2,67	5,07	2,47
Pulmones	0,58	0,43	0,51	0,26
Hígado	2,29	1,56	1,97	1,08
Bazo	2,19	1,51	1,56	0,81
Intestino ROI1	2,13	1,42	1,5	0,4
Intestino ROI2	1,13	0,73	1,5	0,6
Intestino ROI3	1,71	0,9	-	-
Riñones der	88,69	55	122,19	78,1
Riñones izq	90,25	56,99	115,36	72,37
Aorta (Fondo)	2,65	1,86	1,37	0,8
Metástasis hepática	8,93	5,09	8,23	4,37
Metástasis hepática medial	4,6	2,53	-	-
Metástasis hepática der lateral	3,71	2,44	4,23	2,27
Metástasis hepática craneal	8,66	4,94	-	-
Metástasis pulmonar der	1,77	1,14	1,7	1

	2,11	1,23	-	-
Metástasis pulmonar izq	1,51	0,79	1,47	0,86

Tabla 13. Cuantificación de datos de PET: Distribución en órganos de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx/SUV medio) en el paciente 3 (der = derecho, izq = izquierdo).

Órganos	1h		2h	
	SUV máx	SUV medio	SUV máx	SUV medio
Cerebro der	0,59	0,32	0,54	0,28
Cerebro izq	0,28	0,14	0,58	0,36
Páncreas	2,32	1,04	0,76	0,31
Pulmones der	1,63	0,78	1,6	0,72
Pulmones izq	1,83	0,92	1,44	0,86
Hígado	1,87	1,07	2,27	1,22
Bazo	2,29	1,55	3,13	1,21
Intestino	2,32	1,16	0,76	0,31
Riñones der	77,1	46,67	102,47	63,11
Riñones izq	78,34	46,13	106,37	59,7
Aorta (Fondo)	1,99	1,4	2,27	0,93
Glándulas salivales der	1,4	0,7	1,46	0,58
Glándulas salivales izq	1,4	0,7	1,17	0,59
Metástasis hepática der (1)	9,65	5,26	9,39	5,11
Metástasis ganglio linfático	11,91	6,26	16,34	8,21
Metástasis hepática der (2)	8,53	5,28	9,59	5,58
Metástasis hepática central	8,51	4,79	9,7	5,35
Metástasis hepática izq	9,27	5,26	10,97	5,77

Tabla 14. Cuantificación de datos de PET: Distribución en órganos de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx/SUV medio) en el paciente 4 (der = derecho, izq = izquierdo).

Órganos	1h		2,5 h	
	SUV máx	SUV medio	SUV máx	SUV medio
Cerebro der	0,17	0,1	0,2	0,11
Cerebro izq	0,26	0,14	0,72	0,41
Páncreas	---	---	---	---
Pulmones	2,14	1,04	2,24	1,21
Hígado	3,95	2,38	5,41	2,48
Bazo	2,35	0,44	1,99	0,42
Intestino	1,21	0,56	3,45	0,73
Riñones der	47,87	26,16	70,49	40,9
Riñones izq	50,86	34,71	76,42	46,22
Aorta (Fondo)	4,21	3,48	2,43	1,52

Glándulas salivales der	1,69	0,88	1,38	0,78
Glándulas salivales izq	1,58	1,02	1,55	0,74
Peritonitis carcinomatosa	4,66	2,51	6,93	3,74
Metástasis pulmonar (1)	3,58	2,01	2,83	1,65
Metástasis pulmonar (2)	2,75	1,66	2,42	1,47
Metástasis pulmonar (3)	4,08	2,37	3,39	2,09

Tabla 15. Cuantificación de datos de PET: Distribución en órganos de ^{68}Ga-(MC-FA-012)$_3$ 1 y 3 horas después de la administración (SUV máx/SUV medio) en el paciente 5 (der = derecho, izq = izquierdo).

Órganos	1h		3h	
	SUV máx	SUV medio	SUV máx	SUV medio
Cerebro der	0,18	0,1	0,2	0,09
Cerebro izq	0,1	0,06	0,26	0,12
Parótidas der	1,08	0,72	1,01	0,44
Parótidas izq	1,21	0,96	1,05	0,64
Riñones der	111,38	70,54	159,98	101,18
Riñones izq	106,01	63,23	138,8	88
Músculo glúteo der	0,93	0,53	0,98	0,34
Músculo glúteo izq	0,9	0,54	0,89	0,28
Hígado	1,66	1,05	2,32	0,67
Cola del páncreas (tumor)	4,56	2,43	3,82	1,91
Cabeza del páncreas	2,43	1,76	1,63	0,97
Pulmones der	0,64	0,38	0,52	0,22
Pulmones izq	1,11	0,56	1,36	0,76
Aorta (Fondo)	1,76	1,15	1,22	0,54
Intestino	1,47	0,95	1,62	0,45
Metástasis hepática (principal)	9,27	4,84	7,82	4
Metástasis hepática caud. med	4,85	3,04	5,59	3,42
Metástasis hepática caud. lat	4,47	2,58	4,67	2,48

Referencias:

Avrutina, O., H. U. Schmoldt, D. Gabrijelcic-Geiger, D. Le Nguyen, C. P. Sommerhoff, U. Diederichsen y H. Kolmar (2005). "Trypsin inhibition by macrocyclic and open-chain variants of the squash inhibitor MCoTI-II." Biol Chem 386(12): 1301-1306.

Cheng, J. D., R. L. Dunbrack, Jr., M. Valianou, A. Rogatko, R. K. Alpaugh y L. M. Weiner (2002). "Promotion of tumor growth by murine fibroblast activation protein, a serine protease, in an animal model." Cancer Res 62(16): 4767-4772.

Eager, R. M., C. C. Cunningham, N. Senzer, D. A. Richards, R. N. Raju, B. Jones, M. Uprichard y J. Nemunaitis (2009). "Phase II trial of talabostat and docetaxel in advanced non-small cell lung cancer." Clin Oncol (R Coll Radiol) 21(6): 464-472.

Eager, R. M., C. C. Cunningham, N. N. Senzer, J. Stephenson, Jr., S. P. Anthony, S. J. O'Day, G. Frenette, A. C. Pavlick, B. Jones, M. Uprichard y J. Nemunaitis (2009). "Phase II assessment of talabostat and cisplatin in second-line stage IV melanoma." BMC Cancer 9: 263.

Goldstein, L. A., G. Ghersi, M. L. Pineiro-Sanchez, M. Salamone, Y. Yeh, D. Flessate y W. T. Chen (1997). "Molecular cloning of seprase: a serine integral membrane protease from human melanoma." Biochim Biophys Acta 1361(1): 11-19.

Goodman, J. D., T. L. Rozypal y T. Kelly (2003). "Seprase, a membrane-bound protease, alleviates the serum growth requirement of human breast cancer cells." Clin Exp Metastasis 20(5): 459-470.

Hofheinz, R. D., S. E. al-Batran, F. Hartmann, G. Hartung, D. Jager, C. Renner, P. Tanswell, U. Kunz, A. Amelsberg, H. Kuthan y G. Stehle (2003). "Stromal antigen targeting by a humanised monoclonal antibody: an early phase II trial of sibrotuzumab in patients with metastatic colorectal cancer." Onkologie 26(1): 44-48.

Huang, Y., S. Wang y T. Kelly (2004). "Seprase promotes rapid tumor growth and increased microvessel density in a mouse model of human breast cancer." Cancer Res 64(8): 2712-2716.

Kimura, R. H., Z. Cheng, S. S. Gambhir y J. R. Cochran (2009). "Engineered knottin peptides: a new class of agents for imaging integrin expression in living subjects." Cancer Res 69(6): 2435-2442.

Kimura, R. H., D. S. Jones, L. Jiang, Z. Miao, Z. Cheng y J. R. Cochran (2011). "Functional mutation of multiple solvent-exposed loops in the Ecballium elaterium trypsin inhibitor-II cystine knot miniprotein." PLoS One 6(2): e16112.

Kimura, R. H., A. M. Levin, F. V. Cochran y J. R. Cochran (2009). "Engineered cystine knot peptides that bind alphavbeta3, alphavbeta5, and alpha5beta1 integrins with low-nanomolar affinity." Proteins 77(2): 359-369.

Kimura, R. H., Z. Miao, Z. Cheng, S. S. Gambhir y J. R. Cochran (2010). "A dual-labeled knottin peptide for PET and near-infrared fluorescence imaging of integrin expression in living subjects." Bioconjug Chem 21(3): 436-444.

Kolmar, H. (2009). "Biological diversity and therapeutic potential of natural and engineered cystine knot miniproteins." Curr Opin Pharmacol 9(5): 608-614.

Kolmar, H. (2011). "Natural and engineered cystine knot miniproteins for diagnostic and therapeutic applications." Curr Pharm Des 17(38): 4329-4336.

Kraman, M., P. J. Bambrough, J. N. Arnold, E. W. Roberts, L. Magiera, J. O. Jones, A. Gopinathan, D. A. Tuveson y D. T. Fearon (2010). "Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha." Science 330(6005): 827-830.

Lee, J., M. Fassnacht, S. Nair, D. Boczkowski y E. Gilboa (2005). "Tumor immunotherapy targeting fibroblast activation protein, a product expressed in tumor-associated fibroblasts." Cancer Res 65(23): 11156-11163.

Liao, D., Y. Luo, D. Markowitz, R. Xiang y R. A. Reisfeld (2009). "Cancer associated fibroblasts promote tumor growth and metastasis by modulating the tumor immune microenvironment in a 4T1 murine breast cancer model." PLoS One 4(11): e7965.

Liu, S., H. Liu, G. Ren, R. H. Kimura, J. R. Cochran y Z. Cheng (2011). "PET Imaging of Integrin Positive Tumors Using F Labeled Knottin Peptides." Theranostics 1: 403-412.

Lobstein, J., C. A. Emrich, C. Jeans, M. Faulkner, P. Riggs y M. Berkmen (2012). "SHuffle, a novel Escherichia coli protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm." Microb Cell Fact 11: 56.

Loeffler, M., J. A. Kruger, A. G. Niethammer y R. A. Reisfeld (2006). "Targeting tumor-associated fibroblasts improves cancer chemotherapy by increasing intratumoral drug uptake." J Clin Invest 116(7): 1955-1962.

Moore, S. J. y J. R. Cochran (2012). "Engineering knottins as novel binding agents." Methods Enzymol 503: 223-251.

Narra, K., S. R. Mullins, H. O. Lee, B. Strzemkowski-Brun, K. Magalong, V. J. Christiansen, P. A. McKee, B. Egleston, S. J. Cohen, L. M. Weiner, N. J. Meropol y J. D. Cheng (2007). "Phase II trial of single agent Val-boroPro (Talabostat) inhibiting Fibroblast Activation Protein in patients with metastatic colorectal cancer." Cancer Biol Ther 6(11): 1691-1699.

Ostermann, E., P. Garin-Chesa, K. H. Heider, M. Kalat, H. Lamche, C. Puri, D. Kerjaschki, W. J. Rettig y G. R. Adolf (2008). "Effective immunoconjugate therapy in cancer models targeting a serine protease of tumor fibroblasts." Clin Cancer Res 14(14): 4584-4592.

Pineiro-Sanchez, M. L., L. A. Goldstein, J. Dodt, L. Howard, Y. Yeh, H. Tran, W. S. Argraves y W. T. Chen (1997). "Identification of the 170-kDa melanoma membrane-bound gelatinase (seprase) as a serine integral membrane protease." J Biol Chem 272(12): 7595-7601.

Ramirez-Montagut, T., N. E. Blachere, E. V. Sviderskaya, D. C. Bennett, W. J. Rettig, P. Garin-Chesa y A. N. Houghton (2004). "FAPalpha, a surface peptidase expressed during wound healing, is a tumor suppressor." Oncogene 23(32): 5435-5446.

Rui Liu, H. L., Liang Lin, Jinpu Yu, Xiubao Ren (2012). "Fibroblast activation protein: A potential therapeutic target in cancer." Cancer biology & therapy 13(3): 123-129.

Santos, A. M., J. Jung, N. Aziz, J. L. Kissil y E. Pure (2009). "Targeting fibroblast activation protein inhibits tumor stromagenesis and growth in mice." J Clin Invest 119(12): 3613-3625.

Scott, A. M., G. Wiseman, S. Welt, A. Adjei, F. T. Lee, W. Hopkins, C. R. Divgi, L. H. Hanson, P. Mitchell, D. N. Gansen, S. M. Larson, J. N. Ingle, E. W. Hoffman, P. Tanswell, G. Ritter, L. S. Cohen, P. Bette, L. Arvay, A. Amelsberg, D. Vlock, W. J. Rettig y L. J. Old (2003). "A Phase I dose-escalation study of sibrotuzumab in patients with advanced or metastatic fibroblast activation protein-positive cancer." Clin Cancer Res 9(5): 1639-1647.

Stern, L. A., B. A. Case y B. J. Hackel (2013). "Alternative Non-Antibody Protein Scaffolds for Molecular Imaging of Cancer." Curr Opin Chem Eng 2(4).

Weidle, U. H., J. Auer, U. Brinkmann, G. Georges y G. Tiefenthaler (2013). "The emerging role of new protein scaffold-based agents for treatment of cancer." Cancer Genomics Proteomics 10(4): 155-168.

Welt, S., C. R. Divgi, A. M. Scott, P. Garin-Chesa, R. D. Finn, M. Graham, E. A. Carswell, A. Cohen, S. M. Larson, L. J. Old y otros (1994). "Antibody targeting in metastatic colon cancer: a phase I study of monoclonal antibody F19 against a cell-surface protein of reactive tumor stromal fibroblasts." J Clin Oncol 12(6): 1193-1203.

Wen, Y., C. T. Wang, T. T. Ma, Z. Y. Li, L. N. Zhou, B. Mu, F. Leng, H. S. Shi, Y. O. Li y Y. Q. Wei (2010). "Immunotherapy targeting fibroblast activation protein inhibits tumor growth and increases survival in a murine colon cancer model." Cancer Sci 101(11): 2325-2332.

Wesley, U. V., A. P. Albino, S. Tiwari y A. N. Houghton (1999). "A role for dipeptidyl peptidase IV in suppressing the malignant phenotype of melanocytic cells." J Exp Med 190(3): 311-322.

Listado de secuencias

<110> BioNTech AG

<120> COMPOSICIONES Y MÉTODOS PARA EL DIAGNÓSTICO Y TRATAMIENTO DEL CÁNCER

<130> 674-136 PCT

<150> PCT/EP2015/055560
<151> 2015-03-17

<160> 96
<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1
<211> 2283
<212> ADN
<213> Homo sapiens

<400> 1

```
atgaagactt gggtaaaaat cgtatttgga gttgccacct ctgctgtgct tgccttattg       60
gtgatgtgca ttgtcttacg cccttcaaga gttcataact ctgaagaaaa tacaatgaga      120
gcactcacac tgaaggatat tttaaatgga acattttctt ataaaacatt ttttccaaac      180
tggatttcag gacaagaata tcttcatcaa tctgcagata acaatatagt actttataat      240
attgaaacag gacaatcata taccattttg agtaatagaa ccatgaaaag tgtgaatgct      300
tcaaattacg gcttatcacc tgatcggcaa tttgtatatc tagaaagtga ttattcaaag      360
ctttggagat actcttacac agcaacatat tacatctatg accttagcaa tggagaattt      420
gtaagaggaa atgagcttcc tcgtccaatt cagtatttat gctggtcgcc tgttgggagt      480
aaattagcat atgtctatca aaacaatatc tatttgaaac aaagaccagg agatccacct      540
tttcaaataa catttaatgg aagagaaaat aaaatattta atggaatccc agactgggtt      600
tatgaagagg aaatgcttgc tacaaaatat gctctctggt ggtctcctaa tggaaaattt      660
ttggcatatg cggaatttaa tgatacggat ataccagtta ttgcctattc ctattatggc      720
gatgaacaat atcctagaac aataaatatt ccatacccaa aggctggagc taagaatccc      780
gttgttcgga tatttattat cgataccact taccctgcgt atgtaggtcc ccaggaagtg      840
cctgttccag caatgatagc ctcaagtgat tattatttca gttggctcac gtgggttact      900
gatgaacgag tatgtttgca gtggctaaaa agagtccaga atgtttcggt cctgtctata      960
tgtgacttca gggaagactg gcagacatgg gattgtccaa agacccagga gcatatagaa     1020
gaaagcagaa ctggatgggc tggtggattc tttgtttcaa caccagtttt cagctatgat     1080
gccatttcgt actacaaaat atttagtgac aaggatggct acaaacatat tcactatatc     1140
aaagacactg tggaaaatgc tattcaaatt acaagtggca agtgggaggc cataaatata     1200
ttcagagtaa cacaggattc actgttttat tctagcaatg aatttgaaga ataccctgga     1260
```

agaagaaaca tctacagaat tagcattgga agctatcctc caagcaagaa gtgtgttact 1320

tgccatctaa ggaaagaaag gtgccaatat tacacagcaa gtttcagcga ctacgccaag 1380

tactatgcac ttgtctgcta cggcccaggc atccccattt ccacccttca tgatggacgc 1440

actgatcaag aaattaaaat cctggaagaa aacaaggaat tggaaaatgc tttgaaaaat 1500

atccagctgc ctaaagagga aattaagaaa cttgaagtag atgaaattac tttatggtac 1560

aagatgattc ttcctcctca atttgacaga tcaaagaagt atcccttgct aattcaagtg 1620

tatggtggtc cctgcagtca gagtgtaagg tctgtatttg ctgttaattg gatatcttat 1680

cttgcaagta aggaagggat ggtcattgcc ttggtggatg gtcgaggaac agctttccaa 1740

ggtgacaaac tcctctatgc agtgtatcga aagctgggtg tttatgaagt tgaagaccag 1800

attacagctg tcagaaaatt catagaaatg ggtttcattg atgaaaaaag aatagccata 1860

tggggctggt cctatggagg atacgtttca tcactggccc ttgcatctgg aactggtctt 1920

ttcaaatgtg gtatagcagt ggctccagtc tccagctggg aatattacgc gtctgtctac 1980

acagagagat tcatgggtct cccaacaaag gatgataatc ttgagcacta taagaattca 2040

actgtgatgg caagagcaga atatttcaga aatgtagact atcttctcat ccacggaaca 2100

gcagatgata atgtgcactt tcaaaactca gcacagattg ctaaagctct ggttaatgca 2160

caagtggatt tccaggcaat gtggtactct gaccagaacc acggcttatc cggcctgtcc 2220

acgaaccact tatacaccca catgacccac ttcctaaagc agtgtttctc tttgtcagac 2280

taa 2283

<210> 2
<211> 2286
<212> ADN
<213> Mus musculus

<400> 2

atgaagacat ggctgaaaac tgtctttgga gttaccaccc tggctgcgct tgctttagtg 60

gtgatatgca ttgtcttacg tccctcaaga gtttacaaac ctgaaggaaa cacaaagaga 120

gctcttacct tgaaggatat tttaaatgga acattctcat ataaaacata ttttcccaac 180

tggatttcag aacaagaata tcttcatcaa tctgaggatg ataacatagt attttataat 240

attgaaacaa gagaatcata tatcattttg agtaatagca ccatgaaaag tgtgaatgct 300

acagattatg gtttgtcacc tgatcggcaa tttgtgtatc tagaaagtga ttattcaaag 360

ctctggcgat attcatacac agcgacatac tacatctacg accttcagaa tggggaattt 420

gtaagaggat acgagctccc tcgtccaatt cagtatctat gctggtcgcc tgttgggagt 480

aaattagcat atgtatatca aaacaatatt tatttgaaac aaagaccagg agatccacct 540

tttcaaataa cttatactgg aagagaaaat agaatattta atggaatacc agactgggtt 600

tatgaagagg aaatgcttgc cacaaaatat gctctttggt ggtctccaga tggaaaattt 660

ttggcatatg tagaatttaa tgattcagat ataccaatta ttgcctattc ttattatggt 720

gatggacagt atcctagaac tataaatatt ccatatccaa aggctggggc taagaatccg 780

gttgttcgtg tttttattgt tgacaccacc taccctcacc acgtgggccc aatggaagtg 840

ccagttccag aaatgatagc ctcaagtgac tattatttca gctggctcac atgggtgtcc 900

agtgaacgag tatgcttgca gtggctaaaa agagtgcaga atgtctcagt cctgtctata 960

tgtgatttca gggaagactg gcatgcatgg gaatgtccaa agaaccagga gcatgtagaa 1020

gaaagcagaa caggatgggc tggtggattc tttgtttcga caccagcttt tagccaggat 1080

gccacttctt actacaaaat atttagcgac aaggatggtt acaaacatat tcactacatc 1140

aaagacactg tggaaaatgc tattcaaatt acaagtggca agtgggaggc catatatata 1200

ttccgcgtaa cacaggattc actgttttat tctagcaatg aatttgaagg ttaccctgga 1260

agaagaaaca tctacagaat tagcattgga aactctcctc cgagcaagaa gtgtgttact 1320

tgccatctaa ggaaagaaag gtgccaatat tacacagcaa gtttcagcta caaagccaag 1380

tactatgcac tcgtctgcta tggccctggc ctccccattt ccaccctcca tgatggccgc 1440

acagaccaag aaatacaagt attagaagaa aacaaagaac tggaaaattc tctgagaaat 1500

atccagctgc ctaaagtgga gattaagaag ctcaaagacg ggggactgac tttctggtac 1560

aagatgattc tgcctcctca gtttgacaga tcaaagaagt acccttttgct aattcaagtg 1620

tatggtggtc cttgcagcca gagtgttaag tctgtgtttg ctgttaattg gataacttat 1680

ctcgcaagta aggaggggat agtcattgcc ctggtagatg gtcggggcac tgctttccaa 1740

ggtgacaaat tcctgcatgc cgtgtatcga aaactgggtg tatatgaagt tgaggaccag 1800

ctcacagctg tcagaaaatt catagaaatg ggtttcattg atgaagaaag aatagccata 1860

tggggctggt cctacggagg ttatgtttca tccctggccc ttgcatctgg aactggtctt 1920

ttcaaatgtg gcatagcagt ggctccagtc tccagctggg aatattacgc atctatctac 1980

tcagagagat tcatgggcct cccaacaaag gacgacaatc tcgaacacta taaaaattca 2040

actgtgatgg caagagcaga atatttcaga aatgtagact atcttctcat ccacggaaca 2100

gcagatgata atgtgcactt tcagaactca gcacagattg ctaaagcttt ggttaatgca 2160

caagtggatt tccaggcgat gtggtactct gaccagaacc atggtatatc atctgggcgc 2220

tcccagaatc atttatatac ccacatgacg cacttcctca agcaatgctt ttctttatca 2280

gactga 2286

<210> 3
<211> 760
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Met Lys Thr Trp Val Lys Ile Val Phe Gly Val Ala Thr Ser Ala Val
1               5                  10                  15

