

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 672 974**

51 Int. Cl.:

A61K 39/00	(2006.01)
A61P 25/00	(2006.01)
A61P 31/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01)
A61P 37/00	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **24.05.2013 PCT/US2013/042594**

87 Fecha y número de publicación internacional: **05.12.2013 WO13181087**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **24.05.2013 E 13797550 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.03.2018 EP 2854845**

54 Título: **Complejos multiméricos con estabilidad in vivo, farmacocinética y eficacia mejoradas**

30 Prioridad:

01.06.2012 US 201261654310 P
 20.06.2012 US 201261662086 P
 19.07.2012 US 201261673553 P
 13.08.2012 US 201261682531 P
 24.08.2012 US 201261693042 P
 28.08.2012 US 201261694072 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
19.06.2018

73 Titular/es:

IBC PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
300 American Road
Morris Plains, NJ 07950, US

72 Inventor/es:

ROSSI, EDMUND A.;
CHANG, CHIEN-HSING y
GOLDENBERG, DAVID M.

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 672 974 T3

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

DESCRIPCIÓN

Complejos multiméricos con estabilidad in vivo, farmacocinética y eficacia mejoradas

Campo

- 5 La presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un anticuerpo y un motivo de dominio de anclaje (AD); un complejo multimérico que comprende una primera proteína de fusión y una segunda proteína de fusión, en donde la primera proteína de fusión comprende un primer anticuerpo y un motivo de dominio de anclaje (AD) y la segunda proteína de fusión comprende un motivo efector y motivo de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD); dicho complejo multimérico para usar en el tratamiento de una enfermedad; y a una composición que comprende dicha proteína de fusión o dicho complejo multimérico.
- 10 Dos copias del motivo de DDD dimerizan y se unen a un motivo de AD para formar el complejo multimérico, que puede ser trimérico, tetramérico, pentamérico, hexamérico o multimérico. El experto en la técnica comprenderá que los motivos de AD y/o DDD pueden estar unidos a un efector por entrecruzamiento químico u otros medios conocidos. Los efectores se pueden seleccionar de anticuerpos, fragmentos de anticuerpo de unión a antígeno, antígenos, citoquinas, quimioquinas, interleuquinas, interferones, factores de crecimiento, agentes proapoptóticos,
- 15 agentes antiangiogénicos, toxinas, proteínas de unión a ligando, enzimas, agentes terapéuticos o polímeros, tales como polietilenglicol (PEG). Preferiblemente, al menos un efector es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno, con un motivo de AD unido al extremo C terminal de cada cadena ligera del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. Más preferiblemente, al menos un efector es un anticuerpo IgG. En algunas realizaciones, todos los efectores pueden ser anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, que proporcionan complejos de unión a antígeno biespecíficos o multiespecíficos. Los presentes complejos multiméricos se usan para tratar una amplia variedad de enfermedades y afecciones médicas, tales como cáncer, enfermedad autoinmunitaria, disfunción del sistema inmunitario, enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órgano, enfermedad neurológica, enfermedad metabólica, enfermedad infecciosa o enfermedad cardiovascular.
- 20

Antecedentes

- 25 Un aspecto importante de la reciente investigación biomédica es el desarrollo de compuestos biológicos basados en anticuerpos cada vez más sofisticados, tales como anticuerpos biespecíficos, inmunocitoquinas, conjugados de anticuerpo-toxina y conjugados de anticuerpo-fármaco. El desarrollo de proteínas de fusión más complejas y menos naturales se enfrenta a problemas de rendimiento, estabilidad, inmunogenicidad y farmacocinética (Pk). En particular, los inmunoconjugados basados en fragmentos de anticuerpos que incluyen Fv monocatenario (scFv), Fab y otros formatos que carecen de Fc (Kontermann, 2010, *Curr Opin Mol Ther* 12:176-83), a menudo son difíciles de producir con homogeneidad y suficiente rendimiento, carecen de funciones efectoras de Fc, y sufren inherentemente de semividas ($T_{1/2}$) cortas en el suero circulante. En comparación, los inmunoconjugados de IgG se pueden producir con altos rendimientos, con $T_{1/2}$ más largas y estabilidad in vivo. Además, los anticuerpos monoclonales (mAb) intactos ofrecen una unión bivalente de alta avidéz con funciones efectoras de Fc, que incluyen la citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) y la citotoxicidad dependiente del complemento (CDC). La Pk potenciada de la IgG se atribuye a dos factores principales. Su mayor tamaño molecular (~150 kDa) previene la eliminación renal, que es responsable de la rápida eliminación de construcciones más pequeñas (<60 kDa), tales como scFv, y su unión dinámica al receptor Fc neonatal (FcRn) (Kue y Aveson, 2011, *MAbs* 3:422-30) prolonga la $T_{1/2}$.
- 30
- 40 Los anticuerpos multiespecíficos o biespecíficos son útiles en una serie de aplicaciones biomédicas. Por ejemplo, un anticuerpo biespecífico con sitios de unión para un antígeno de superficie de célula tumoral y para un receptor de superficie de célula T puede dirigir la lisis de células tumorales específicas por linfocitos T. Los anticuerpos biespecíficos que reconocen gliomas y el epítipo CD3 en los linfocitos T se han usado con éxito en el tratamiento de tumores cerebrales en pacientes humanos (Nitta, et al. *Lancet*. 1990; 355:368-371). Se conocen numerosos métodos para producir anticuerpos biespecíficos (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 7.405.320). Los anticuerpos biespecíficos se pueden producir por el método del cuadro que implica la fusión de dos hibridomas diferentes, que produce cada uno un anticuerpo monoclonal que reconoce un sitio de antígeno diferente (Milstein y Cuello. *Nature*. 1983; 305:537-540). Los hibridomas fusionados son capaces de sintetizar dos cadenas pesadas diferentes y dos cadenas ligeras diferentes, que pueden asociarse de forma aleatoria para dar una población heterogénea de 10 estructuras de anticuerpo diferentes de las cuales solo una de ellas, que es 1/8 de las moléculas de anticuerpo totales, será biespecífica, y por lo tanto se debe purificar además de las otras formas. Los hibridomas fusionados a menudo son menos estables citogenéticamente que los hibridomas originales, haciendo más problemática la generación de una línea celular de producción.
- 45
- 50 Otro método para producir anticuerpos biespecíficos usa agentes de entrecruzamiento heterobifuncionales para unir químicamente dos anticuerpos monoclonales diferentes, de modo que el conjugado híbrido resultante se unirá a dos dianas diferentes (Staerz, et al. *Nature*. 1985; 314:628-631; Perez, et al. *Nature*. 1985; 316:354-356). Los anticuerpos biespecíficos generados por este procedimiento son esencialmente heteroconjugados de dos moléculas de IgG, que se difunden lentamente en los tejidos y son eliminados rápidamente de la circulación. Los anticuerpos biespecíficos también pueden producirse por reducción de cada uno de los dos anticuerpos monoclonales originales
- 55

a las respectivas medias moléculas, que después se mezclan y se dejan reoxidar para obtener la estructura híbrida (Staerz and Bevan. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1986; 83:1453-1457). Un procedimiento alternativo implica el entrecruzamiento química de dos o tres fragmentos Fab' purificados por separado usando conectores adecuados. Todos estos métodos químicos no son convenientes para el desarrollo comercial debido al alto coste de fabricación, procedimiento de producción laborioso, etapas de purificación extensas, bajos rendimientos (<20%), y productos heterogéneos.

Otros métodos incluyen la mejora de la eficacia de generación de hibridomas híbridos por transferencia en genes de distintos marcadores seleccionables por vectores lanzadera derivados de retrovirus en los respectivos hibridomas originales, que posteriormente se fusionan (DeMonte, et al. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1990, 87:2941-2945); o transfección de una línea celular de hibridoma con plásmidos de expresión que contienen genes de la cadena pesada y ligera de un anticuerpo diferente. Estos métodos también se enfrentan a problemas de purificación inevitables descritos antes.

Los dominios discretos V_H y V_L de anticuerpos producidos por tecnología de ADN recombinante se pueden emparejar entre sí para formar un dímero (fragmento Fv recombinante) con capacidad de unión (patente de EE.UU. n° 4.642.334). Sin embargo, dichas moléculas asociadas de forma no covalente no son suficientemente estables en condiciones fisiológicas para tener ningún uso práctico. Los dominios V_H y V_L cognados se pueden unir con un conector peptídico de composición y longitud adecuada (que consiste normalmente en más de 12 restos de aminoácidos) para formar un Fv monocatenario (scFv) con actividad de unión. Los métodos de fabricación de agentes basados en scFv de multivalencia y multiespecificidad variando la longitud del conector, se describen en la patente de EE.UU. n° 5.844.094, patente de EE.UU. n° 5.837.242 y WO 98/44001. Los problemas comunes que se han asociado con frecuencia con la generación de agentes basados en scFv de multivalencia y multiespecificidad son los niveles de expresión bajos, productos heterogéneos, inestabilidad en solución que conduce a agregados, inestabilidad en el suero, y afinidad deteriorada.

Se ha usado la tecnología de Dock-and-Lock™ (DNL™) para producir una variedad de inmunoconjugados en formatos variados (Rossi et al., 2012, *Bioconjug Chem* 23:309-23). Se construyeron anticuerpos hexavalentes biespecíficos (bsHexAbs) basados en veltuzumab (anti-CD20) y epratuzumab (anti-CD22) combinando un (Fab)₂ estabilizado fusionado con un dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) con una IgG que contiene un dominio de anclaje (AD) unido al extremo C de cada cadena pesada (C_H3-AD2-IgG) (Rossi et al., 2009, *Blood* 113, 6161-71). Comparado con mezclas de sus mAb originales, estos bsHexAbs basados en Fc denominados en lo sucesivo "Fc-bsHexAbs", inducían eventos de señalización únicos (Gupta et al., 2010, *Blood* 116:3258-67), y presentan una potente citotoxicidad in vitro. Sin embargo, los Fc-bsHexAbs se eliminaban de la circulación de ratones aproximadamente dos veces más rápido que los mAb originales (Rossi et al., 2009, *Blood* 113, 6161-71). Aunque los Fc-bsHexAbs son muy estables ex vivo, se puede producir algo de disociación in vivo, por ejemplo, por procesamiento intracelular. Además, los Fc-bsHexAbs carecen de actividad CDC.

Las inmunocitoquinas basadas en Fc también se han ensamblado como complejos de DNL™, que comprenden dos o cuatro moléculas de interferón-alfa 2b (IFNα2b) fusionadas con el extremo C terminal del C_H3-AD2-IgG Fc (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-71; Rossi et al. 2010, *Cancer Res* 70:7600-09; Rossi et al., 2011, *Blood* 118:1877-84). El Fc-IgG-IFNα mantenía una actividad específica alta, acercándose a la del IFNα recombinante, y era notablemente potente in vitro e in vivo frente a xenoinjertos de linfoma no Hodgkin (NHL). El T_{1/2} del Fc-IgG-IFNα en ratones era más largo que IFNα PEGilado, pero la mitad de largo que el mAb original. De forma similar al Fc-bsHexAbs, el Fc-IgG-IFNα se disociaba in vivo a lo largo del tiempo y presentaba menor CDC pero mayor ADCC.

Banky P et al. (Banky P et al., *Journal of Biological Chemistry*, vol. 273, no. 52, 25 de diciembre 1998, pág. 35048-35055) describen el dominio de dimerización/acoplamiento de la subunidad reguladora de tipo I de la proteína quinasa dependiente de cAMP.

El documento WO 2006/022225 A1 se refiere a métodos y composiciones para formar complejos de DNL vacunas antineoplásicas usando la tecnología de Dock-and-Lock.

El documento WO 2006/032909 A2 se refiere a moléculas de alteración del anclaje y moléculas relacionadas que modulan la función de la proteína quinasa de tipo II dependiente de cAMP y moléculas relacionadas que actúan como imitadores de AKAP y su uso para producir preparaciones farmacéuticas para tratar o prevenir enfermedades que están caracterizadas por actividad de PKA II elevada o reducida, tal como enfermedades cardiovasculares y trastornos metabólicos.

Los documentos WO 2006/107786 A2 y US 2007/140966 A1 se refieren a métodos y composiciones para unir establemente estructuras para composiciones definidas con múltiples funcionalidades y/o especificidades de unión.

El documento US 2009/0202487 A1 se refiere a métodos y composiciones de formación de complejos de citoquina-anticuerpo usando la tecnología de Dock-and-Lock

El documento US 2011/110854 A1 se refiere a composiciones y métodos de síntesis y uso de moléculas marcadas con ⁶⁸Ga, ¹⁸F o ¹⁹F en la generación de imágenes por PET o MRI.