Leu Ala Leu Leu Val Met Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val His
            20                  25                  30

Asn Ser Glu Glu Asn Thr Met Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
        35                  40                  45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Phe Phe Pro Asn Trp Ile Ser Gly
    50                  55                  60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Ala Asp Asn Asn Ile Val Leu Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ile Glu Thr Gly Gln Ser Tyr Thr Ile Leu Ser Asn Arg Thr Met Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asn Ala Ser Asn Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
            100                 105                 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
        115                 120                 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Ser Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Asn
    130                 135                 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145                 150                 155                 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
                165                 170                 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Phe Asn Gly Arg Glu Asn Lys Ile
            180                 185                 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
        195                 200                 205

Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asn Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Ala
    210                 215                 220

Glu Phe Asn Asp Thr Asp Ile Pro Val Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225                 230                 235                 240
```

```
Asp Glu Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
                245                 250                 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Ile Phe Ile Ile Asp Thr Thr Tyr Pro
            260                 265                 270

Ala Tyr Val Gly Pro Gln Glu Val Pro Val Pro Ala Met Ile Ala Ser
        275                 280                 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Thr Asp Glu Arg Val
    290                 295                 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305                 310                 315                 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp Gln Thr Trp Asp Cys Pro Lys Thr Gln
                325                 330                 335

Glu His Ile Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Val Phe Ser Tyr Asp Ala Ile Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
    370                 375                 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Asn Ile
385                 390                 395                 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
                405                 410                 415

Glu Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Ser Tyr
            420                 425                 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
        435                 440                 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Asp Tyr Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
    450                 455                 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Ile Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465                 470                 475                 480

Thr Asp Gln Glu Ile Lys Ile Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
                485                 490                 495
```

```
Ala Leu Lys Asn Ile Gln Leu Pro Lys Glu Glu Ile Lys Lys Leu Glu
            500                 505                 510

Val Asp Glu Ile Thr Leu Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
        515                 520                 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
    530                 535                 540

Cys Ser Gln Ser Val Arg Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Ser Tyr
545                 550                 555                 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Met Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
                565                 570                 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Leu Leu Tyr Ala Val Tyr Arg Lys Leu
            580                 585                 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Ile Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
        595                 600                 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Lys Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
    610                 615                 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625                 630                 635                 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
                645                 650                 655

Ala Ser Val Tyr Thr Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
            660                 665                 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
        675                 680                 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
    690                 695                 700

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705                 710                 715                 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Leu
                725                 730                 735

Ser Gly Leu Ser Thr Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe Leu
            740                 745                 750

                    Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
                755                 760
```

<210> 4
<211> 761
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 4

```
Met Lys Thr Trp Leu Lys Thr Val Phe Gly Val Thr Thr Leu Ala Ala
1               5                  10                  15

Leu Ala Leu Val Val Ile Cys Ile Val Leu Arg Pro Ser Arg Val Tyr
            20                  25                  30

Lys Pro Glu Gly Asn Thr Lys Arg Ala Leu Thr Leu Lys Asp Ile Leu
        35                  40                  45

Asn Gly Thr Phe Ser Tyr Lys Thr Tyr Phe Pro Asn Trp Ile Ser Glu
    50                  55                  60

Gln Glu Tyr Leu His Gln Ser Glu Asp Asp Asn Ile Val Phe Tyr Asn
65                  70                  75                  80

Ile Glu Thr Arg Glu Ser Tyr Ile Ile Leu Ser Asn Ser Thr Met Lys
                85                  90                  95

Ser Val Asn Ala Thr Asp Tyr Gly Leu Ser Pro Asp Arg Gln Phe Val
            100                 105                 110

Tyr Leu Glu Ser Asp Tyr Ser Lys Leu Trp Arg Tyr Ser Tyr Thr Ala
        115                 120                 125

Thr Tyr Tyr Ile Tyr Asp Leu Gln Asn Gly Glu Phe Val Arg Gly Tyr
    130                 135                 140

Glu Leu Pro Arg Pro Ile Gln Tyr Leu Cys Trp Ser Pro Val Gly Ser
145                 150                 155                 160

Lys Leu Ala Tyr Val Tyr Gln Asn Asn Ile Tyr Leu Lys Gln Arg Pro
                165                 170                 175

Gly Asp Pro Pro Phe Gln Ile Thr Tyr Thr Gly Arg Glu Asn Arg Ile
            180                 185                 190

Phe Asn Gly Ile Pro Asp Trp Val Tyr Glu Glu Glu Met Leu Ala Thr
        195                 200                 205
```

```
Lys Tyr Ala Leu Trp Trp Ser Pro Asp Gly Lys Phe Leu Ala Tyr Val
    210                 215                 220

Glu Phe Asn Asp Ser Asp Ile Pro Ile Ile Ala Tyr Ser Tyr Tyr Gly
225                 230                 235                 240

Asp Gly Gln Tyr Pro Arg Thr Ile Asn Ile Pro Tyr Pro Lys Ala Gly
                245                 250                 255

Ala Lys Asn Pro Val Val Arg Val Phe Ile Val Asp Thr Thr Tyr Pro
            260                 265                 270

His His Val Gly Pro Met Glu Val Pro Val Pro Glu Met Ile Ala Ser
        275                 280                 285

Ser Asp Tyr Tyr Phe Ser Trp Leu Thr Trp Val Ser Ser Glu Arg Val
    290                 295                 300

Cys Leu Gln Trp Leu Lys Arg Val Gln Asn Val Ser Val Leu Ser Ile
305                 310                 315                 320

Cys Asp Phe Arg Glu Asp Trp His Ala Trp Glu Cys Pro Lys Asn Gln
                325                 330                 335

Glu His Val Glu Glu Ser Arg Thr Gly Trp Ala Gly Gly Phe Phe Val
            340                 345                 350

Ser Thr Pro Ala Phe Ser Gln Asp Ala Thr Ser Tyr Tyr Lys Ile Phe
        355                 360                 365

Ser Asp Lys Asp Gly Tyr Lys His Ile His Tyr Ile Lys Asp Thr Val
    370                 375                 380

Glu Asn Ala Ile Gln Ile Thr Ser Gly Lys Trp Glu Ala Ile Tyr Ile
385                 390                 395                 400

Phe Arg Val Thr Gln Asp Ser Leu Phe Tyr Ser Ser Asn Glu Phe Glu
                405                 410                 415

Gly Tyr Pro Gly Arg Arg Asn Ile Tyr Arg Ile Ser Ile Gly Asn Ser
            420                 425                 430

Pro Pro Ser Lys Lys Cys Val Thr Cys His Leu Arg Lys Glu Arg Cys
        435                 440                 445

Gln Tyr Tyr Thr Ala Ser Phe Ser Tyr Lys Ala Lys Tyr Tyr Ala Leu
```

```
    450                 455                 460

Val Cys Tyr Gly Pro Gly Leu Pro Ile Ser Thr Leu His Asp Gly Arg
465                 470                 475                 480

Thr Asp Gln Glu Ile Gln Val Leu Glu Glu Asn Lys Glu Leu Glu Asn
                485                 490                 495

Ser Leu Arg Asn Ile Gln Leu Pro Lys Val Glu Ile Lys Lys Leu Lys
            500                 505                 510

Asp Gly Gly Leu Thr Phe Trp Tyr Lys Met Ile Leu Pro Pro Gln Phe
        515                 520                 525

Asp Arg Ser Lys Lys Tyr Pro Leu Leu Ile Gln Val Tyr Gly Gly Pro
    530                 535                 540

Cys Ser Gln Ser Val Lys Ser Val Phe Ala Val Asn Trp Ile Thr Tyr
545                 550                 555                 560

Leu Ala Ser Lys Glu Gly Ile Val Ile Ala Leu Val Asp Gly Arg Gly
                565                 570                 575

Thr Ala Phe Gln Gly Asp Lys Phe Leu His Ala Val Tyr Arg Lys Leu
            580                 585                 590

Gly Val Tyr Glu Val Glu Asp Gln Leu Thr Ala Val Arg Lys Phe Ile
        595                 600                 605

Glu Met Gly Phe Ile Asp Glu Glu Arg Ile Ala Ile Trp Gly Trp Ser
    610                 615                 620

Tyr Gly Gly Tyr Val Ser Ser Leu Ala Leu Ala Ser Gly Thr Gly Leu
625                 630                 635                 640

Phe Lys Cys Gly Ile Ala Val Ala Pro Val Ser Ser Trp Glu Tyr Tyr
                645                 650                 655

Ala Ser Ile Tyr Ser Glu Arg Phe Met Gly Leu Pro Thr Lys Asp Asp
            660                 665                 670

Asn Leu Glu His Tyr Lys Asn Ser Thr Val Met Ala Arg Ala Glu Tyr
        675                 680                 685

Phe Arg Asn Val Asp Tyr Leu Leu Ile His Gly Thr Ala Asp Asp Asn
    690                 695                 700
```

Val His Phe Gln Asn Ser Ala Gln Ile Ala Lys Ala Leu Val Asn Ala
705 710 715 720

Gln Val Asp Phe Gln Ala Met Trp Tyr Ser Asp Gln Asn His Gly Ile
725 730 735

Ser Ser Gly Arg Ser Gln Asn His Leu Tyr Thr His Met Thr His Phe
740 745 750

Leu Lys Gln Cys Phe Ser Leu Ser Asp
755 760

<210> 5
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 5

Gly Arg Gly Pro
1

<210> 6
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa
<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<400> 6

Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro
1 5 10

<210> 7
<211> 10

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<400> 7

Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 8

Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10

<210> 9
<211> 11
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn
<220>

<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (7)..(7)

<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro
<400> 9

Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro
1 5 10

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (3)..(3)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<400> 10

Pro Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 11

Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10

<210> 12
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS

<222> (6)..(6)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser
<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (9)..(9)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (15)..(15)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<400> 12

Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro Xaa
1 5 10 15

<210> 13
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (15)..(15)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<400> 13

Xaa Xaa Cys Pro Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa
1 5 10 15

<210> 14
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 14

Gly Lys Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp
1 5 10 15

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 15

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp
1 5 10 15

<210> 16
<211> 18
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (1)..(1)
<223> Repetir de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2 veces

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (3)..(3)
<223> Repetir de 3 a 10, preferentemente, 6, 7 u 8 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (3)..(3)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (8)..(8)
<223> Repetir de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS

<222> (8)..(8)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (10)..(10)
<223> Repetir de 3 a 7, preferentemente, 4, 5 o 6 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (10)..(10)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (12)..(12)
<223> Repetir de 2 a 6, preferentemente, 2, 3 o 4 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (12)..(12)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (14)..(14)
<223> Repetir de 1 a 3, preferentemente, 1 o 2 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (14)..(14)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (16)..(16)
<223> Repetir de 3 a 7, preferentemente, 4, 5 o 6 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (16)..(16)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<220>
<221> REPETICIÓN
<222> (18)..(18)
<223> Repetir de 0 a 4, preferentemente, 1 o 2 veces

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (18)..(18)
<223> Independientemente de cualquier otro aminoácido

<400> 16

```
Xaa Cys Xaa Gly Arg Gly Pro Xaa Cys Xaa Cys Xaa Cys Xaa Cys Xaa
1               5                   10                  15


Cys Xaa
```

<210> 17
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (8)..(8)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (23)..(23)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg

<400> 17

```
Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro Xaa Cys Arg Arg
1               5                   10                  15

Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys
            20                  25                  30
```

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (23)..(23)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg

<400> 18

```
Cys Pro Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa Cys Arg Arg
1               5                   10                  15

Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys
            20                  25                  30
```

<210> 19
<211> 32
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 19

```
Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys Arg Arg
1               5                   10                  15

Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys
            20                  25                  30
```

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)

<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (9)..(9)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (10)..(10)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (15)..(15)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (25)..(25)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg

<400> 20

```
Xaa Xaa Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro Xaa Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 21
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa
<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (1)..(1)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Gly y Ala, con mayor preferencia, Gly

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Lys y Ala

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (6)..(6)

<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (15)..(15)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (25)..(25)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg

<400> 21

```
Xaa Xaa Cys Pro Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Xaa Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 22
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 22

```
Gly Lys Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 23
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 23

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 24
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 24

Gly Ala Cys Pro Tyr Arg Asn Trp Met Thr Gly Arg Gly Pro Leu Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 25
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 25

Gly Ala Cys Met Tyr Met Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 26
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 26

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Ser Trp Ala Asp Gly Arg Gly Pro His Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 27
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 27

Gly Ala Cys Val Tyr Gln His Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 28
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 28

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Arg Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 29
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a la Seprasa
<400> 29

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Arg Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

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

<220>

<223> Péptido de unión a la Seprasa
<400> 30

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 31
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 31

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Arg Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 32
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 32

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp Arg Pro Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 33
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 33

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 34
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 34

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Arg Trp Met Pro Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 35

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Asn Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 36
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa
<400> 36

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Tyr Trp His Pro Gly Arg Gly Pro Gly Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 37
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Péptido de unión a la Seprasa
<400> 37

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Arg Pro Gly Arg Gly Pro Glu Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 38
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 38

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Trp Met Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

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

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 39

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Arg Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 40
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 40

Gly Ala Cys Val Tyr His Thr Trp Met Pro Gly Arg Gly Pro Val Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 41
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 41

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Arg Trp Ala Ala Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 42
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 42

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Thr Trp Gln Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 43
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 43

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Arg Trp Thr Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 44
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 44

Gly Ala Cys Gln Tyr Gly Leu Trp Glu Val Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 45
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 45

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 46
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 46

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp His Pro Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 47
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 47

```
Gly Ala Cys Met Tyr Trp Gly Trp Glu Pro Gly Arg Gly Pro His Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 48
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 48

Gly Ala Cys Phe Tyr Ile Glu Trp Gln Val Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 49
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 49

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Arg Trp Val Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 50
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 50

Gly Ala Cys Ala Tyr Ala Asn Trp Gln Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 51
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 51

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Arg Trp Val Leu Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 52
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 52

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp His Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 53
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 53

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Tyr Trp His Ala Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 54
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 54

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Thr Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 55
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 55

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Arg Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 56
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 56

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Thr Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 57
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 57

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Arg Trp Asn Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 58
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 58

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Trp Thr Ile Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 59
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 59

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Arg Trp His Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 60
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 60

Gly Ala Cys Ala Tyr Ser Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 61
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 61

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Thr Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 62
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 62

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 63
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 63

Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro His Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 64
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 64

Gly Ala Cys Pro Tyr Arg Asn Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro Thr Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 65
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 65

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Val Gly Arg Gly Pro Glu Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 66
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 66

Gly Ala Cys Pro Tyr His Thr Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro Gly Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 67
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 67

Gly Ala Cys Pro Tyr Arg Asn Trp Ser Pro Gly Arg Gly Pro His Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 68
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 68

Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Phe Trp Arg Val Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 69
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 69

Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Val Gly Arg Gly Pro Ala Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 70
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 70

Gly Ala Cys Val Tyr Trp Gln Trp Ile Ala Gly Arg Gly Pro Val Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 71
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 71

Gly Ala Cys Trp Tyr Asp Pro Trp Trp Leu Gly Arg Gly Pro Val Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 72
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 72

Gly Ala Cys Met Tyr Asp Thr Trp Ala Gln Gly Arg Gly Pro Asn Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 73
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 73

Gly Ala Cys Leu Tyr Glu Val Trp Pro Leu Gly Arg Gly Pro Gln Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 74
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 74

Gly Ala Cys Ala Tyr Ser Asn Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro His Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 75
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 75

Gly Ala Cys Glu Tyr His Val Trp Met Gly Gly Arg Gly Pro His Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 76
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 76

```
Gly Ala Cys Ala Tyr Ser Ser Trp Ser Ala Gly Arg Gly Pro Met Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 77
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 77

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Val Asn Trp Ala Ala Gly Arg Gly Pro Val Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 78
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 78

```
Gly Ala Cys Pro Tyr Ala Val Trp Ala Ser Gly Arg Gly Pro Ser Cys
1               5                   10                  15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
            20                  25                  30

Tyr Cys Gly
        35
```

<210> 79
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa
<400> 79

Gly Ala Cys Glu Tyr Ser Ala Trp Leu Ala Gly Arg Gly Pro Glu Cys
1 5 10 15

Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly
20 25 30

Tyr Cys Gly
35

<210> 80
<211> 32
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 80
gcgcaagctt gctgcggccc tcccgggtgc ac 32

<210> 81
<211> 35
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Oligonucleótido

<400> 81
gcgcagcggc cgcgtcggac agggagaagc actgc 35

<210> 82
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Motivo de serina proteasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido

<400> 82

Gly Xaa Ser Xaa Gly
1 5

<210> 83
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Motivo de serina proteasa

<400> 83

Gly Trp Ser Tyr Gly
1 5

<210> 84
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador

<400> 84

Gly Phe Leu Gly
1

<210> 85
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (2)..(2)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (5)..(5)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (7)..(7)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (8)..(8)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<400> 85

Cys Xaa Tyr Xaa Xaa Trp Xaa Xaa Gly Arg Gly Pro Xaa Cys
1 5 10

<210> 86
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial
<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (4)..(4)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser

<220>
<221> CARACT_MISCELÁNEAS
<222> (13)..(13)
<223> Cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp

<400> 86

```
Cys Pro Tyr Xaa Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Xaa Cys
1               5                   10
```

<210> 87
<211> 14
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 87

```
Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys
1               5                   10
```

<210> 88
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 88

```
Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1               5                   10                  15

Asp Cys Ser Gln Asp Ser Asp Cys Leu Ala Gly Cys Val Cys Gly Pro
            20                  25                  30

Asn Gly Phe Cys Gly
        35
```

<210> 89
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 89

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Asp Cys Ser Ser Asp Ser Asp Cys Pro Gly Ala Cys Ile Cys Leu Glu
20 25 30

Asn Gly Phe Cys Gly
35

<210> 90
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 90

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Arg Trp Met Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Ser Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 91
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 91

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp Arg Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Ala Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 92
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 92

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Arg Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Asp Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 93
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 93

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Arg Trp Gln Pro Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Ser Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 94
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 94

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Arg Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Asp Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 95
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 95

Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Ala Val Gly Arg Gly Pro
1 5 10 15

Ser Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
20 25 30

Asn Gly Tyr Cys Gly
35

<210> 96
<211> 37
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido de unión a la Seprasa

<400> 96

```
Gly Ser Gly Ala Cys Pro Tyr Thr Asn Trp His Pro Gly Arg Gly Pro
1               5                   10                  15

Ala Cys Arg Arg Asp Ser Asp Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly
            20                  25                  30

Asn Gly Tyr Cys Gly
        35
```

REIVINDICACIONES

1. Un péptido de unión a la Seprasa, que comprende la secuencia de aminoácidos:
Tyr Xaa2 Xaa3 Trp Xaa4 Xaa5 Gly Arg Gly Pro
en donde
Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,
Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,
Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,
Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro.

2. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Xaa1 Tyr Xaa2 Xaa3 Trp Xaa4 Xaa5 Gly Arg Gly Pro Xaa6 Cys Arg Arg Asp
Ser Asp Cys Pro Gly Xaa7 Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys

en donde
Xaa1 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,
Xaa2 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser, Ala y Cys, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Ser y Ala, con mayor preferencia, Ser,
Xaa3 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn, Ala y Asp, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asn y Ala, con mayor preferencia, Asn,
Xaa4 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr, Ala y Val, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Thr y Ala, con mayor preferencia, Thr,
Xaa5 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Pro y Ala, con mayor preferencia, Pro,
Xaa6 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp, Ala y Asn, con mayor preferencia, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Asp y Ala, con mayor preferencia, Asp,
Xaa7 es cualquier aminoácido, preferentemente, un aminoácido seleccionado del grupo que consiste en Arg y Ala, con mayor preferencia, Arg.

3. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 1 o 2, que comprende la secuencia de aminoácidos:

Cys Pro Tyr Ser Asn Trp Thr Pro Gly Arg Gly Pro Asp Cys Arg Arg Asp Ser Asp
Cys Pro Gly Arg Cys Ile Cys Arg Gly Asn Gly Tyr Cys.

4. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 1 o 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en as SEQ ID NO: 22 a 79 y 88 a 96 del listado de secuencias.

5. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que forma y/o es parte de una estructura de nudo de cistina, preferentemente, una estructura de nudo de cistina inhibidora.

6. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 que comprende, además, al menos una pareja de fusión, en donde la pareja de fusión comprende, preferentemente, una secuencia de aminoácidos heteróloga.

7. Un agente de unión a la Seprasa que comprende el péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 asociado covalentemente y/o no covalentemente, preferentemente, covalentemente, con al menos un resto adicional.

8. El agente de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 7, que comprende al menos dos subunidades que se asocian covalentemente y/o no covalentemente, cada una de dichas subunidades comprende un péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en donde los péptidos de unión a la Seprasa pueden ser idénticos o diferentes.

9. El agente de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 7, que comprende el péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el agente de unión a la Seprasa de conformidad con la reivindicación 7 u 8 asociado covalentemente y/o no covalentemente, preferentemente, covalentemente, con al menos un marcador o indicador detectable y/o al menos un resto efector terapéutico.

10. Un ácido nucleico recombinante que codifica un péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6.

11. Un método para analizar la presencia y/o cantidad de la Seprasa en una muestra que comprende usar el péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el agente de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

12. Un método para el diagnóstico, la detección o el monitoreo del cáncer en un paciente que comprende analizar la presencia y/o cantidad de la Seprasa en una muestra biológica de dicho paciente mediante el uso del péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 o el agente de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9.

13. Una composición farmacéutica que comprende el péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el agente de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9 o el ácido nucleico recombinante de conformidad con la reivindicación 10.

14. El péptido de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, el agente de unión a la Seprasa de conformidad con cualquiera de las reivindicaciones 7 a 9, el ácido nucleico recombinante de conformidad con la reivindicación 10 o la composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 13 para su uso en terapia, en particular para su uso en el tratamiento o prevención del cáncer en un paciente.

15. La composición farmacéutica de conformidad con la reivindicación 13 o el péptido de unión a la Seprasa, el agente de unión a la Seprasa, el ácido nucleico recombinante o la composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 14, en donde el péptido de unión a la Seprasa o el agente de unión a la Seprasa comprende o se conjuga con al menos un resto efector terapéutico.

16. El método de conformidad con la reivindicación 12 o el péptido de unión a la Seprasa, el agente de unión a la Seprasa, el ácido nucleico recombinante o la composición farmacéutica para su uso de conformidad con la reivindicación 14 o 15, en donde el cáncer es positivo a la Seprasa y/o involucra células que expresan la Seprasa.

Figura 1

Figura 2

A

		K_D Aparente [nM]	Error	Valor R2	Unión relativa en comparación con Trx-MC-FA-010 [%]
	Trx-MC-FA-010	15,16	0,83	0,9982	100
G	Trx-MC-FA-011	20,33	1,17	0,9981	74,55
K	Trx-MC-FA-012	9,49	0,54	0,9981	159,67
P	Trx-MC-FA-013	44,92	3,04	0,9976	33,74
Y	Trx-MC-FA-014	Sin unión			0
S	Trx-MC-FA-015	16,2	1,02	0,9976	93,56
N	Trx-MC-FA-016	113,29	11,54	0,9969	13,38
W	Trx-MC-FA-017	Sin unión			0
T	Trx-MC-FA-018	50,61	3,63	0,9974	29,95
P	Trx-MC-FA-019	78,68	7,6	0,9962	19,26
G	Trx-MC-FA-0110	Sin unión			0
R	Trx-MC-FA-0111	Sin unión			0
G	Trx-MC-FA-0112	217,28	64,43	0,9863	6,98
P	Trx-MC-FA-0113	Sin unión			0
D	Trx-MC-FA-0114	25,61	1,76	0,9973	59,19
R	Trx-MC-FA-0115	18,78	1,17	0,9977	80,72
	Trx-MC-Myc-010	Sin unión			0

B

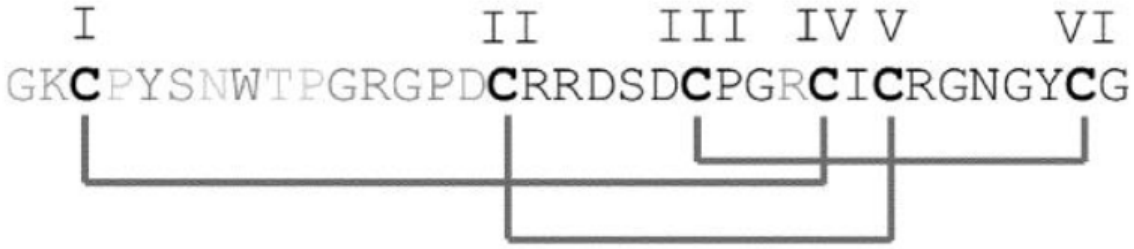


Figura 3

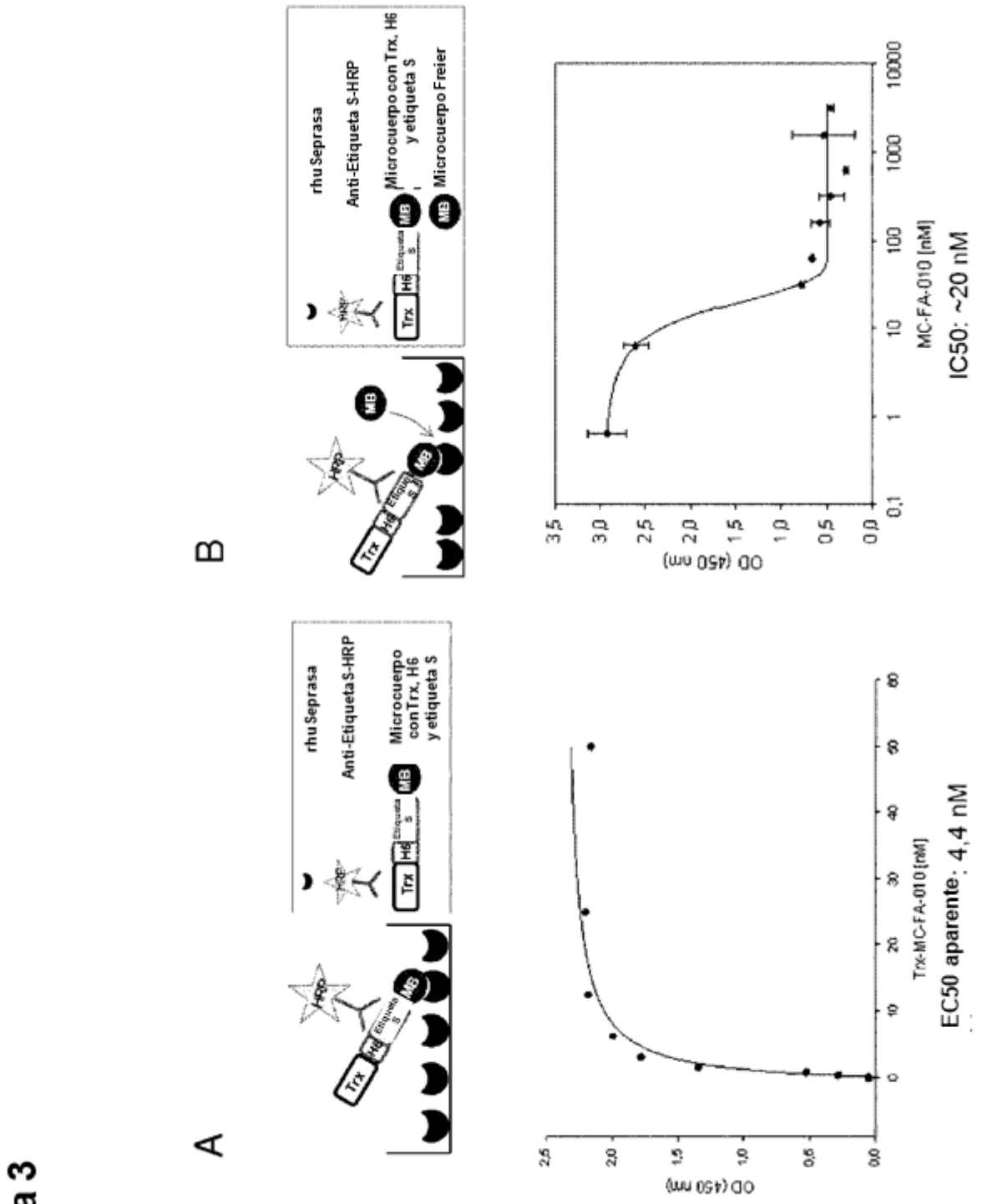

A
rhu Seprasa
Anti-Etiqueta S-HRP
Microcuerpo con Trx, H6 y etiqueta S
Trx
H6
Etiqueta S
MB
HRP
OD (450 nm)
Trx-MC-FA-010 [nM]
EC50 aparente: 4,4 nM
B
rhu Seprasa
Anti-Etiqueta S-HRP
Microcuerpo con Trx, H6 y etiqueta S
Microcuerpo Freier
OD (450 nm)
MC-FA-010 [nM]
IC50: ~20 nM

Figura 4

A

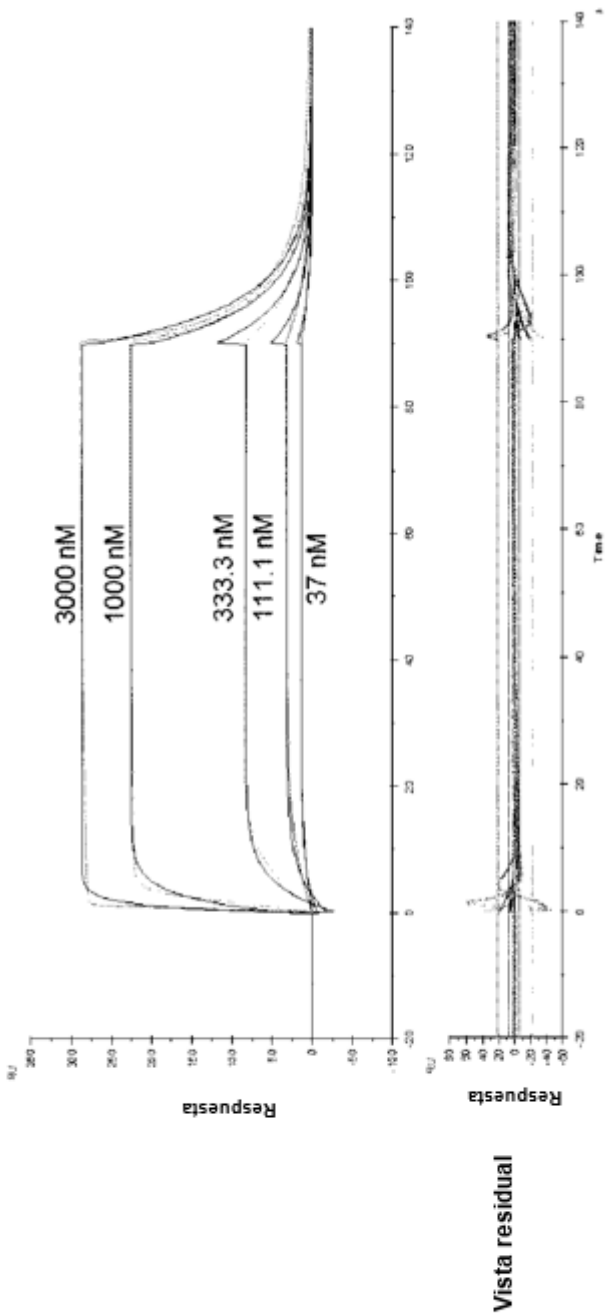

3000 nM
1000 nM
333.3 nM
111.1 nM
37 nM
Respuesta
Vista residual
Respuesta

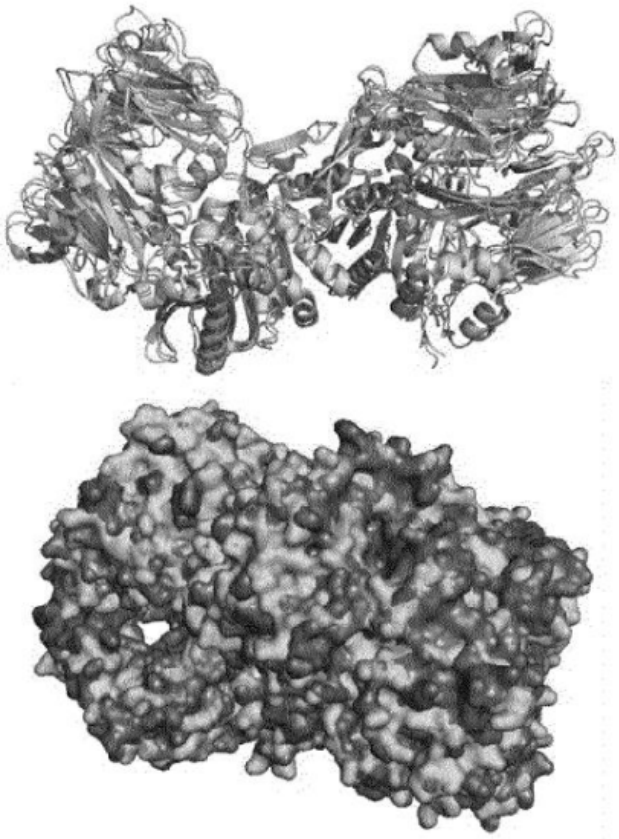
Figura 4

B

Curva	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	Rmáx (RU)	Conc (M)	tc	Flujo (ul/min)	kt (RU/Ms)	RI (RU)	Chi² (RU²)	Valor U
	2,684E+5	0,1507	5,615E-7	316,6		6,730E+11				9,42	1
Ciclo : 5 37 nM					3,700E-8		30,00	2,091E+12	-6,159		
Ciclo : 6 111,11 nM					1,111E-7		30,00	2,091E+12	-20,64		
Ciclo : 7 333,33 nM					3,333E-7		30,00	2,091E+12	-34,78		
Ciclo : 8 1000 nM					1,000E-6		30,00	2,091E+12	22,77		
Ciclo : 9 3000 nM					3,000E-6		30,00	2,091E+12	20,39		

Figura 5

A



Seprasa (verde)
DPP-IV (turquesa/gris)
52 % de identidad y 71 % de similitud de secuencia

B

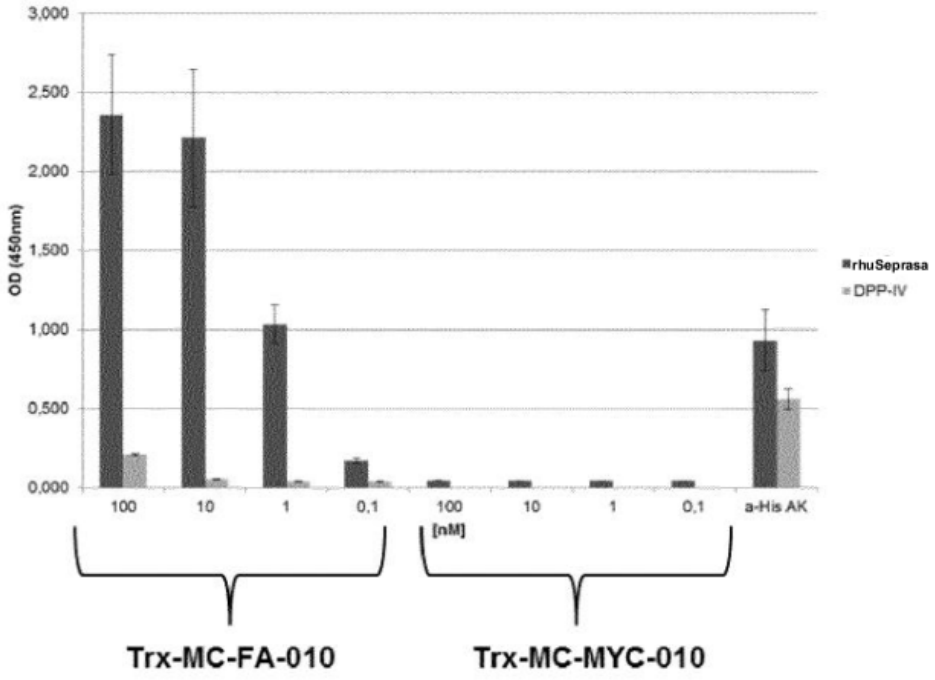


Figura 6

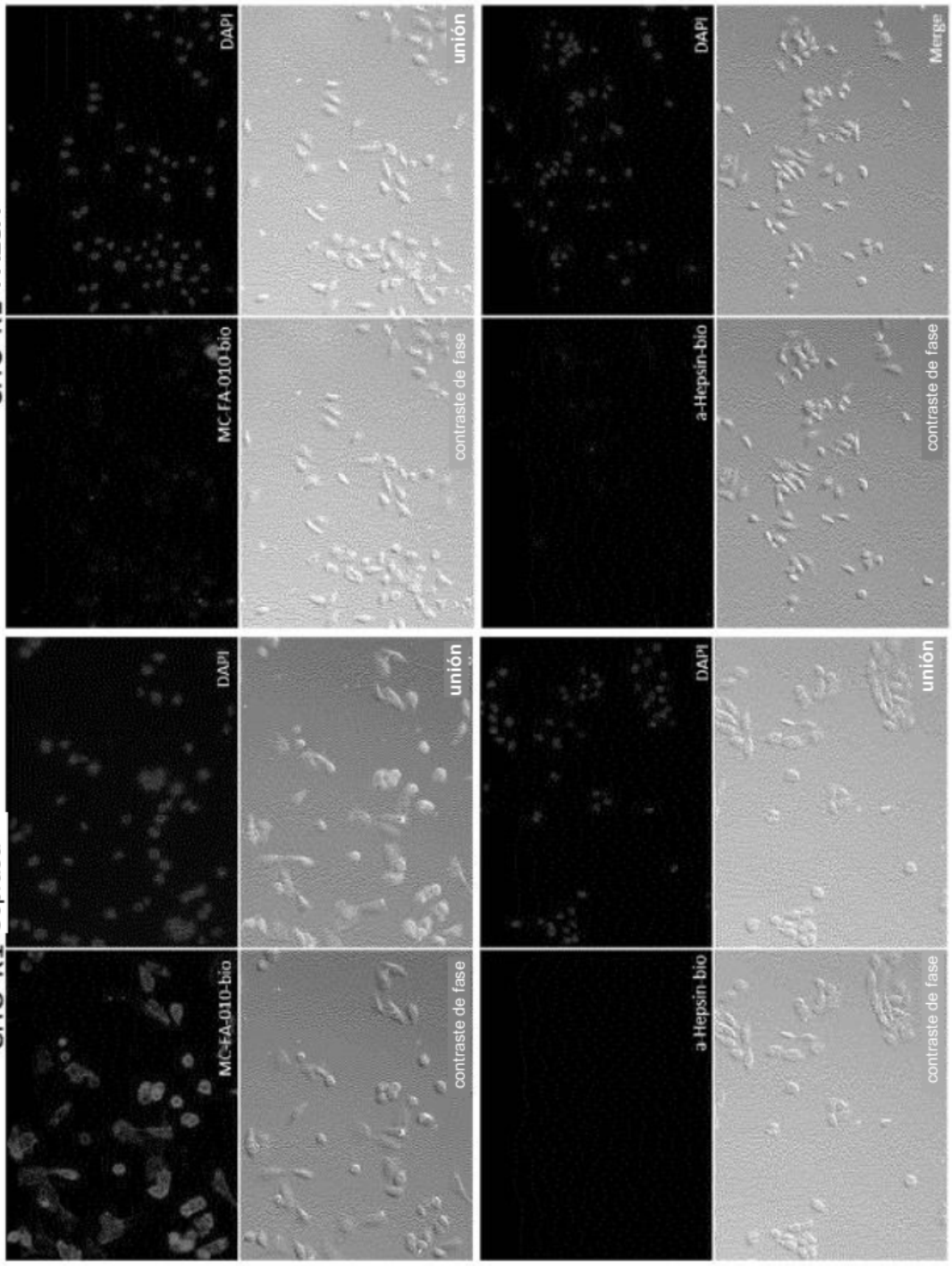

CHO-K1-Seprasa
DAPI
MC-FA-010-bio
unión
contraste de fase
a-Hepsin-bio
CHO-K1-FALSA
DAPI
MC-FA-010-bio
unión
contraste de fase
a-Hepsin-bio
DAPI
unión
contraste de fase
DAPI
Merge
contraste de fase

Figura 7

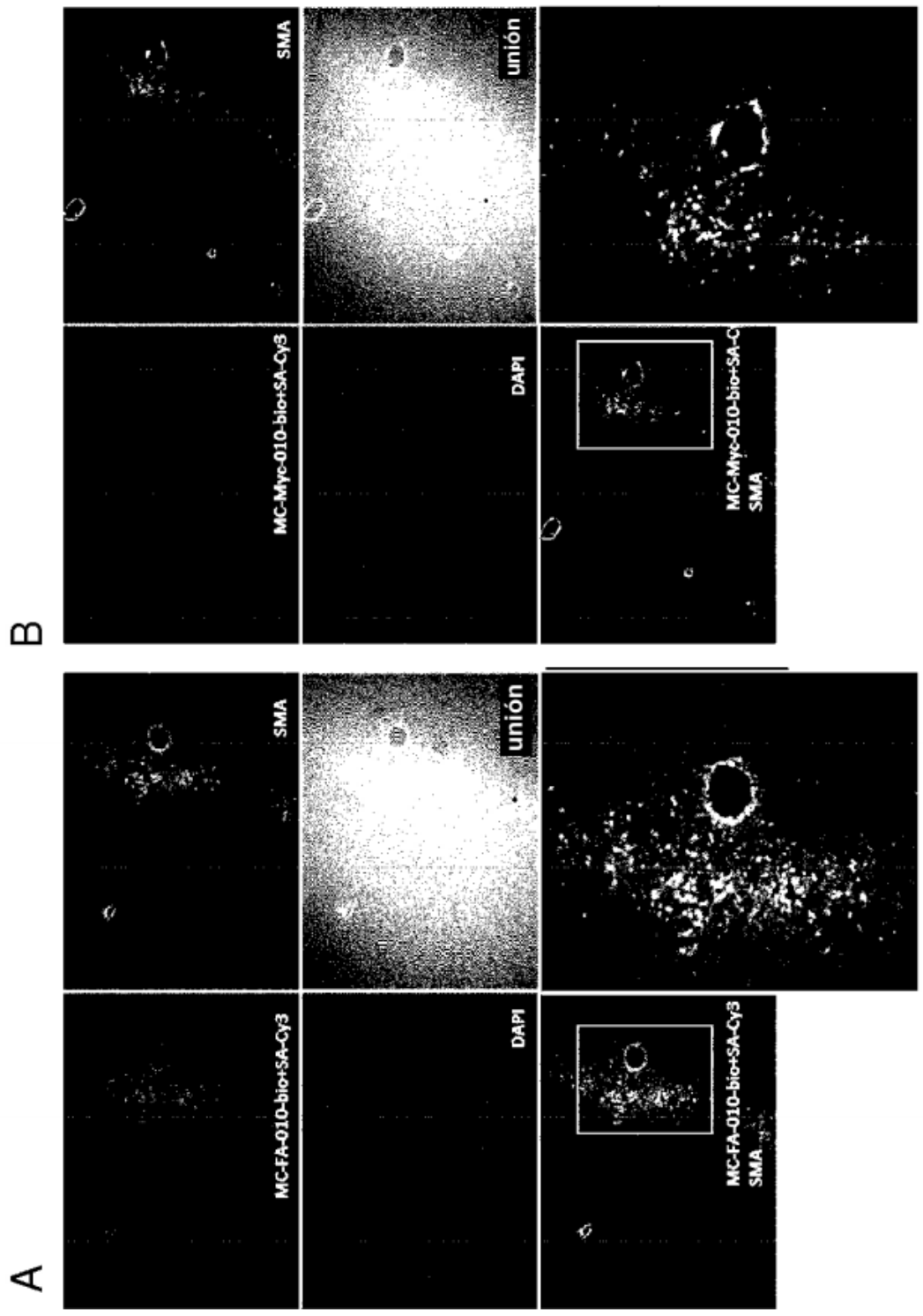

A
MC-FA-010-bio+SA-Cy3
SMA
DAPI
unión
MC-FA-010-bio+SA-Cy3
SMA
B
MC-Myc-010-bio+SA-Cy3
SMA
DAPI
unión
MC-Myc-010-bio+SA-C
SMA

Figura 8

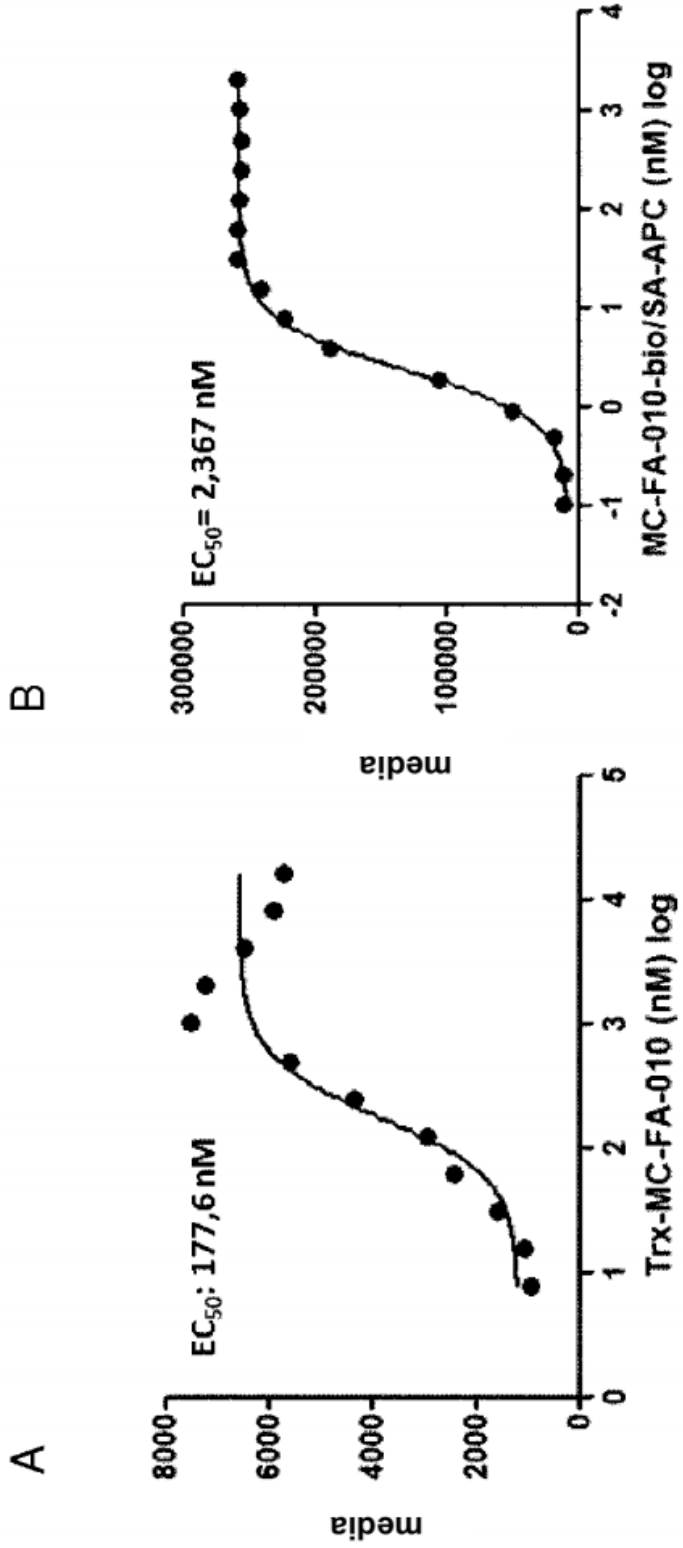

A
B
media
8000
6000
4000
2000
0
EC50: 177,6 nM
0
1
2
3
4
5
Trx-MC-FA-010 (nM) log
media
300000
200000
100000
0
EC50= 2,367 nM
-2
-1
0
1
2
3
4
MC-FA-010-bio/SA-APC (nM) log

Figura 9

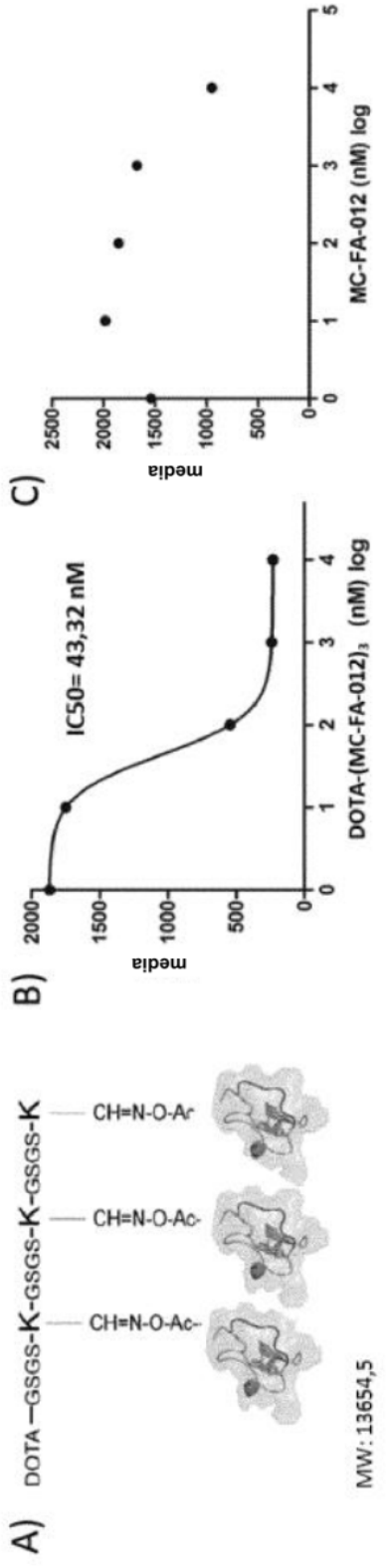

A)
DOTA –GSGS-K-GSGS-K-GSGS-K
CH=N-O-Ac-
CH=N-O-Ac-
CH=N-O-Ac-
MW: 13654,5
B)
media
IC50= 43,32 nM
DOTA-(MC-FA-012)3 (nM) log
C)
media
MC-FA-012 (nM) log

Figura 10

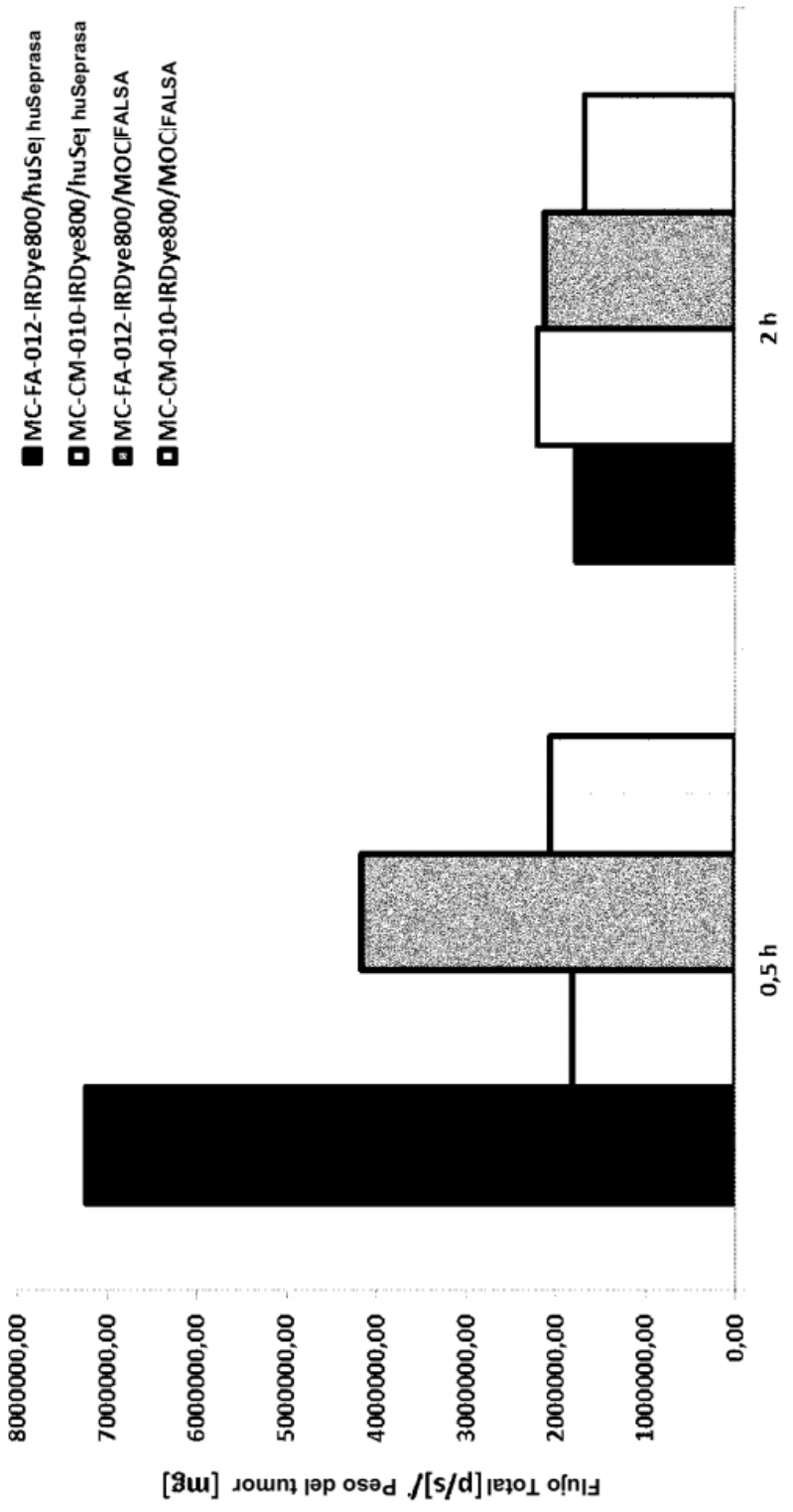
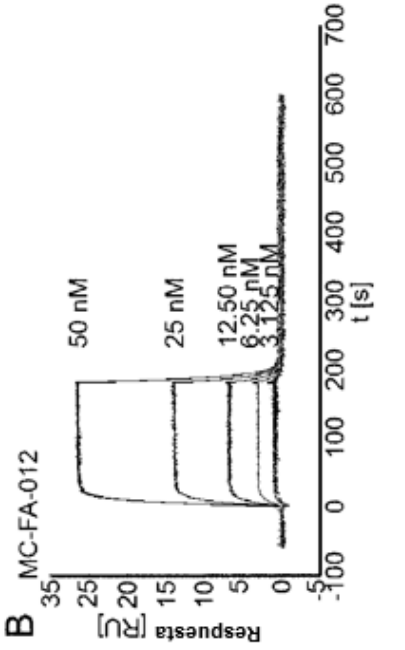

MC-FA-012-IRDye800/huSej huSeprasa
MC-CM-010-IRDye800/huSej huSeprasa
MC-FA-012-IRDye800/MOCIFALSA
MC-CM-010-IRDye800/MOCIFALSA
8000000,00
7000000,00
6000000,00
5000000,00
4000000,00
3000000,00
2000000,00
1000000,00
0,00
Flujo Total [p/s]/ Peso del tumor [mg]
0,5 h
2 h

Figura 11


B
MC-FA-012
Respuesta [RU]
t [s]
50 nM
25 nM
12.50 nM
6.25 nM
3.125 nM

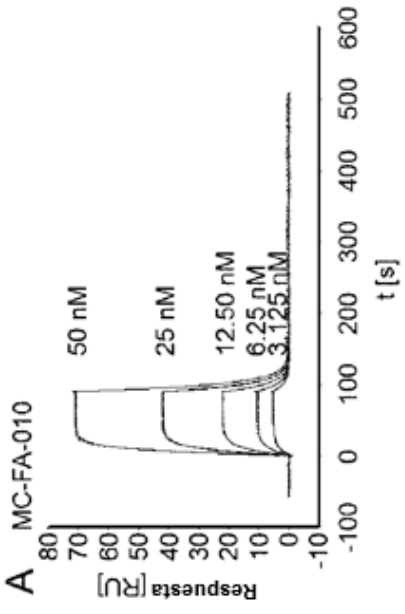

A
MC-FA-010
Respuesta [RU]
t [s]
50 nM
25 nM
12.50 nM
6.25 nM
3.125 nM

Figura 11

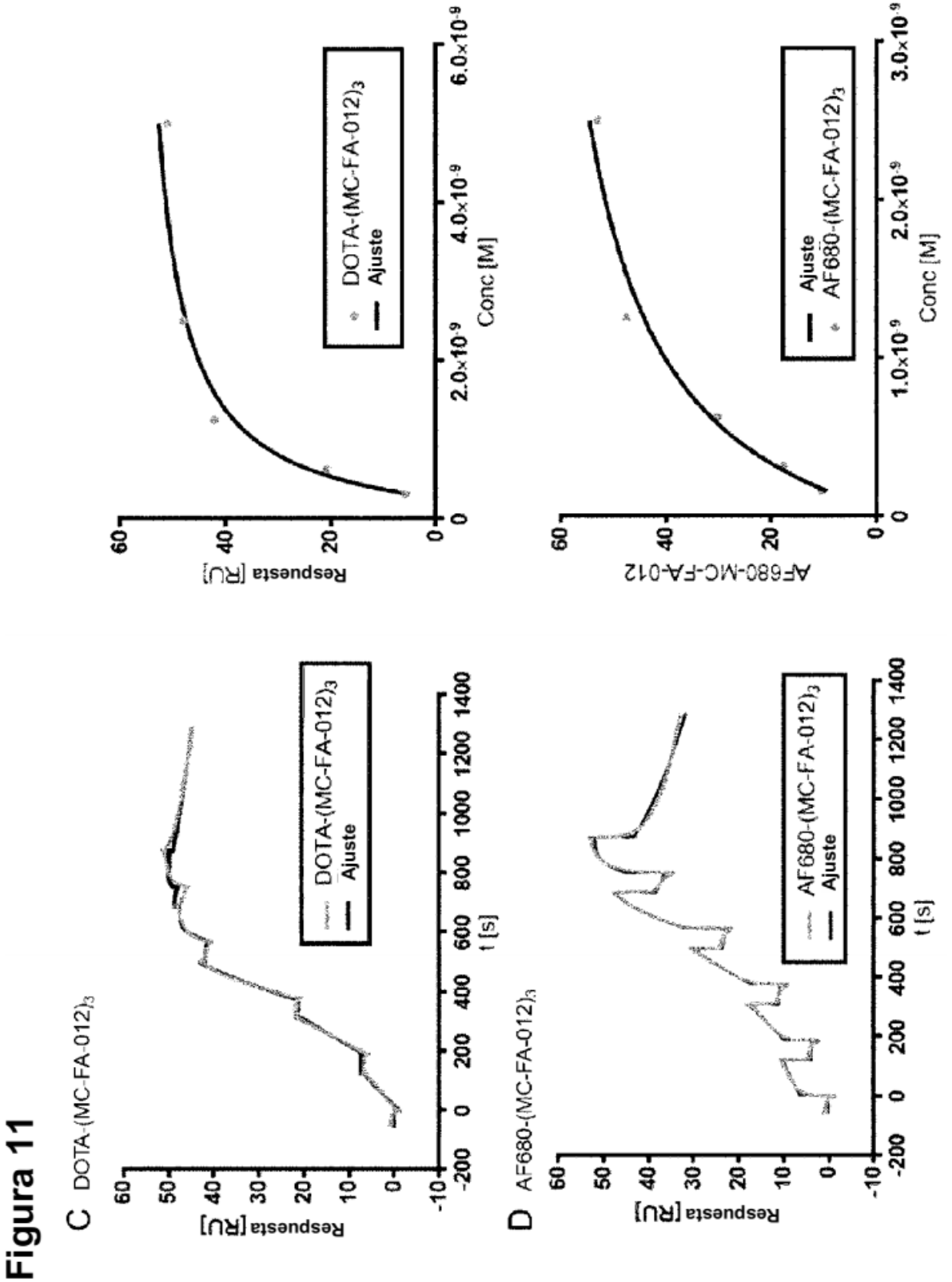

C DOTA-(MC-FA-012)3
Respuesta [RU]
t [s]
DOTA-(MC-FA-012)3
Ajuste
Respuesta [RU]
Conc [M]
DOTA-(MC-FA-012)3
Ajuste
D AF680-(MC-FA-012)3
Respuesta [RU]
t [s]
AF680-(MC-FA-012)3
Ajuste
AF680-MC-FA-012
Conc [M]
Ajuste
AF680-(MC-FA-012)3