Rossi E A et al. (Rossi E A et al., *Bioconjugate Chemistry*, vol. 23, no. 3, 21 de marzo 2012) se refiere al método de Dock-and-Lock que combina el diseño recombinante con la conjugación covalente específica de sitio para generar estructuras multifuncionales.

- 5 Existe la necesidad de métodos y composiciones para generar complejos multiméricos mejorados con mayor $T_{1/2}$, mejores propiedades farmacocinéticas, mayor estabilidad in vivo y mejor eficacia in vivo.

Compendio

El problema subyacente de la presente invención se resuelve mediante la materia objeto de las reivindicaciones independientes adjuntas; las realizaciones preferidas se pueden tomar de las reivindicaciones dependientes adjuntas.

- 10 Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un primer aspecto por una proteína de fusión que comprende:

a) un anticuerpo; y

b) un motivo de AD (dominio de anclaje) de una proteína AKAP unido al extremo C-terminal de cada cadena ligera del anticuerpo.

- 15 En una realización del primer aspecto, el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en AFP, integrina $\alpha 4$, B7, anhidrasa carbónica IX, factores del complemento C1q, C1r, C1s, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5a, C5aR, C5b, C5, C6, C7, C8, C9n, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD3R, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD86, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM-5, CEACAM-6, CSAp, ED-B de fibronectina, EGFR, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ErbB2, Factor H, FHL-1, fibrina, Flt-3, receptor de folato, glucoproteína IIb/IIIa, gp41, gp120, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, HM1.24, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), Ia, ICAM-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , IgE, IGF-1R, IL-1, IL-1Ra, IL-2, IL-4R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-13R, IL-15R, IL-15, IL-17, IL-17R, IL-18, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, factor de crecimiento similar a insulina-1 (ILGF-I), IP-10, Le(y), lipopolisacárido (LPS), MAGE, MCP-1, mCRP, MIF, MIP-1A, MIP-1B, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, NCA-90, NCA-95, NF-kB, P1GF, PSMA, RANTES, T101, TAC, TAG-72, tenascina, antígenos de Thomson-Friedenreich, trombina, factor tisular, antígeno Tn, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), antígenos de necrosis tumoral, VEGF, VEGFR y un producto oncogénico.

- 20 En una realización del primer aspecto, el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en hR1 (anti-IGF-1R), hPAM4 (anti-mucina), KC4 (anti-mucina), hA20 (anti-CD20), hA19 (anti-CD19), hIMMU31 (anti-AFP), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), hMu-9 (anti-CSAp), hL243 (anti-HLA-DR), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-15 (anti-CEACAM6), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-3 (anti-CEACAM6), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX), infliximab (anti-TNF- α), certolizumab pegol (anti-TNF- α), adalimumab (anti-TNF- α), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetán (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), GA101 (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina $\alpha 4$) y omalizumab (anti-IgE).

- 30 En una realización del primer aspecto, una copia del motivo de AD se une a un dímero formado por dos copias de un motivo de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD), en donde la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en los restos 1-44 de RII α , 1-44 de RII β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β .

- 35 En una realización del primer aspecto, la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 89.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un segundo aspecto por un complejo multimérico que comprende:

- 40 a) una primera proteína de fusión que comprende (i) un primer anticuerpo, y (ii) un motivo de AD (dominio de anclaje) de una proteína AKAP unido al extremo C terminal de cada cadena ligera del anticuerpo; y

- 45 b) una segunda proteína de fusión que comprende (iii) un motivo efector seleccionado del grupo que consiste en un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, una citoquina, un interferón, una toxina, un antígeno, un xenoantígeno, un hapteno, una protamina, una hormona, una enzima, una proteína de unión a ligando, un agente proapoptótico y un agente antiangiogénico, y (iv) un motivo de DDD (dominio de dimerización y

acoplamiento) de la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) RI α , RI β , RI α o RI β ;

en donde dos copias del motivo de DDD forman un dímero que se une a una copia del motivo de AD para formar el complejo.

5 En una realización del segundo aspecto, el primer y segundo anticuerpos se unen a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en AFP, integrina $\alpha 4$, B7, anhidrasa carbónica IX, factores de complemento C1q, C1r, C1s, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5a, C5aR, C5b, C5, C6, C7, C8, C9n, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD3R, CD4, CD5, CD8, CD11 A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD86, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM-5, CEACAM-6, CSAP, ED-B de fibronectina, EGFR, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ErbB2, Factor H, FHL-1, fibrina, Flt-3, receptor de folato, glucoproteína IIb/IIIa, gp41, gp120, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, HM1.24, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), Ia, ICAM-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , IgE, IGF-1R, IL-1, IL-1Ra, IL-2, IL-4R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-13R, IL-15R, IL-15, IL-17, IL-17R, IL-18, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, factor de crecimiento similar a insulina-1 (ILGF-I), IP-10, Le(y), lipopolisacárido (LPS), MAGE, MCP-1, mCRP, MIF, MIP-1A, MIP-1B, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, NCA-90, NCA-95, NF- κ B, P1GF, PSMA, RANTES, T101, TAC, TAG-72, tenascina, antígenos de Thomson-Friedenreich, trombina, factor tisular, antígeno Tn, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), antígenos de necrosis tumoral, VEGF, VEGFR y un producto oncogénico.

20 En una realización del segundo aspecto, el primer y segundo anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en hR1 (anti-IGF-1R), hPAM4 (anti-mucina), KC4 (anti-mucina), hA20 (anti-CD20), hA19 (anti-CD19), hIMMU31 (anti-AFP), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), hMu-9 (anti-CSAp), hL243 (anti-HLA-DR), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-15 (anti-CEACAM6), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-3 (anti-CEACAM6), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX), infliximab (anti-TNF- α), certolizumab pegol (anti-TNF- α), adalimumab (anti-TNF- α), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetán (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), GA101 (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina $\alpha 4$) y omalizumab (anti-IgE).

En una realización del segundo aspecto, el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un F(ab')₂, un F(ab)₂, un Fab', un Fab, un Fv, un sFv, un scFv y un dAb.

30 En una realización del segundo aspecto, la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en los restos 1-44 de RI α , 1-44 de RI β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β .

35 En una realización del segundo aspecto, la secuencia de aminoácidos del motivo de AD se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 88.

45 En una realización del segundo aspecto, la toxina se selecciona del grupo que consiste en una toxina bacteriana, una toxina vegetal, ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de pseudomonas, endotoxina de pseudomonas, ranpirnasa (Rap) y Rap (N69Q).

50 En una realización del segundo aspecto, la citoquina se selecciona del grupo que consiste en hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovina, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona foliculo-estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , sustancia inhibidora de mullerian, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento vascular endotelial, integrina, trombopoyetina (TPO), un factor de crecimiento nervioso (NGF), NGF- β , factor de crecimiento de plaquetas, un factor de crecimiento transformante (TGF), TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento similar a insulina-I, factor de crecimiento similar a insulina-II, eritropoyetina (EPO), un factor osteoinductor, un interferón, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interferón- λ , factores estimuladores de colonias (CSF), CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquina-1 (IL-1), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, ligando kit, FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT (linfotóxina).

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un tercer aspecto por el complejo de acuerdo con el segundo aspecto, que incluye cualquiera de sus realizaciones, para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una disfunción del sistema inmunitario, una enfermedad infecciosa, una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular y una enfermedad neurológica.

En una realización del tercer aspecto, el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos B, leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, leucemia de linfocitos T, leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, glioma, macroglobulinemia de Waldenstrom, carcinoma, melanoma, sarcoma, glioma, cáncer de piel, cáncer de cavidad oral, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer del tracto pulmonar, cáncer de pulmón, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de huesos, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón y cáncer de testículo.

En una realización del tercer aspecto, la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide bulloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nudoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis y alveolitis fibrosante.

Más específicamente, el problema subyacente de la presente invención se resuelve en un cuarto aspecto por una composición que comprende una proteína de fusión de acuerdo con el primer aspecto, que incluye cualquiera de sus realizaciones, o un complejo multimérico de acuerdo con el segundo aspecto, que incluye cualquiera de sus realizaciones.

La presente invención también se refiere a complejos de DNLTM mejorados con T_{1/2} más prolongado, mejores propiedades cinéticas y mejor estabilidad in vivo. En realizaciones preferidas, los complejos de DNLTM mejorados comprenden componentes de IgG en los que los motivos de AD están fusionados al extremo C terminal de las cadenas ligeras del anticuerpo. Sorprendentemente, la relocalización del sitio de unión del AD desde la cadena pesada a la cadena ligera, da como resultado farmacocinética sustancialmente mejorada, estabilidad in vivo y función efectora de Fc, junto con mayor eficacia in vivo, comparado con los ya potentes homólogos basados en Fc.

En diferentes realizaciones, los presentes complejos se pueden administrar a un sujeto con una afección, con fines terapéuticos y/o de diagnóstico. El experto en la técnica comprenderá que cualquier afección que pueda ser diagnosticada y/o tratada con un complejo multiespecífico o biespecífico, multifuncional, bivalente, trivalente, se puede tratar con las presentes composiciones. Las afecciones de ejemplo incluyen, pero no se limitan a cáncer, hiperplasia, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad de Alzheimer, enfermedad cardiovascular, enfermedad metabólica, vasculitis, infección vírica, infección fúngica, infección bacteriana, retinopatía diabética, degeneración macular, enfermedad autoinmunitaria, edema, hipertensión pulmonar, septicemia, angiogénesis miocárdica, neovascularización de la placa, reestenosis, formación de neointima después de traumatismo vascular, telangiectasia, articulaciones hemofílicas, angiofibroma, fibrosis asociada a inflamación crónica, fibrosis pulmonar, trombosis venosa profunda o granulación de la herida.

En realizaciones particulares, el complejo multimérico y la composición que lo comprende se pueden usar para tratar una enfermedad autoinmunitaria, tal como púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide bulloso, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nudoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangiitis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis y alveolitis fibrosante.

En algunas realizaciones, los complejos y composiciones se pueden usar para el tratamiento terapéutico del cáncer. Se prevé que puede ser objetivo cualquier tipo de tumor y cualquier tipo de antígeno tumoral. Los ejemplos de tipos de cánceres que pueden ser objetivo incluyen leucemia linfoblástica aguda, leucemia mielógena aguda, cáncer biliar, cáncer de mama, cáncer de cuello uterino, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer colorrectal, cáncer endometrial, cáncer esofágico, gástrico, de cabeza y cuello, linfoma de Hodgkin, cáncer de pulmón, cáncer de tiroides medular, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de

páncreas, glioma, melanoma, cáncer de hígado, cáncer de próstata y cáncer de vejiga urinaria.

Los antígenos asociados a tumor que pueden ser objetivo incluyen, pero no se limitan a anhidrasa carbónica IX, CCCL19, CCCL21, CSAp, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, AFP, PSMA, CEACAM5, CEACAM-6, CSAp, B7, ED-B of fibronectina, Factor H, FHL-1, Flt-3, receptor de folato, GROB, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), HM1.24, factor de crecimiento similar a insulina-1 (ILGF-1), IFN- γ , IFN- α , IFN- β , IL-2, IL-4R, IL-6R, IL-13R, IL-15R, IL-17R, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, IP-10, MAGE, mCRP, MCP-1, MIP-1A, MIP-1B, MIF, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, factor de inhibición de macrófagos (MIF), antígeno unido por el anticuerpo PAM4, NCA-95, NCA-90, Ia, HM1.24, EGP-1, EGP-2, HLA-DR, tenascina, Le(y), RANTES, T101, TAC, antígeno Tn, antígenos de Thomson-Friedenreich, antígenos de necrosis tumoral, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), VEGFR, EGFR, P1GF, PSA, PSMA, factores del complemento C3, C3a, C3b, C5a, C5, y un producto oncogénico.

Los anticuerpos de ejemplo que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a hR1 (anti-IGF-1R, solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 12/722.645, presentada el 3/12/10), hPAM4 (anti-mucina, patente de EE.UU. nº 7.282.567), hA20 (anti-CD20, patente de EE.UU. nº 7.251.164), hA19 (anti-CD19, patente de EE.UU. nº 7.109.304), MMMU31 (anti-AFP, patente de EE.UU. nº 7.300.655), hLL1 (anti-CD74, patente de EE.UU. nº 7.312.318), hLL2 (anti-CD22, patente de EE.UU. nº 7.074.403), hMu-9 (anti-CSAp, patente de EE.UU. nº 7.387.773), hL243 (anti-HLA-DR, patente de EE.UU. nº 7.612.180), hMN-14 (anti-CEACAM5, patente de EE.UU. nº 6.676.924), hMN-15 (anti-CEACAM6, patente de EE.UU. nº 7.541.440), hRS7 (anti-EGP-1, patente de EE.UU. nº 7.238.785) y hMN-3 (anti-CEACAM6, solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 7.541.440). El experto en la técnica comprenderá de que esta lista no es limitante y que se puede usar cualquier anticuerpo conocido, como se describe con más detalle a continuación.