Figura 12

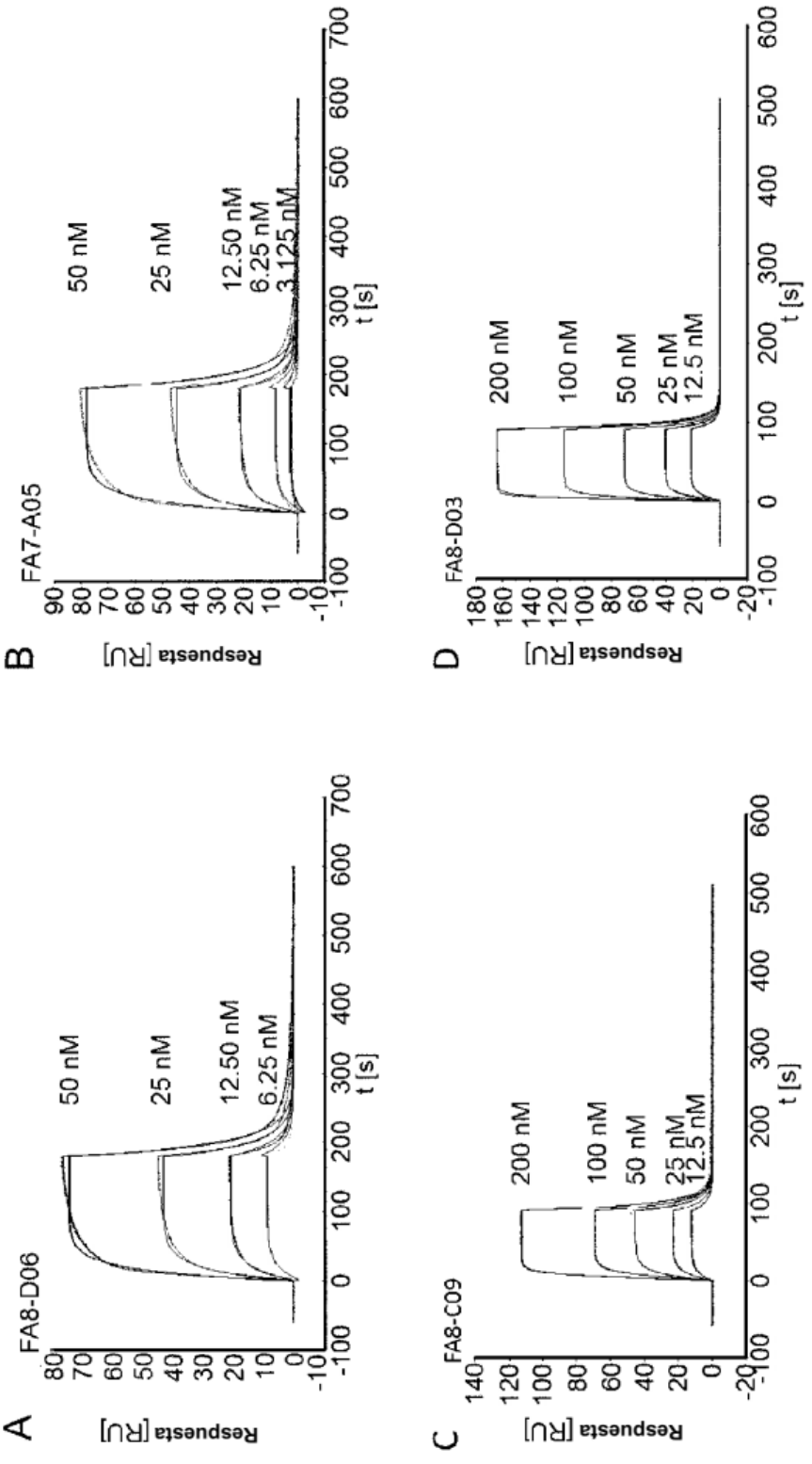

A
FA8-D06
50 nM
25 nM
12.50 nM
6.25 nM
Respuesta [RU]
t [s]
B
FA7-A05
50 nM
25 nM
12.50 nM
6.25 nM
3.125 nM
Respuesta [RU]
t [s]
C
FA8-C09
200 nM
100 nM
50 nM
25 nM
12.5 nM
Respuesta [RU]
t [s]
D
FA8-D03
200 nM
100 nM
50 nM
25 nM
12.5 nM
Respuesta [RU]
t [s]

Figura 12

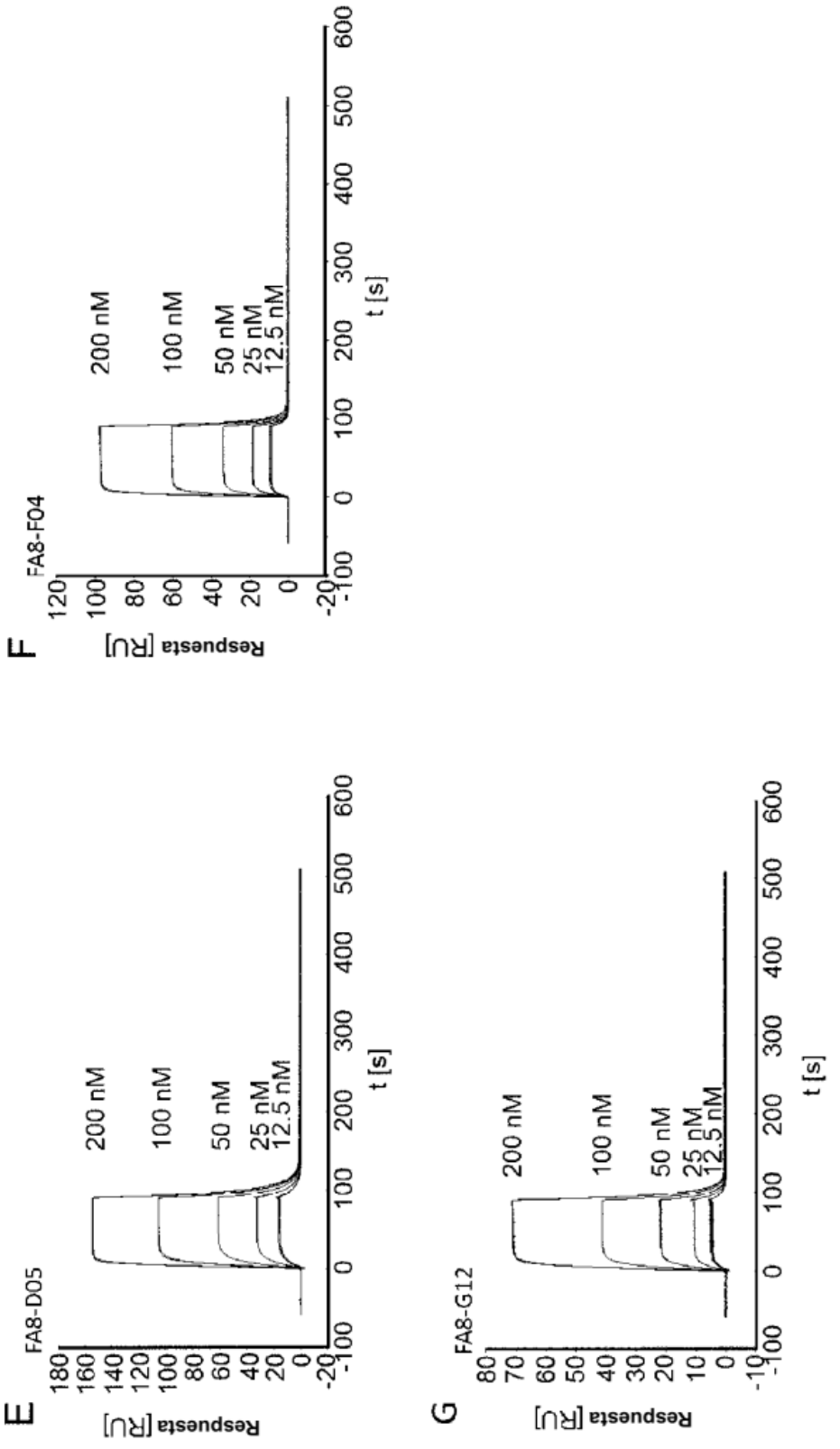
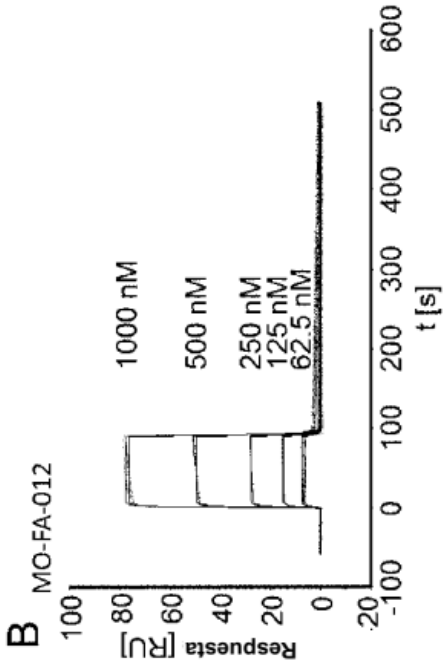

E
FA8-D05
Respuesta [RU]
t [s]
200 nM
100 nM
50 nM
25 nM
12.5 nM
F
FA8-F04
Respuesta [RU]
t [s]
200 nM
100 nM
50 nM
25 nM
12.5 nM
G
FA8-G12
Respuesta [RU]
t [s]
200 nM
100 nM
50 nM
25 nM
12.5 nM

Figura 13


B
MO-FA-012
1000 nM
500 nM
250 nM
125 nM
62.5 nM
Respuesta [RU]
t [s]

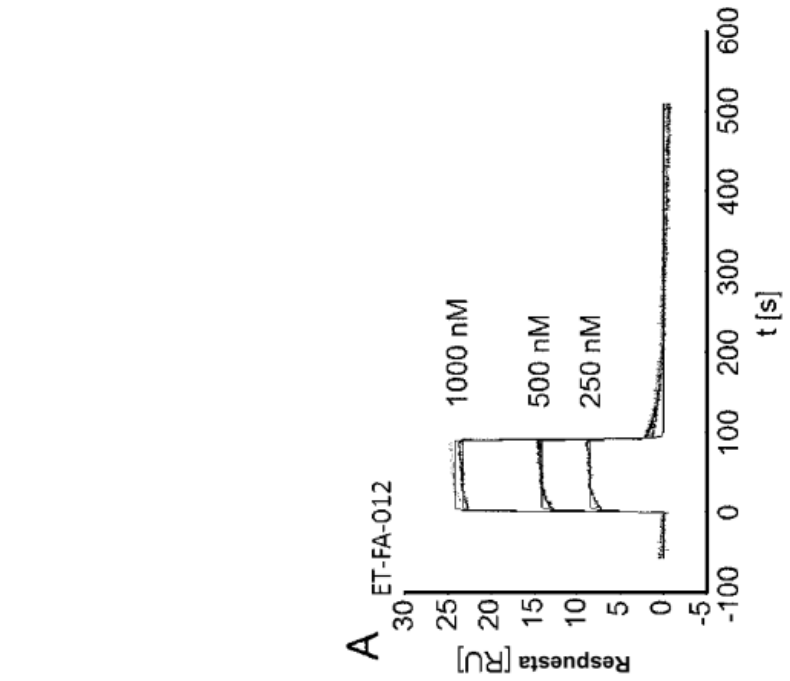

A
ET-FA-012
1000 nM
500 nM
250 nM
Respuesta [RU]
t [s]

Figura 14

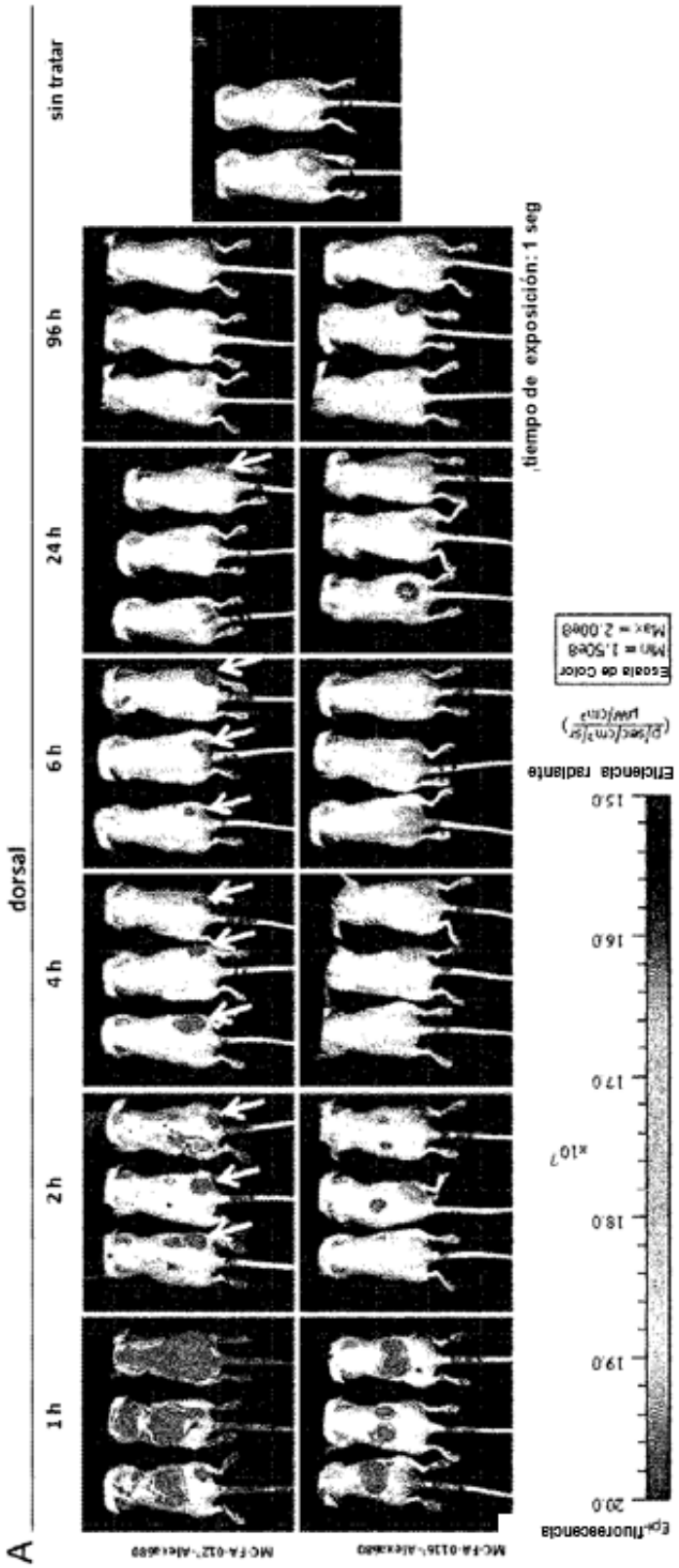

A
dorsal
1 h
2 h
4 h
6 h
24 h
96 h
sin tratar
MC-FA-0136-Alexa680
MC-FA-012-Alexa680
tiempo de exposición: 1 seg
Eficiencia radiante
Escala de color
Max = 2.00e8
Min = 1.50e8
Fluorescencia
x10^7
20.0
19.0
18.0
17.0
16.0
15.0

Figura 14

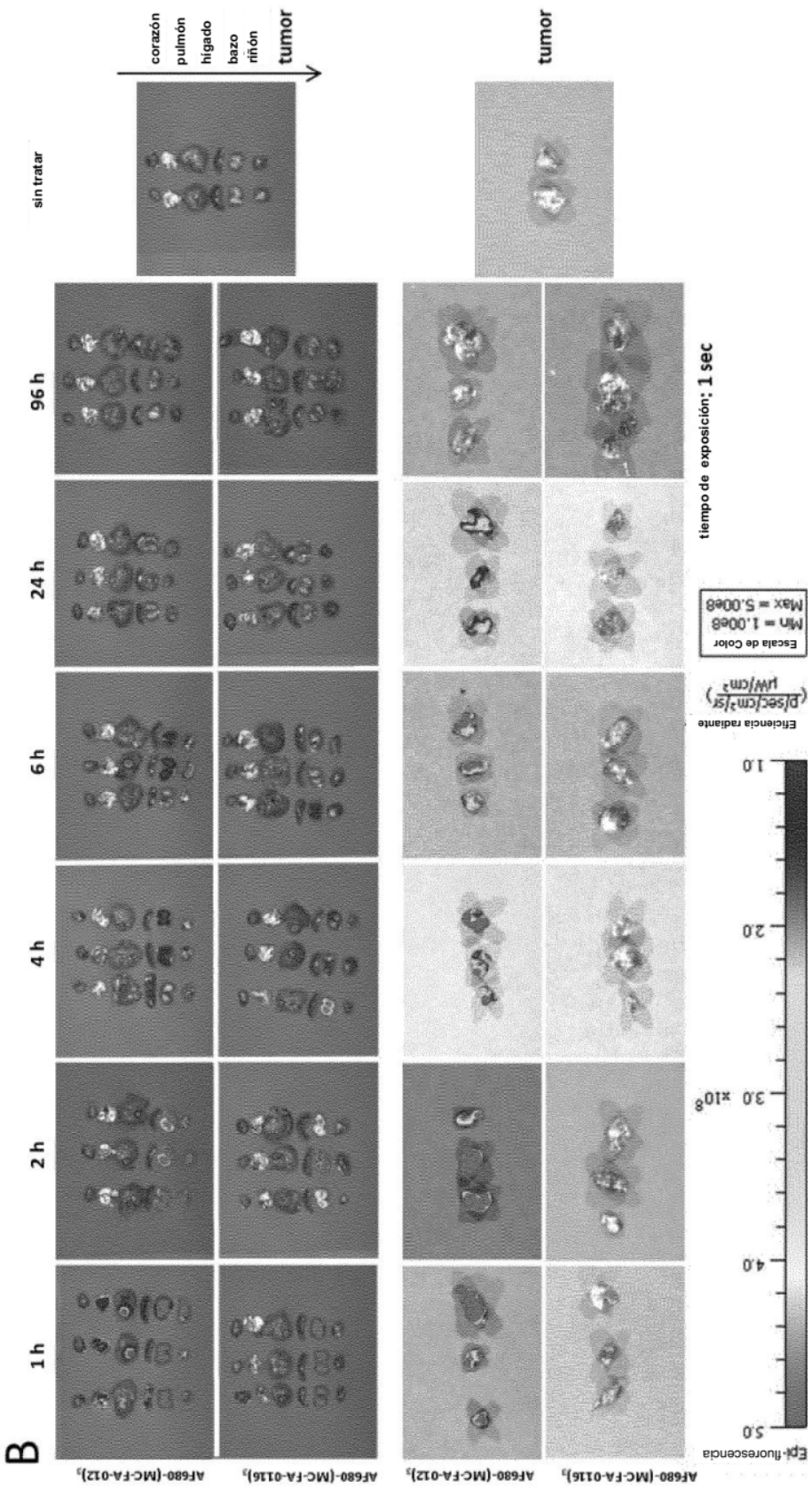

B
1 h
2 h
4 h
6 h
24 h
96 h
sin tratar
corazón
pulmón
hígado
bazo
riñón
tumor
tumor
AF680-(MC-FA-012)2
AF680-(MC-FA-0116)2
AF680-(MC-FA-012)2
AF680-(MC-FA-0116)2
Eficiencia radiante
(p/sec/cm²/sr / µW/cm²)
Escala de Color
Min = 1.00e8
Max = 5.00e8
tiempo de exposición: 1 sec
Epi-fluorescencia
5.0
4.0
3.0 x10⁸
2.0
1.0