En otras realizaciones, los presentes complejos se pueden usar para tratar sujetos infectados con organismos patógenos, tales como bacterias, virus u hongos. Los hongos de ejemplo que se pueden tratar incluyen *Microsporum*, *Trichophyton*, *Epidermophyton*, *Sporothrix schenckii*, *Cryptococcus neoformans*, *Coccidioides immitis*, *Histoplasma capsulation*, *Blastomyces dermatitidis* o *Candida albican*. Los ejemplos de virus incluyen el virus de inmunodeficiencia humana (VIH), herpesvirus, citomegalovirus, virus de la rabia, virus de la gripe, virus del papiloma humano, virus de la hepatitis B, virus de la hepatitis C, virus Sendai, virus de leucemia felina, virus Reo, virus de la polio, virus similar a parvovirus de suero humano, virus de simio 40, virus sincitial respiratorio, virus de tumor mamario de ratón, virus varicela-zóster, virus del dengue, virus de la rubeola, virus del sarampión, adenovirus, virus de la leucemia de linfocitos T humana, virus de Epstein-Barr, virus de la leucemia murina, virus de las paperas, virus de la estomatosis vesicular, virus Sindbis, virus de la coriomeningitis linfocítica o virus de la lengua azul. Las bacterias de ejemplo incluyen *Bacillus anthracis*, *Streptococcus agalactiae*, *Legionella pneumophilia*, *Streptococcus pyogenes*, *Escherichia coli*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Neisseria meningitidis*, *Pneumococcus spp.*, *Hemophilis influenzae B*, *Treponema pallidum*, espiroquetas de la enfermedad de Lyme, *Pseudomonas aeruginosa*, *Mycobacterium leprae*, *Brucella abortus*, *Mycobacterium tuberculosis* o un *Mycoplasma*.

Los complejos para usar para la infección pueden comprender, por ejemplo, sitios de unión para uno o más determinante antigénicos en un patógeno, y se pueden conjugar o unir a un agente terapéutico para el patógeno, por ejemplo, un agente antivirico, antibiótico o antifúngico. Alternativamente, un conjugado establemente unido puede comprender un primer sitio de unión para un antígeno de patógeno y un segundo sitio de unión para un hapteno o vehículo que está unido a uno o más agentes terapéuticos. Los agentes terapéuticos para usar contra organismos infecciosos que se puede conjugar con, incorporar en o dirigirlos para unirlos a los presentes complejos incluyen, pero no se limitan a aciclovir, albendazol, amantadina, amikacina, amoxicilina, anfotericina B, ampicilina, aztreonam, azitromicina, bacitracina, bactrim, BATRAFEN®, bifonazol, carbenicilina, caspofungina, cefaclor, cefazolina, cefalosporinas, cefepime, ceftriaxona, cefotaxime, cloranfenicol, cidofovir, CIPRO®, claritromicina, ácido clavulánico, clotrimazol, cloxacilina, doxiciclina, econazol, eritrociclina, eritromicina, flagil, fluconazol, flucitosina, foscamet, furazolidona, ganciclovir, gentamicina, imipenem, isoniazid, itraconazol, kanamicina, ketoconazol, lincomicina, linezolid, meropenem, miconazol, minociclina, naftifina, ácido nalidixico, neomicina, netilmicina, nitrofurantoína, nistatina, osetamivir, oxacilina, paromomicina, penicilina, pentamidina, piperacilina-tazobactam, rifabutina, rifampina, rimantadina, estreptomycin, sulfametoxazol, sulfasalazina, tetraciclina, tioconazol, tobramicina, tolclato, tolnaftato, trimetoprim sulfametoxazol, valaciclovir, vancomicina, zanamir y zitromicina.

En diferentes realizaciones, los complejos pueden comprender una o más toxinas, tales como una toxina bacteriana, una toxina de planta, ricina, abrina, una ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina-A estafilocócica, proteína antivirica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de *pseudomonas*, endotoxina de *pseudomonas*, ranpirnasa (Rap), Rap (N69Q) o PE38. En una realización preferida, el complejo puede comprender un anticuerpo IgG unido a dos motivos de AD y cuatro copias de una toxina, tal como ranpirnasa, unidas a motivos de DDD. Se ha demostrado que dichos complejos son muy eficaces, con propiedades mejoradas de toxicidad y farmacocinéticas (véase, p. ej., la solicitud de patente de EE.UU. nº de serie 12/871.345).

Los presentes complejos también pueden comprender un inmunomodulador seleccionado del grupo que consiste en una citoquina, una quimioquina, un factor de crecimiento de citoblastos, una linfoxina, un factor hematopoyético, un factor estimulador de colonias (CSF), un interferón, eritropoyetina, trombopoyetina, factor de necrosis tumoral α

(TNF), TNF- β , factor estimulador de colonia de granulocitos (G-CSF), factor estimulador de colonia de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interferón- λ , factor de crecimiento de citoblastos designado "factor S1", hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovino, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona folículo estimulante (FSH), hormona estimuladora de tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, sustancia inhibidora de mullerian, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento vascular endotelial, integrina, NGF- β , factor de crecimiento de plaquetas, TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento similar a insulina-I, factor de crecimiento similar a insulina-II, CSF de macrófagos (M-CSF), IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, IL-25, LIF, FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, y linfotóxina. En algunas realizaciones preferidas, el complejo puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido a dos motivos de AD y cuatro copias de un inmunomodulador, tal como una citoquina, cada uno unido a un motivo de DDD. Se describen complejos de citoquinas, por ejemplo, en las patentes de EE.UU. n° 7.906.118 y 8.034.3522.

15 Las quimioquinas útiles que se pueden incorporar en un complejo presente incluyen, pero no se limitan a RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-beta e IT-10.