Figura 15

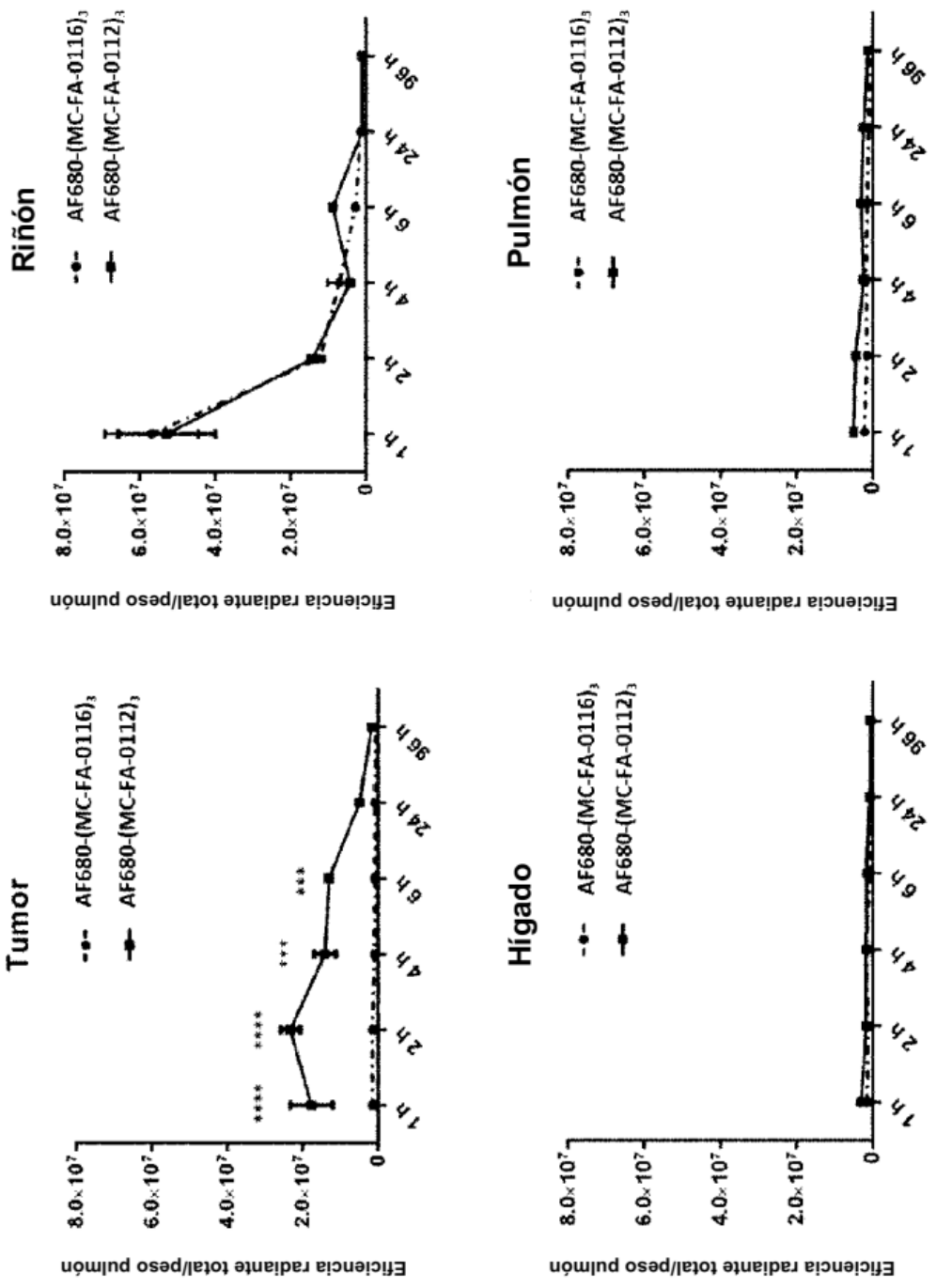

Riñón
Pulmón
Tumor
Hígado
AF680-(MC-FA-0116)3
AF680-(MC-FA-0112)3
Eficiencia radiante total/peso pulmón
8.0×10^7
6.0×10^7
4.0×10^7
2.0×10^7
0
1h
2h
4h
6h
24h
96h

Figura 16

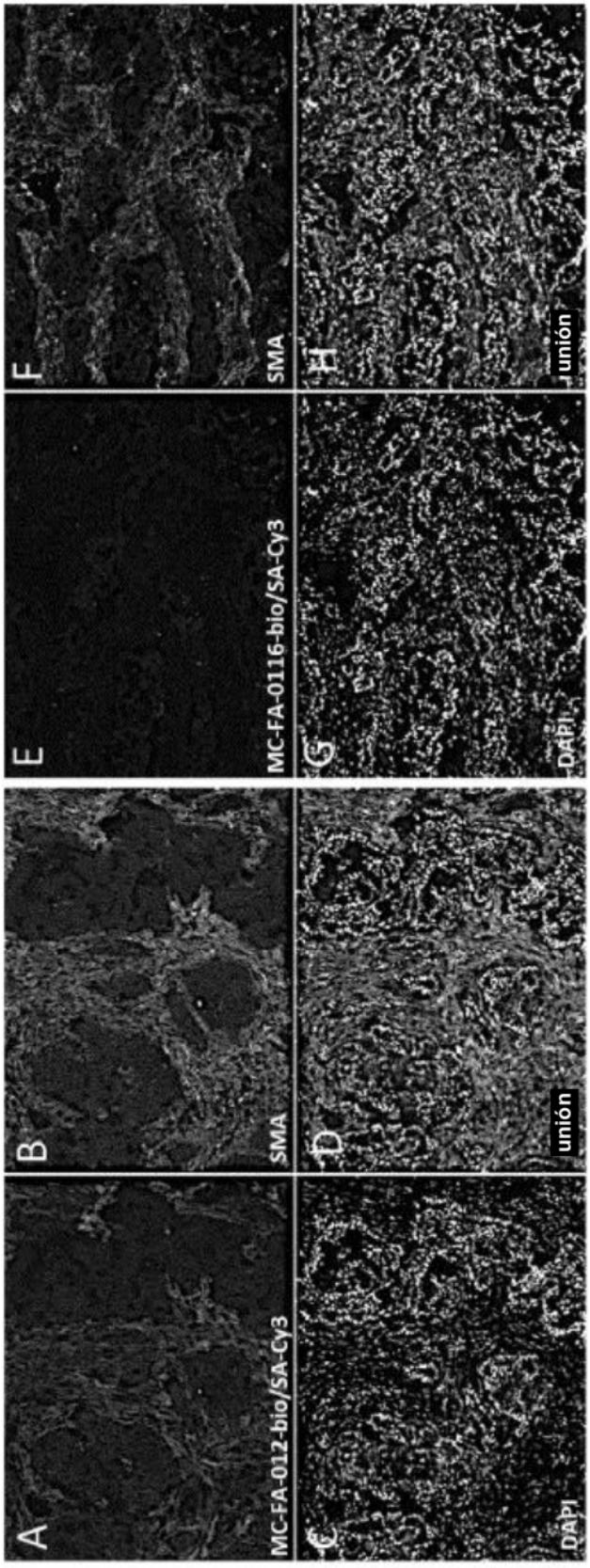
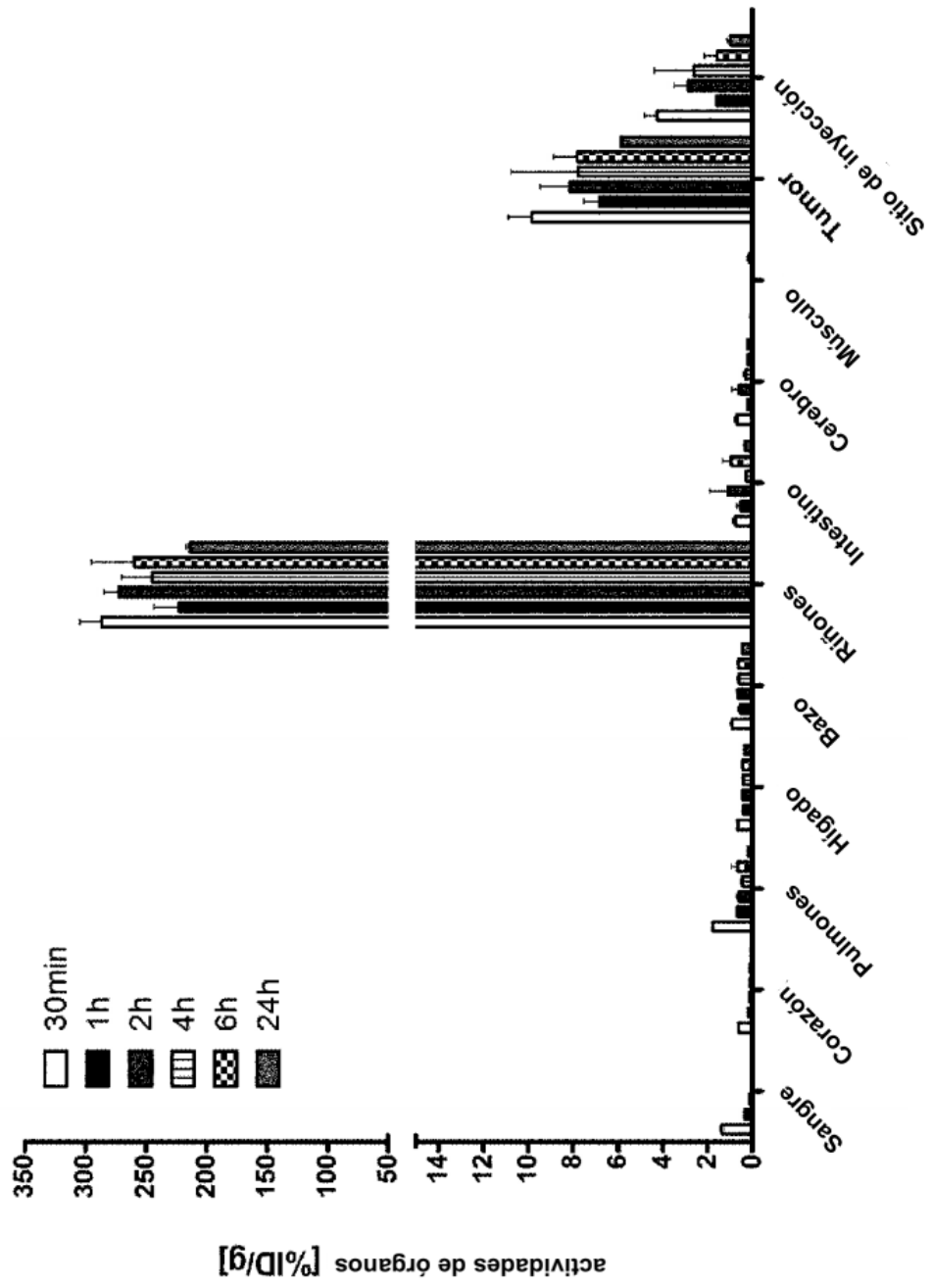

A
MC-FA-012-bio/SA-Cy3
B
SMA
C
DAPI
D
unión
E
MC-FA-0116-bio/SA-Cy3
F
SMA
G
DAPI
H
unión

Figura 17


actividades de órganos [%ID/g]
350
300
250
200
150
100
50
14
12
10
8
6
4
2
0
30min
1h
2h
4h
6h
24h
Sangre
Corazón
Pulmones
Hígado
Bazo
Riñones
Intestino
Cerebro
Músculo
Tumor
Sitio de inyección

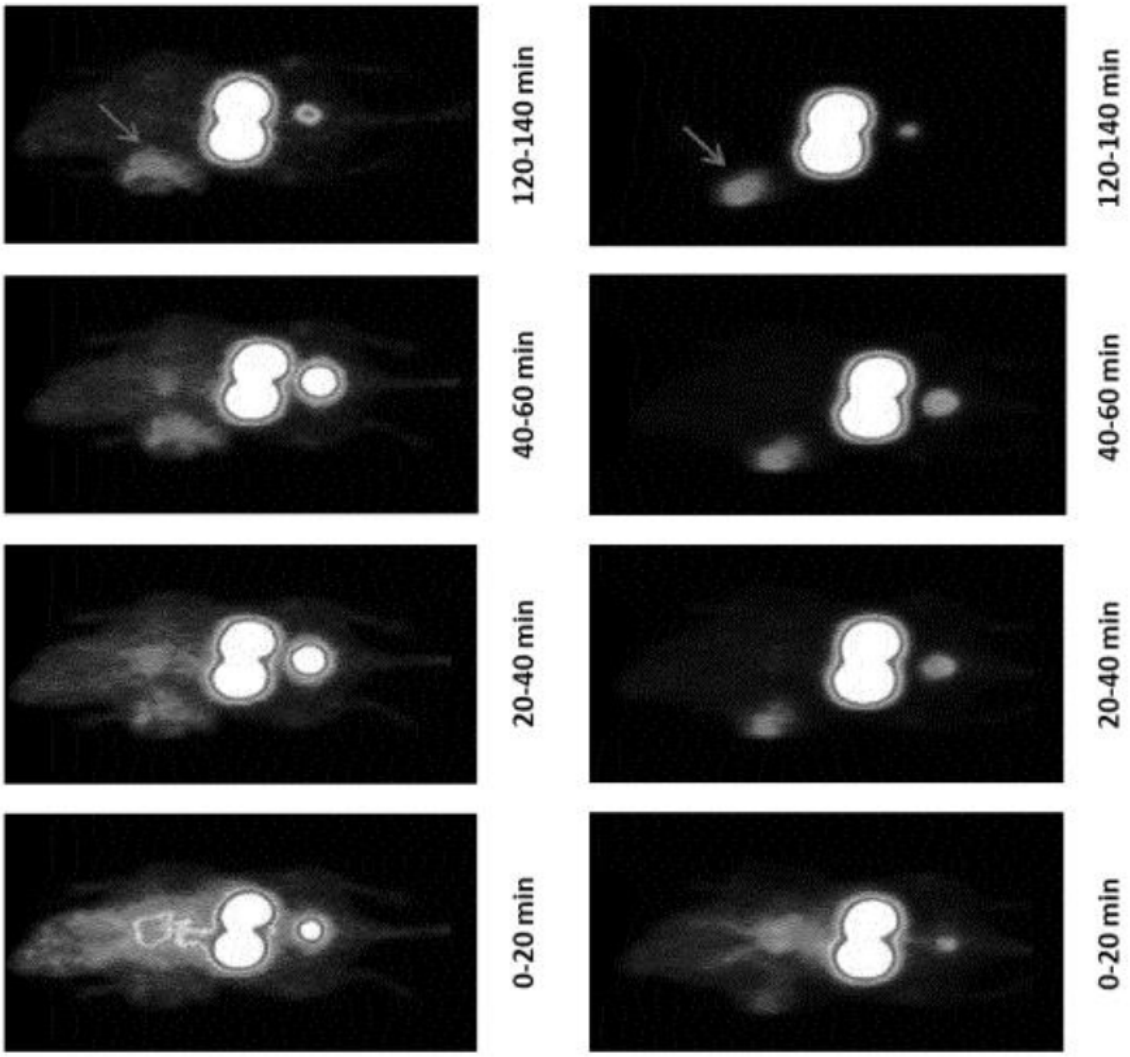

120-140 min
40-60 min
20-40 min
0-20 min
120-140 min
40-60 min
20-40 min
0-20 min