Los agentes antiangiogénicos de uso que se pueden incorporar en un complejo presente incluyen, pero no se limitan a angiostatina, baculostatina, canstatina, maspina, péptidos o anticuerpos anti-VEGF, péptidos o anticuerpos anti-factor de crecimiento placentario, anticuerpos anti-Flk-1, péptidos o anticuerpos anti-Flt-1, péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de metaloproteínasa tisular, interferones, interleuquina 12, IP-10, Gro- β , trombospondina, 2-metoxiestradiol, proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM101, Marimastat, pentosán polisulfato, angiopoyetina 2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida, talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor de plaquetas 4 o minociclina.

25 En otras realizaciones más, se pueden conjugar con o incorporar en un complejo uno o más agentes terapéuticos tales como aplidina, azaribina, anastrozol, azacitidina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, 10-hidroxycamptotecina, carmustina, celebrex, clorambucilo, cisplatino, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, glucurónido de daunomicina, daunorubicina, dexametasona, dietilestilbestrol, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina (2P-DOX), ciano-morfolino-doxorubicina, glucurónido de doxorubicina, glucurónido de epirubicina, etinil-estradiol, estramustina, etopósido, glucurónido de etopósido, fosfato de etopósido, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, fluorouracilo, fluoxomestrona, gemcitabina, caproato de hidroxiprogesterona, hidroxiourea, idarubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, leucovorina, lomustina, mecloretamina, acetato de medroprogesterona, acetato de megestrol, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, nitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, butirato de fenilo, prednisona, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, semustina estreptozocina, tamoxifeno, taxanos, taxol, propionato de testosterona, talidomida, tioguanina, tiotepá, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, velcade, vinblastina, vinorelbina, vincristina, un oligonucleótido de sentido contrario, un ARN de interferencia, o una combinación de los mismos.

40 En realizaciones que implican el direccionamiento previo, el complejo puede comprender un primer anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno asociado con una célula enferma, tejido o patógeno, mientras que un segundo anticuerpo o fragmento del mismo se puede unir a un hapteno en una construcción dirigible. Después de administración del complejo y localización de una célula, tejido o patógeno asociados a la enfermedad, se puede añadir una construcción dirigible para unirse al complejo localizado. Opcionalmente, se puede administrar un agente de depuración para depurar los complejos no localizados de la circulación antes de la administración de la construcción dirigible. Estos métodos son conocidos en la técnica y se describen en la patente de EE.UU. n° 4.624.846, WO 92/19273, y Sharkey et al., *Int. J. Cancer* 51: 266 (1992). Una construcción dirigible de ejemplo puede tener una estructura X-Phe-Lys(HSG)-D-Tyr-Lys(HSG)-Lys(Y)-NH₂, donde el compuesto incluye un agente quelante de cationes ácidos duros en X o Y, y un agente quelante de cationes ácidos blando en el X o Y que queda; y en donde el compuesto comprende además al menos un catión de diagnóstico o terapéutico, y/o uno o más agente terapéutico, agente de diagnóstico o enzima quelados o químicamente unidos.

Diferentes realizaciones pueden referirse a complejos que son útiles para inducir la apoptosis de células enfermas. Se pueden encontrar detalles adicionales en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20050079184. Dichas estructuras pueden comprender un primer y/o segundo precursor con afinidad de unión por un antígeno seleccionado del grupo que consiste en CD2, CD3, CD8, CD10, CD21, CD24, CD25, CD30, CD33, CD37, CD38, CD40, CD48, CD52, CD55, CD59, CD70, CD74, CD80, CD86, CD138, CD147, HLA-DR, CEA, CSAP, CA-125, TAG-72, EGFR, HER2, HER3, HER4, IGF-1R, c-Met, PDGFR, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, TNFR1, TNFR2, NGFR, Fas (CD95), DR3, DR4, DR5, DR6, VEGF, PIGF, ED-B fibronectina, tenascina, PSMA, PSA, anhidrasa carbónica IX, e IL-6. En realizaciones más particulares, un complejo útil para inducir la apoptosis puede comprender anticuerpos monoclonales, fragmentos Fab, anticuerpos o fragmentos quiméricos, humanizados o humanos. En realizaciones preferidas, el complejo puede comprender combinaciones de anticuerpos anti-CD74 X anti-CD20, anti-CD74 X anti-CD22, anti-CD22 X anti-CD20, anti-CD20 X anti-CD20, anti-CD20 X anti-HLA-DR, anti-CD 19 X anti-CD20, anti-CD20 X anti-CD80, anti-CD2 X anti-CD25, anti-CD8 X anti-CD25, y anti-CD2 X anti-CD147. En realizaciones más preferidas, los

anticuerpos o fragmentos de anticuerpos quiméricos, humanizados o humanos se pueden obtener de los dominios variables de LL2 (anti-CD22), LL1 (anti-CD74) o A20 (anti-CD20).

Diferentes realizaciones pueden referirse a complejos y su uso para el tratamiento de enfermedades inflamatorias e inmuno-desreguladas, enfermedades infecciosas, angiogénesis patológica o cáncer. En esta solicitud los complejos se unen a dos dianas diferentes seleccionadas del grupo que consiste en (A) efectores proinflamatorios del sistema inmunitario innato, (B) factores de coagulación, (C) factores de complemento y proteínas reguladoras de complemento, y (D) dianas específicamente asociadas con un trastorno inflamatorio o inmuno-desregulado o con una angiogénesis patológica o cáncer, en donde la última diana no es (A), (B) o (C). Al menos una de las dianas es (A), (B) o (C). Combinaciones adecuadas de dianas se describen en la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/634.076, presentada el 8 de diciembre, 2004, titulada "Methods and Compositions for Immunotherapy and Detection of Inflammatory and Immune-Dysregulatory Disease, Infectious Disease, Pathologic Angiogenesis and Cancer".

El efector proinflamatorio del sistema inmunitario innato al que se pueden unir las moléculas de unión, puede ser una citoquina efectora proinflamatoria, una quimioquina efectora proinflamatoria o un receptor efector proinflamatorio. Las citoquinas efectoras proinflamatorias incluyen MIF, HMGB-1 (proteína de alta movilidad del grupo de caja 1), TNF- α , IL-1, IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15 e IL-18. Los ejemplos de quimioquinas efectoras proinflamatorias incluyen CCL19, CCL21, IL-8, MCP-1, RANTES, MIP-1A, MIP-1B, ENA-78, MCP-1, IP-10, GROB y Eotaxina. Los receptores efectoras proinflamatorias incluyen IL-4R (receptor de interleuquina-4), IL-6R (receptor de interleuquina-6), IL-13R (receptor de interleuquina-13), IL-15R (receptor de interleuquina-15) e IL-18R (receptor de interleuquina-18).

El complejo también puede reaccionar con al menos un factor de coagulación, en particular factor tisular (TF) o trombina. En otras realizaciones, el complejo reacciona con al menos un factor de complemento o proteína reguladora de complemento. En realizaciones preferidas, el factor de complemento se selecciona del grupo que consiste en C3, C5, C3a, C3b y C5a. Cuando la molécula de unión reacciona específicamente con una proteína reguladora de complemento, la proteína reguladora de complemento preferiblemente se selecciona del grupo que consiste en CD46, CD55, CD59 y mCRP.

En algunas realizaciones, cualquier proteína o péptido terapéutico conocido en la técnica se puede unir a una secuencia de AD o DDD y usar como un efector en los métodos y composiciones reivindicados. Se conoce un gran número de dichas proteínas o péptidos terapéuticos, y se describen, por ejemplo, en la publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20060084794, "Albumin fusion proteins," presentada el 2 de noviembre, 2005. La tabla 1 del documento 20060084794, cita diferentes proteínas o péptidos terapéuticos de ejemplo conocidos útiles, incluyendo identificadores de ejemplo, números de referencia de patentes e indicaciones preferidas. Las proteínas o péptidos terapéuticos adicionales útiles se describen, por ejemplo, en la patente de EE.UU. n° 6.309.633, y pueden incluir, pero no se limitan a hormona adrenocorticotrópica, ebitrida, angiotensina, angiotensina II, asparaginasa, péptidos natriuréticos auriculares, péptidos diuréticos sódicos auriculares, bacitracina, beta-endorfinas, factores de coagulación de la sangre VII, VIII y IX, factor tímico de la sangre, factor morfogénico óseo, proteína morfogénica ósea, bradiquinina, caeruleina, polipéptido relacionado con el gen de la calcitonina, calcitoninas, CCK-8, factores de crecimiento celular, EGF, TGF- α , TGF- β , FGF ácido, FGF básico, quimioquinas, colecistoquinina, colecistoquinina-8, colecistoquinina-pancreozimina, colistina, factores estimulantes de colonias, GM-CSF, MCSF, factor liberador de corticotropina, citoquinas, desmopresina, dipéptido, dismutasa, dinofrina, edoisisina, endorfinas, endotelina, péptidos antagonistas de endotelina, endoterinas, encefalinas, factor de crecimiento epidérmico, eritropoyetina, hormona foliculo estimulante, galanina, polipéptido inhibidor gástrico, gastrinas, G-CSF, glucagón, glutatión peroxidasa, glutatio-peroxidasa, gonadotropina, gramicidina, gramicidinas, factor de crecimiento, factor liberador de hormonas de crecimiento, hormonas de crecimiento, h-ANP, hormona liberadora de hormona, gonadotropina coriónica humana, cadena β de la gonadotropina coriónica humana, lactógeno placentario humano, insulina, factores de crecimiento similares a insulina, IGF-I, IGF-II, interferones, interleuquinas, polipéptido intestinal, calcireína, ciotorfina, luliberina, hormona luteinizante, hormona liberadora de la hormona luteinizante, cloruro de lisozima, hormona estimuladora de melanocitos, melitina, motilina, muramilo, muramil dipéptido, factor de crecimiento nervioso, factores de nutrición nerviosos, NT-3, NT-4, CNTF, GDNF, BDNF, neuropéptido Y, neurotensina, oxitocina, pancreastatina, polipéptido pancreático, pancreozimina, hormona paratiroidea, pentagastrina, polipéptido YY, polipéptidos activadores de la adenilciclasa hipofisaria, factor de crecimiento derivado de plaquetas, polimixina B, prolactina, polipéptido estimulador de la síntesis de proteínas, proteína relacionada con PTH, relaxina, renina, secretina, factor tímico del suero, somatomedinas, somatostatinas, sustancia P, superóxido, superóxido dismutasa, taftsina, tetragastrina, trombopoyetina, factor humoral tímico, timopoyetina, timosina, timoestimulina, hormona liberadora de la hormona tiroidea, hormona estimuladora de tiroides, hormona liberadora de tirotrina TRH, tripsina, tuftsina, factor de crecimiento tumoral, factor de necrosis tumoral, tirocidina, urogastrona, uroquinasa, polipéptido intestinal vasoactivo, vasopresinas, y equivalentes funcionales.

En otras realizaciones preferidas, los complejos pueden comprender un anticuerpo o fragmento del mismo que se une a un antígeno o una célula presentadora de antígeno (APC), tal como un antígeno de célula dendrítica (DC), unido a un xenoantígeno o un antígeno mutagenizado o químicamente modificado (véase, p. ej., la patente de EE.UU. n° 7.901.680, USSN 12/754.740). Dichos complejos son útiles para inducir una respuesta inmunitaria contra el antígeno diana seleccionado, por ejemplo un antígeno asociado a tumor. Los antígenos de DC de ejemplo que se

pueden dirigir incluyen, pero no se limitan a, CD209 (DC-SIGN), CD34, CD74, CD205, TLR 2 (receptor tipo toll 2), TLR 4, TLR 7, TLR 9, BDCA-2, BDCA-3, BDCA-4, y HLA-DR. En otras realizaciones, el anticuerpo que se dirige a DC o fragmento del mismo se puede unir a un antígeno asociado a patógeno para inducir una respuesta inmunitaria contra patógenos responsables de la enfermedad infecciosa. Se describe una realización de ejemplo para antígenos asociados a virus de la viruela en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 12/915.515.

En realizaciones alternativas, el complejo de DNLTM puede comprender un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión al antígeno unido a un motivo portador de oligonucleótido, tal como una protamina, dendrímero u otro polímero, útil para el suministro de especies de ARN de interferencia tales como ARNip. Los complejos de ejemplo útiles para dichos fines se describen en la solicitud de patente de EE.UU. n° de serie 12/964.021, presentada el 12/9/10.

Breve descripción de los dibujos

Los siguientes dibujos forman parte de la presente memoria descriptiva y están incluidos para demostrar mejor algunas realizaciones de la presente invención. Las realizaciones se pueden entender mejor por referencia a uno o más de esos dibujos en combinación con la descripción detallada de realizaciones específicas presentadas en la presente memoria.