Figura 18

Figura 19

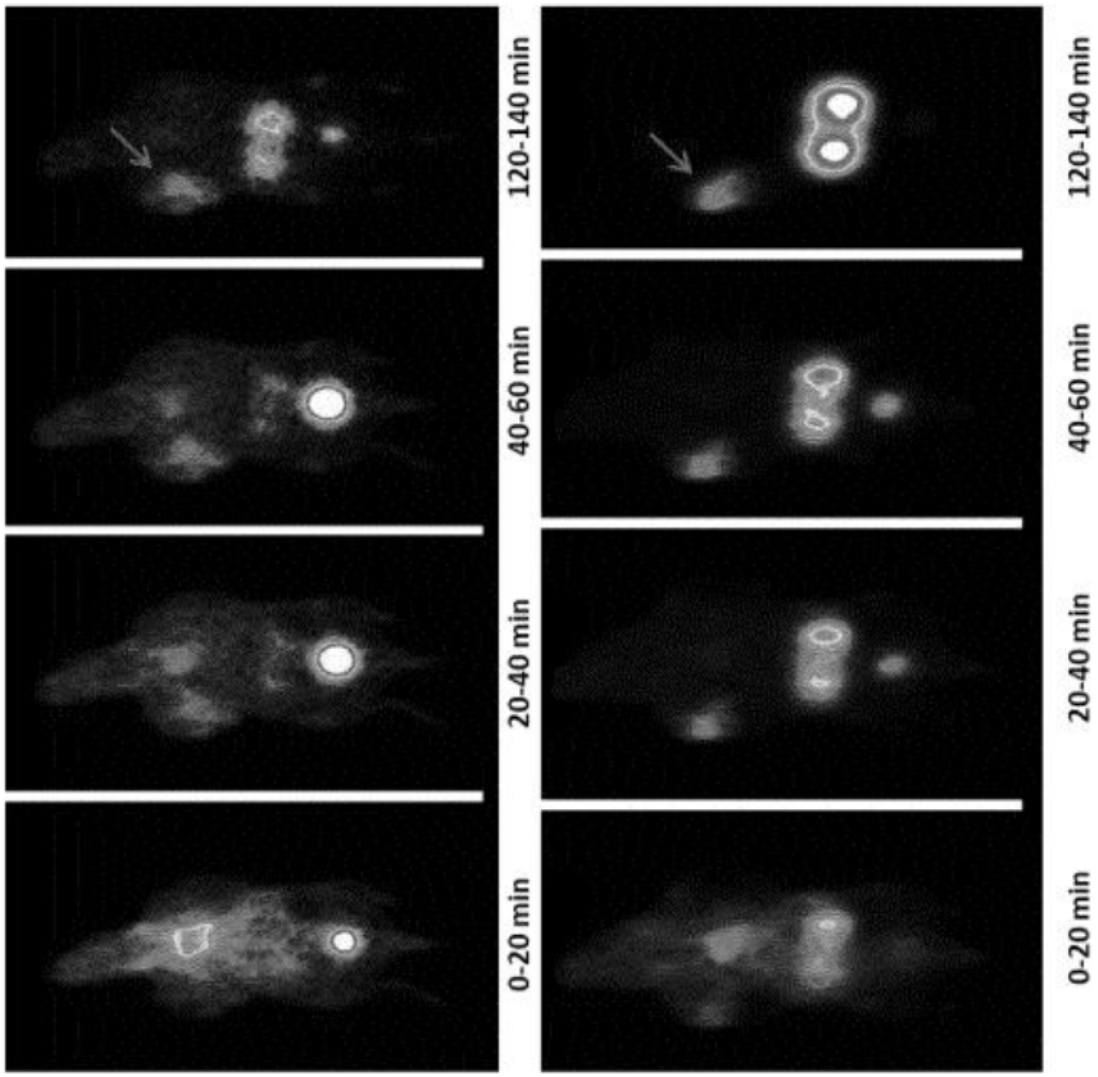
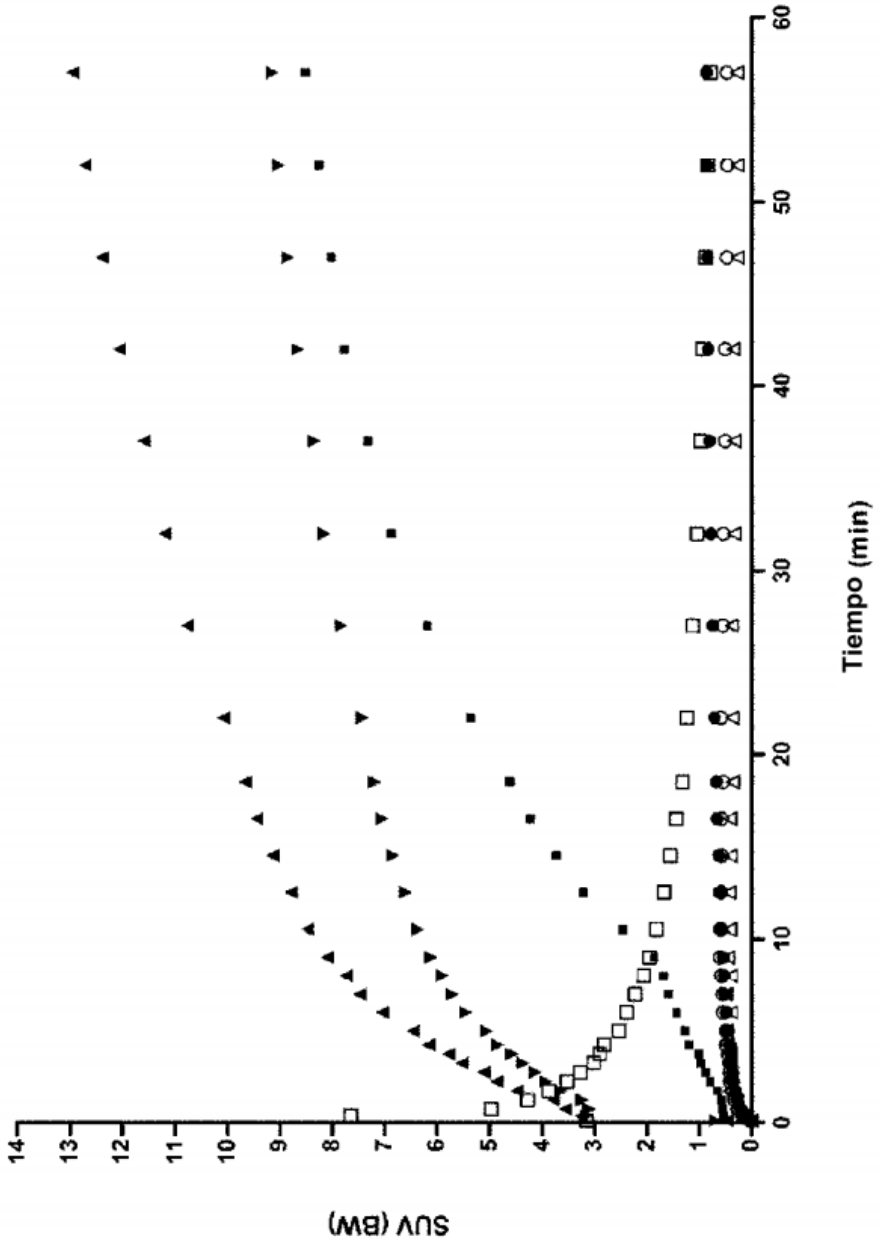

0-20 min
20-40 min
40-60 min
120-140 min
0-20 min
20-40 min
40-60 min
120-140 min

Figura 20



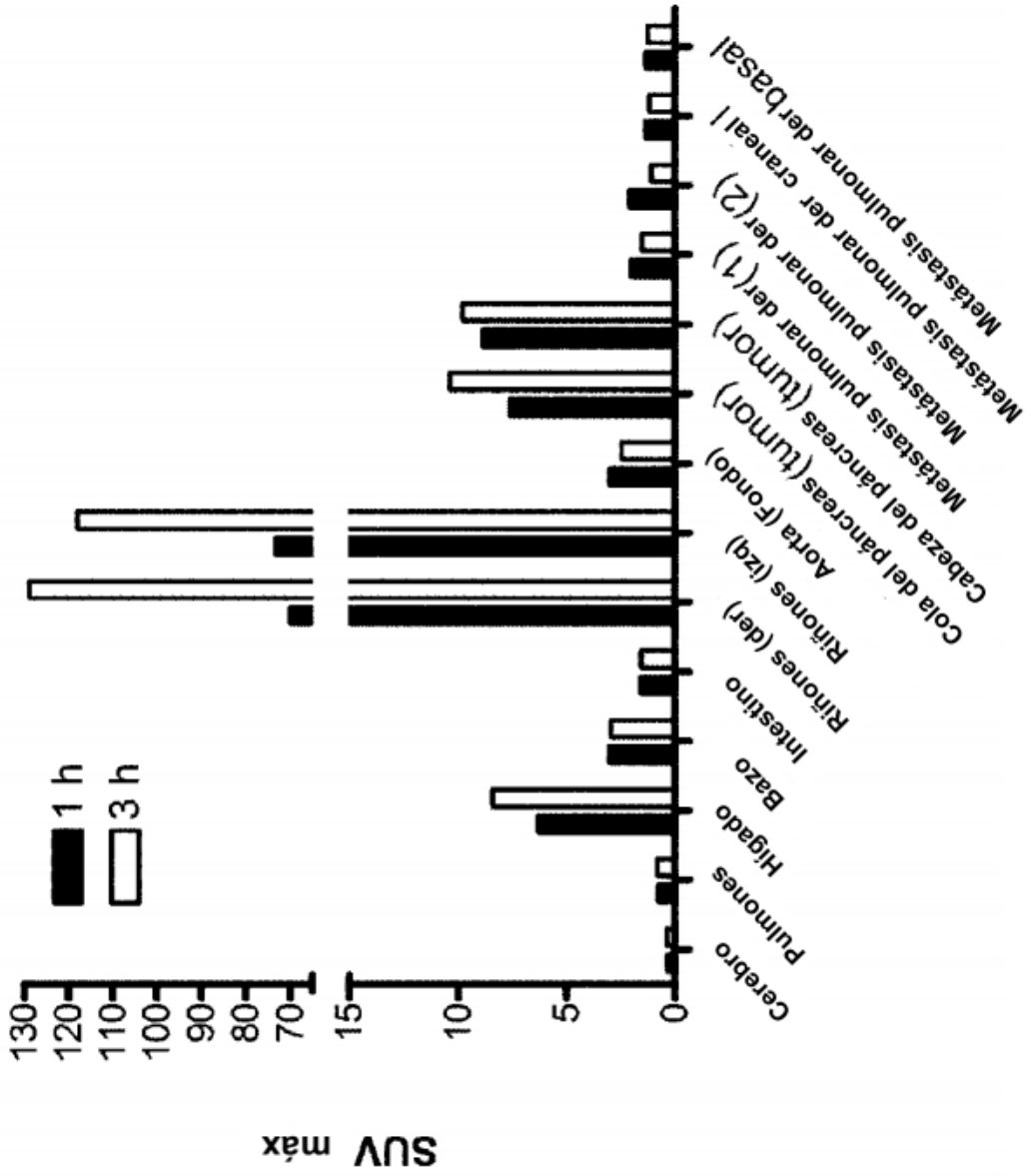

SUV máx
130
120
110
100
90
80
70
15
10
5
0
1 h
3 h
Cerebro
Pulmones
Hígado
Bazo
Intestino
Riñones (der)
Riñones (izq)
Aorta (Fondo)
Cola del páncreas (tumor)
Cabeza del páncreas (tumor)
Metástasis pulmonar der (1)
Metástasis pulmonar der (2)
Metástasis pulmonar der craneal /
Metástasis pulmonar der basal

Figura 21

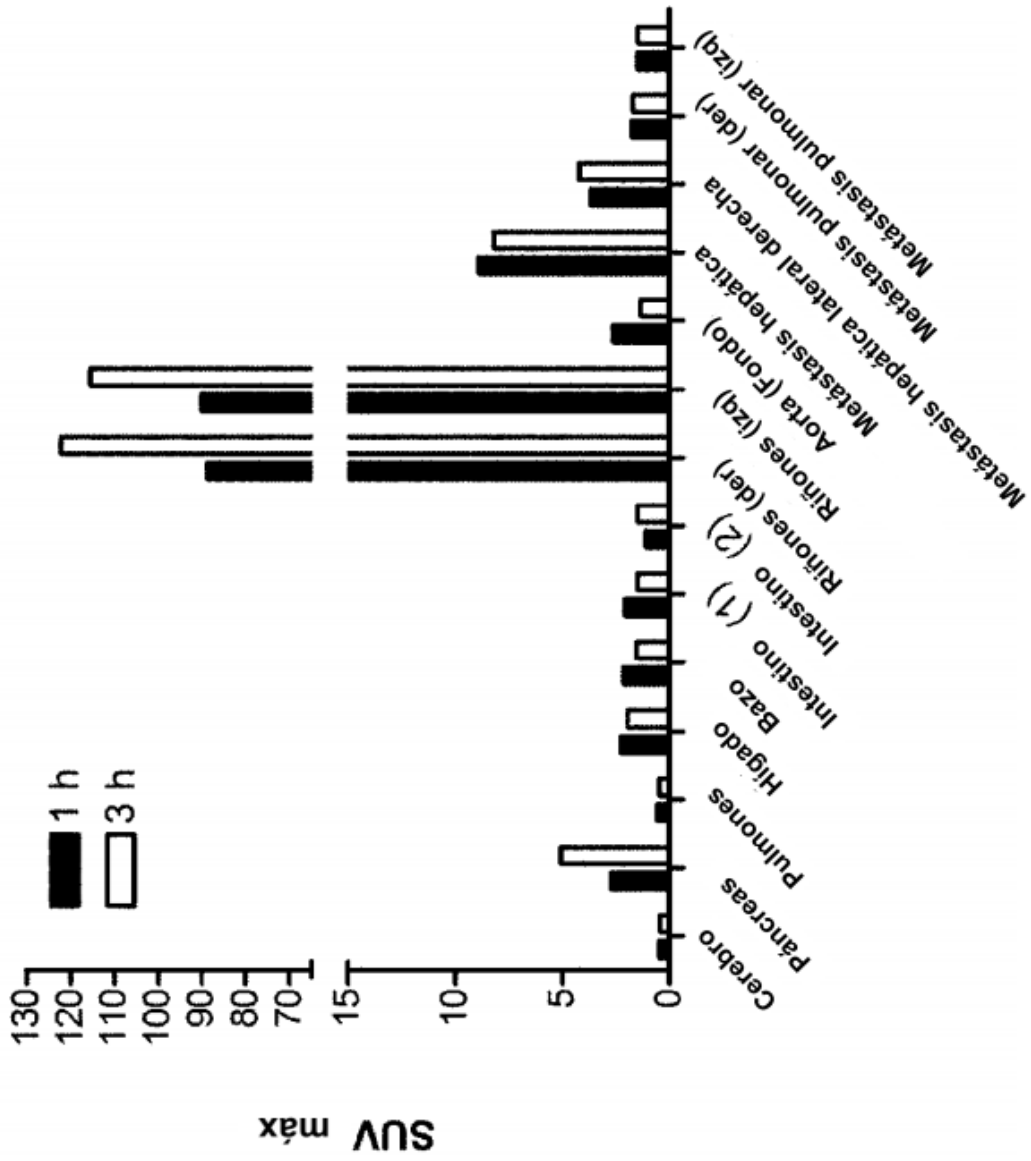
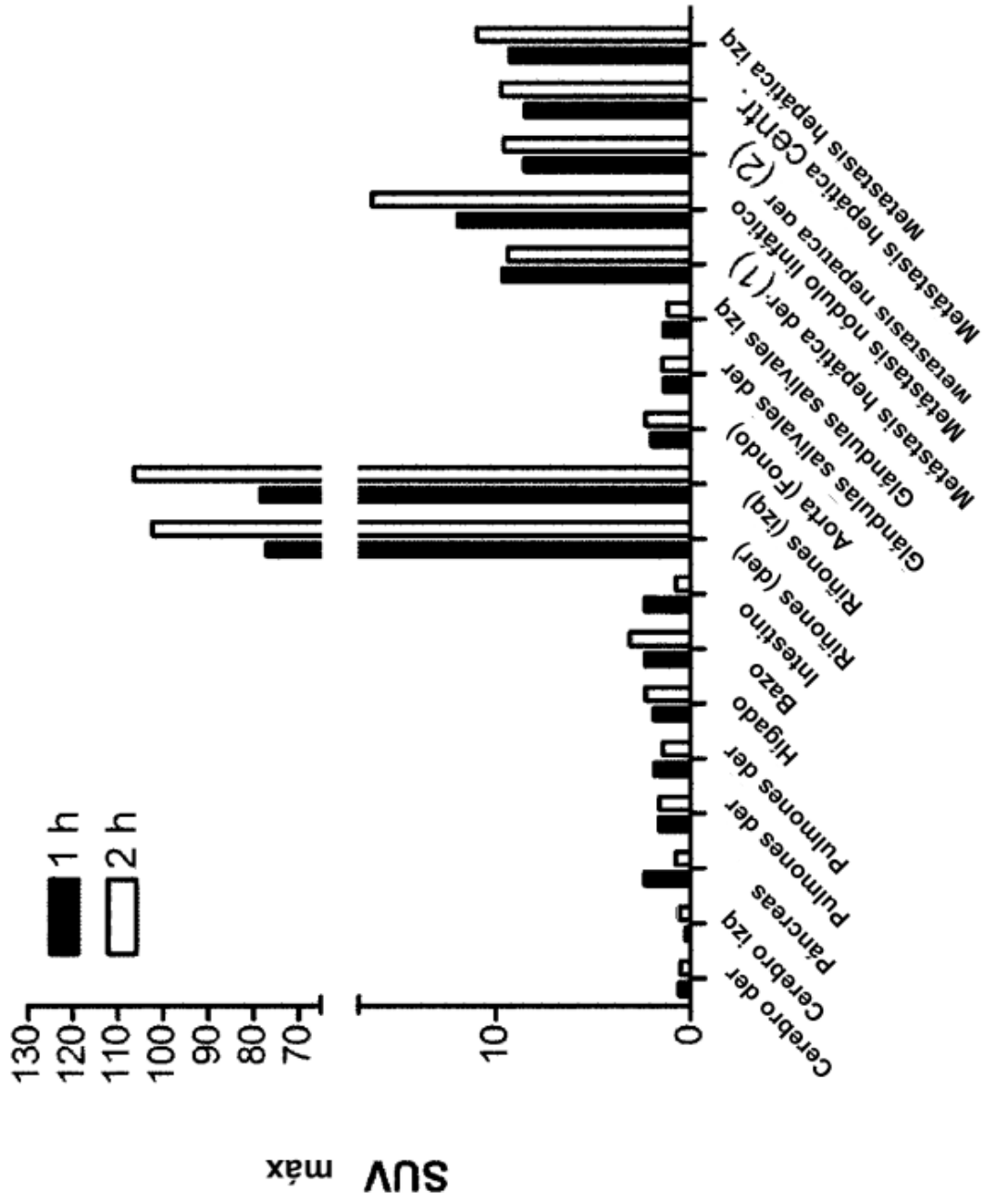

SUV máx
130
120
110
100
90
80
70
15
10
5
0
1 h
3 h
Cerebro
Páncreas
Pulmones
Hígado
Bazo
Intestino (1)
Intestino (2)
Riñones (der)
Riñones (izq)
Aorta (Fondo)
Metástasis hepática
Metástasis hepática lateral derecha
Metástasis pulmonar (der)
Metástasis pulmonar (izq)

Figura 22

Figura 23


SUV máx
130
120
110
100
90
80
70
10
0
1 h
2 h
Cerebro der
Cerebro izq
Páncreas
Pulmones der
Pulmones der
Hígado
Bazo
Intestino
Riñones (der)
Riñones (izq)
Aorta (Fondo)
Glándulas salivales der
Glándulas salivales izq
Metástasis hepática der.(1)
Metástasis nódulo linfático
Metastasis hepatica aer
Metastasis hepática CeNtr. (2)
Metastasis hepatica izq

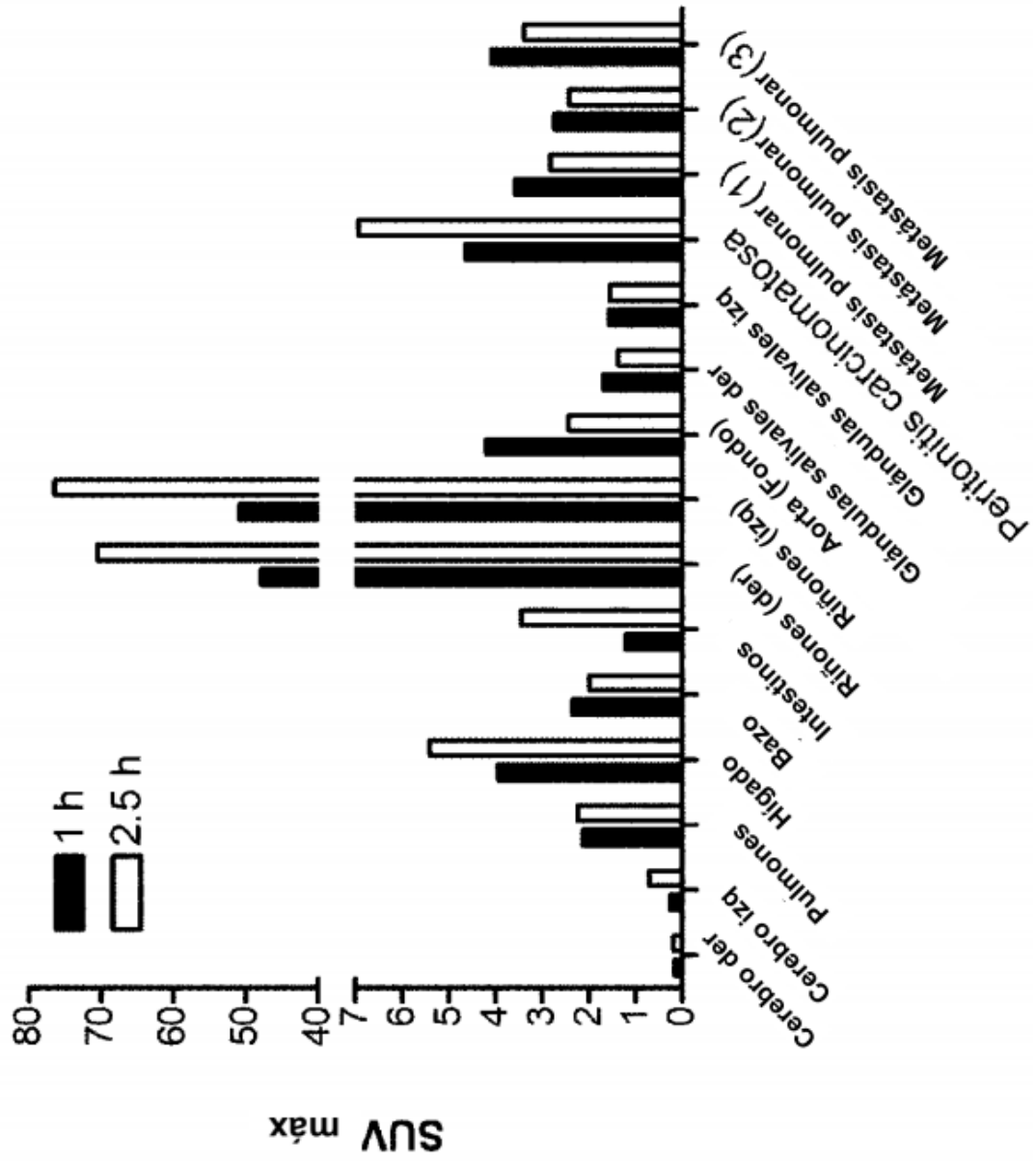

SUV máx
1 h
2.5 h
80
70
60
50
40
7
6
5
4
3
2
1
0
Cerebro der
Cerebro izq
Pulmones
Hígado
Bazo
Intestinos
Riñones (der)
Riñones (izq)
Aorta (Fondo)
Glándulas salivales der
Glándulas salivales izq
Peritonitis CarCinOmaTOSa
Metástasis pulmonar (1)
Metástasis pulmonar (2)
Metástasis pulmonar (3)

Figura 24

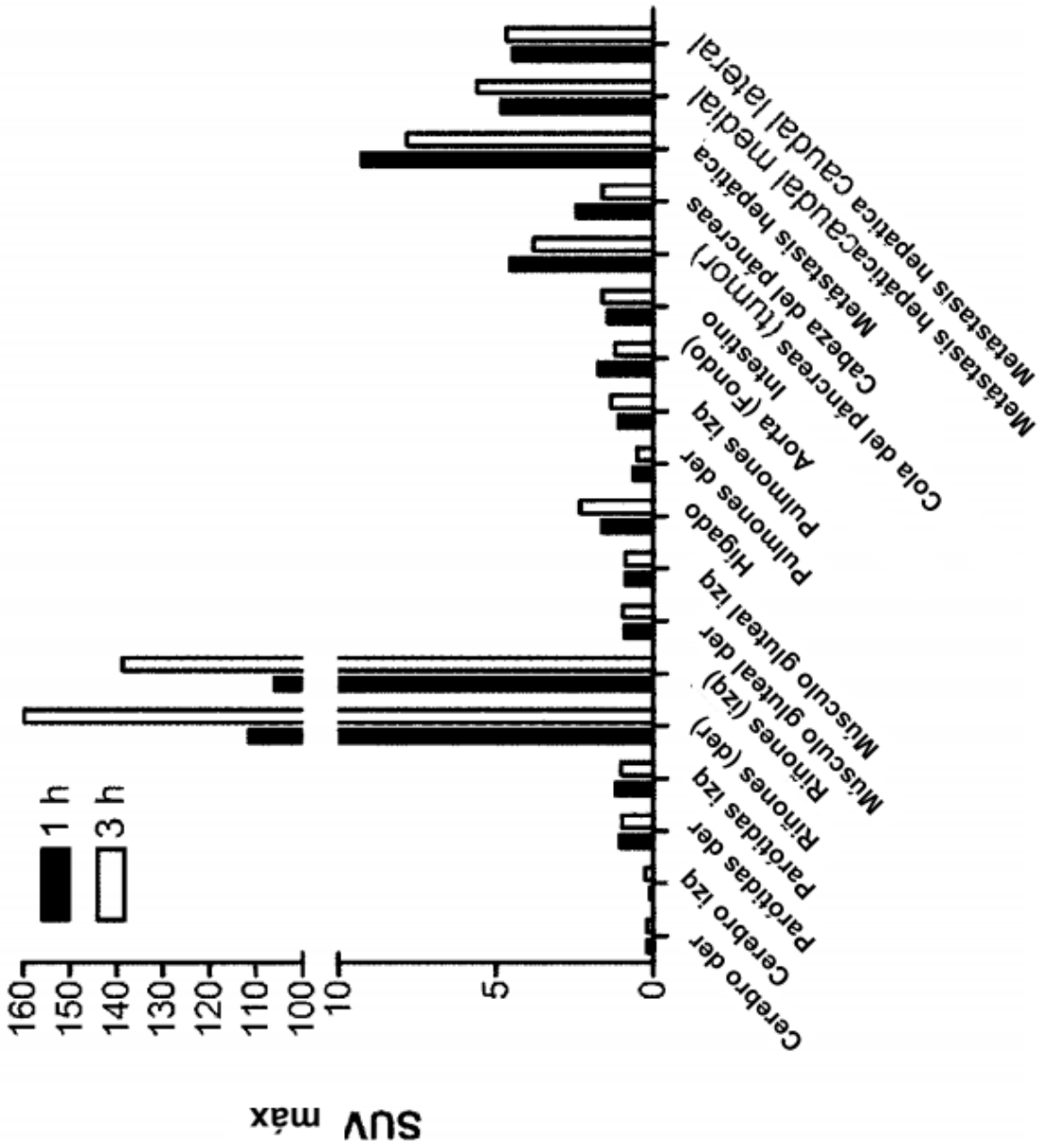

SUV máx
160
150
140
130
120
110
100
10
5
0
1 h
3 h
Cerebro der
Cerebro izq
Parótidas der
Parótidas izq
Riñones (der)
Riñones (izq)
Músculo glúteal der
Músculo glúteal (izq)
Hígado
Pulmones der
Pulmones izq
Aorta (Fondo)
Intestino
Cola del páncreas (tumor)
Cabeza del páncreas
Metástasis hepática
Metástasis hepáticaCaudal media
Metástasis hepática Caudal lateral

Figura 25

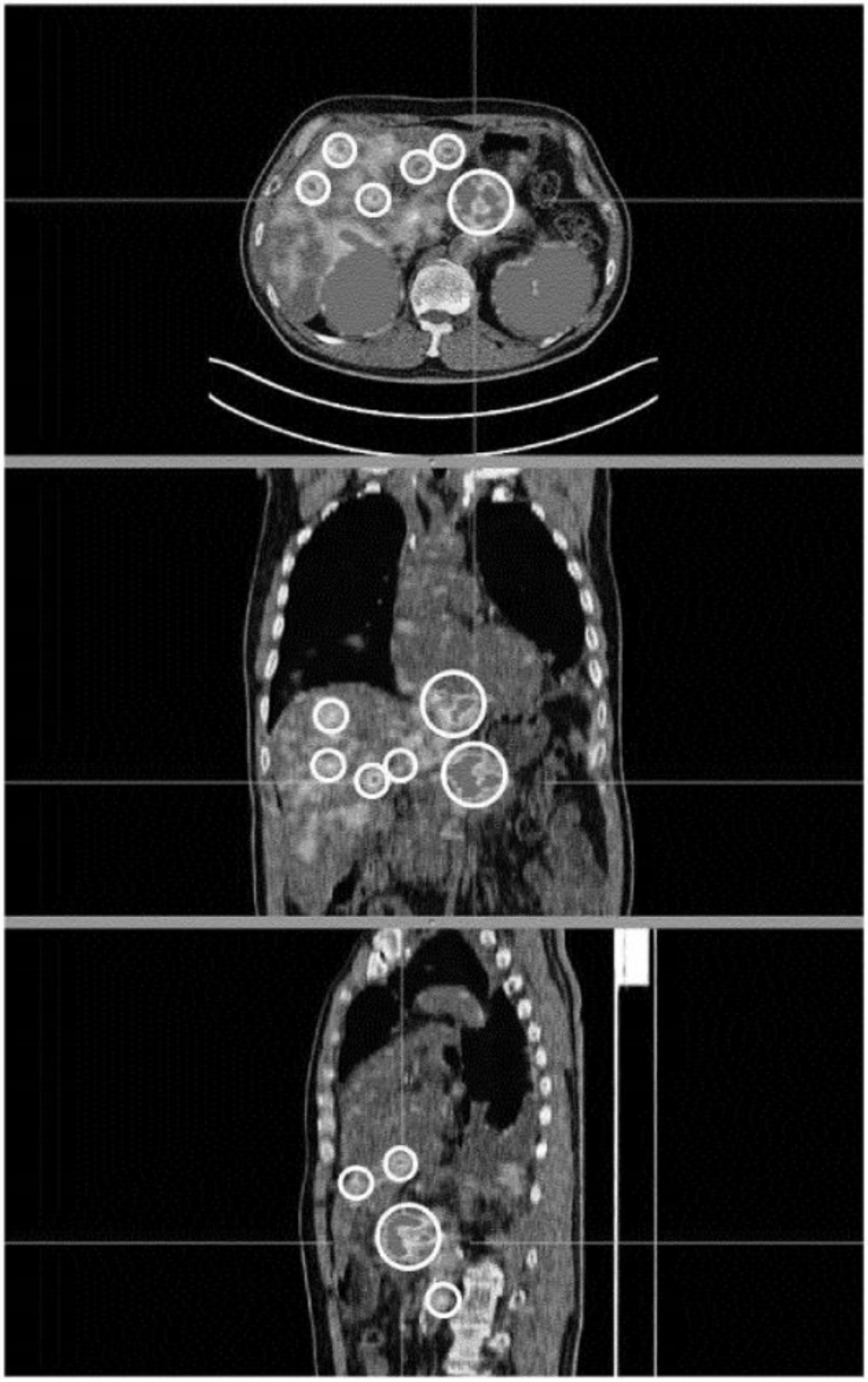


Figura 26

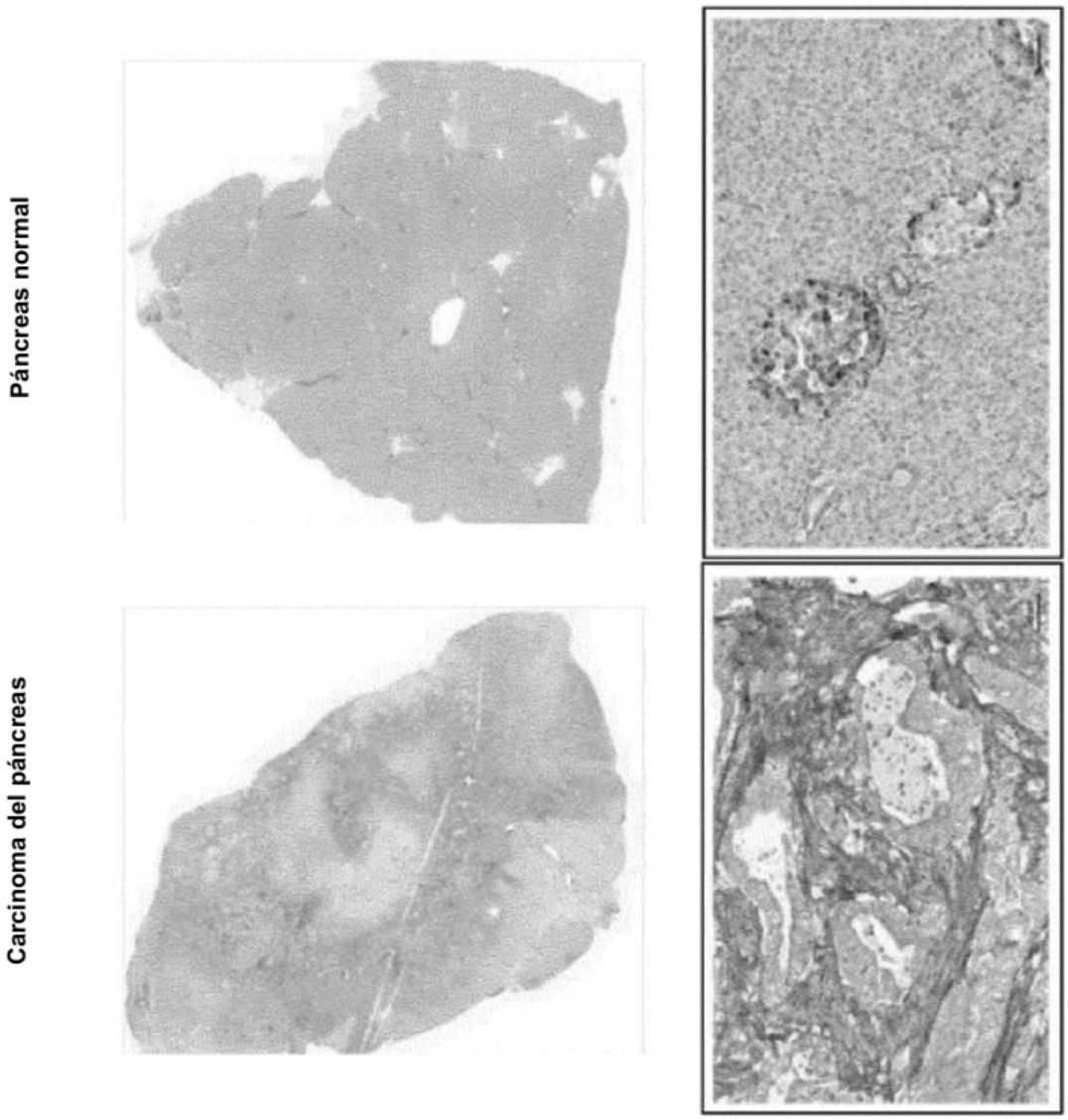


Figura 27

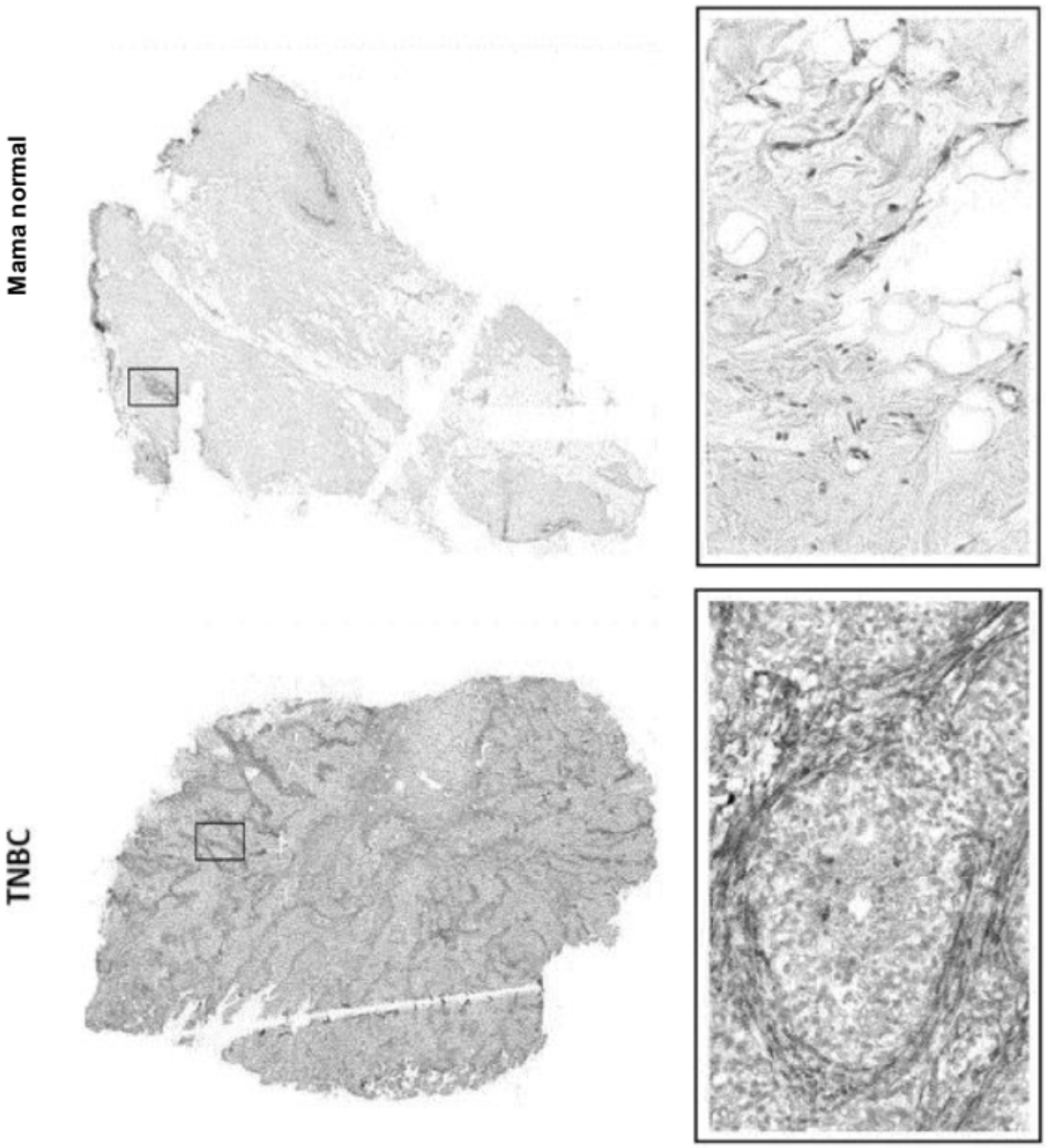


Figura 28

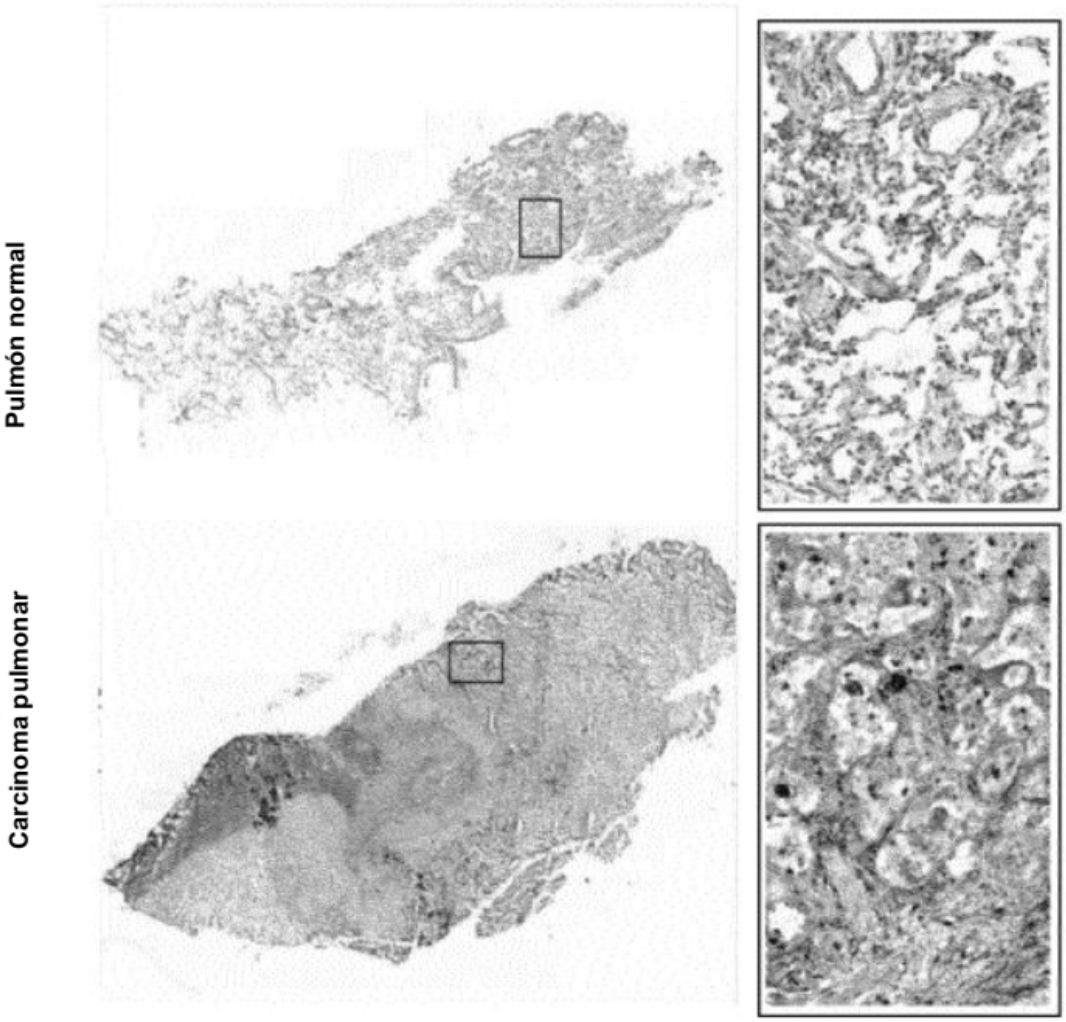


Figura 29