FIG. 1. Módulos y conjugados de DNLTM. (a) C_k-AD2-IgG (C_k-AD2-IgG- epratuzumab o C_k-AD2-IgG-veltuzumab), un módulo de IgG-AD2 con un AD2 fusionado en el extremo carboxilo terminal de cada cadena ligera kappa, (b) C_H1-DDD2-Fab-veltuzumab dimérico, un módulo Fab-DDD con DDD2 fusionado en el extremo carboxilo terminal de la cadena F_d, (c) 22^{*}-(20)-(20), un bsHexAb que comprende C_k-AD2-IgG-epratuzumab y dos módulos diméricos C_H1-DDD2-Fab-veltuzumab, (d) 22-(20)-(20), un bsHexAb que comprende C_H3-AD2-IgG epratuzumab y dos módulos diméricos C_H1-DDD2-Fab-veltuzumab, (e) un módulo dimérico IFNα2b-DDD2 con DDD2 fusionado en el extremo carboxilo terminal del IFNα2b por un conector peptídico flexible, (f) 20^{*}-2b, una inmunocitoquina con IFNα2b tetramérico construido con C_k-AD2-IgG-veltuzumab fusionado con dos módulos diméricos IFNα2b-DDD2, (g) 20-2b, un IgG-IFNα con IFNα2b tetrámero construido con C_H3-AD2-IgG fusionado con dos módulos diméricos IFNα2b-DDD2. Los dominios variable (V) y constante (C) de las cadenas pesada (H) y ligera (L) de IgG se representan como óvalos. Los péptidos de DDD2 y AD2 se muestran como hélices oscuras y claras, respectivamente, con las localizaciones indicadas para los respectivos grupos sulfhidrilo (SH) reactivos y los puentes disulfuro de "cierre" indicados como líneas que unen las hélices.

FIG. 2. Farmacocinética de 22^{*}-(20)-(20) y 22-(20)-(20) en ratones y conejos. En estas y otras figuras, el uso de un asterisco (*) indica un complejo de DNLTM que comprende motivos de AD conjugados con cadena ligera, mientras que la ausencia de un asterisco indica un complejo de DNLTM que comprende motivos de AD conjugados con cadena pesada. En los intervalos indicados, se midió la concentración de las moléculas intactas en las muestras de suero usando un ELISA biespecífico. Se administró a los animales 22^{*}-(20)-(20) (círculos), 22-(20)-(20) (cuadrados) o epratuzumab (triángulos) por vía subcutánea. Se extrajo sangre de los ratones terminalmente, mientras que de los conejos se extrajo sangre en forma seriada. (a) A grupos de 3 ratones (media ± DE) se administró 1,0 mg de bsHexAb o una cantidad equimolar de epratuzumab (0,41 mg). (b) A grupos de 4 ratones se les administraron 0,5 mg de bsAb. Los datos individuales se representan gráficamente con análisis de regresión no lineal usando un modelo de disminución exponencial monofásica con el software Prism. (c, d) Se administró a conejos 18 mg (6 mg/kg) de bsAb. Las curvas de Pk se muestran para los animales individuales (c) y la media ± DE de cada grupo (d).

FIG. 3. Farmacocinética y estabilidad in vivo de 20^{*}-2b y 20-2b en ratones. Se administró a grupos de 3 ratones 1,0 mg de 20^{*}-2b (círculos) o 20-2b (cuadrados) por inyección subcutánea (a) o intravenosa (b,c,d). (c) Para cada dato obtenido de animales individuales, se midió la concentración en el suero de IgG-IFNα e IgG total (veltuzumab) usando formatos de ELISA biespecíficos (línea negra) o específicos de veltuzumab (línea de puntos). (d) Para cada dato se calculó el % de IgG-IFNα intacto dividiendo la concentración en el suero medida con el ELISA biespecífico entre la determinada con el ensayo específico de veltuzumab, y multiplicando el cociente por 100. El % de IgG-IFNα intacto se representó gráficamente frente a las horas después de inyección, y se determinó la velocidad de disociación por análisis de regresión lineal (± DE).

FIG. 4. Funciones efectoras. La CDC in vitro se comparó entre (a) 20^{*}-2b, 20-2b y veltuzumab, y (b) 22^{*}-(20)-(20), 22-(20)-(20), veltuzumab y epratuzumab. (c) La ADCC in viro se comparó entre 22^{*}-(20)-(20), 22-(20)-(20), veltuzumab y epratuzumab. Se usó mAb hMN-14 como un control de isotipo de no unión para cada experimento.

FIG. 5. Eficacia in vivo con xenoinjertos de linfoma de Daudi Burkitt diseminados. (a) Se inoculó a grupos de 8 ratones SCID Daudi por inyección IV. El día 7, se administró a los ratones una sola dosis de 1,0 o 0,25 µg de 20^{*}-2b o 20-2b por inyección SC. Se administró a grupos de control 0,6 µg de veltuzumab o solución salina. (b) Se inoculó a grupos de 10 ratones SCID por inyección IV el día 0. Los días 1 y 5 se administraron a los ratones dosis altas (1 mg) o bajas (10 µg) de 22^{*}-(20)-(20) o 22-(20)-(20) por inyección SC. Se administró a grupos de control una dosis alta de epratuzumab, dosis alta de epratuzumab más C_H1-DDD2-veltuzumab o solución salina. La significación estadística se determinó por análisis de log-rank de gráficas de supervivencia de Kaplan-Myer.

FIG. 6. Unión de CD20. Se incubaron células Daudi con concentraciones crecientes de 20^{*}-2b marcado con PE o

veltuzumab y se evaluó la unión por citometría de flujo. MFI, intensidad de fluorescencia media.

FIG. 7. Citotoxicidad in vitro. Se incubaron células Daudi con concentraciones crecientes de 20*-2b (círculos) o 20-2b (cuadrados) durante 3 días antes de la cuantificación de la densidad de células viables relativa.

5 FIG. 8. Disociación in vivo de 22*-(20)-(20) y 22-(20)-(20) en ratones. Para cada dato obtenido de animales individuales, se midió la concentración en el suero de bsHexAb intacto e IgG total (epratuzumab) usando ELISA biespecífico o específico de epratuzumab. Se calculó el % de bsHexAb intacto dividiendo la concentración en el suero medida con el ELISA biespecífico entre la determinada con el ensayo específico de epratuzumab, y multiplicando el cociente por 100. El % de IgG-IFN α intacto se representó gráficamente frente a las horas después de inyección, y la velocidad de disociación se determinó por análisis de regresión lineal. Barras de error, desviación estándar.

10 FIG. 9. Disociación in vivo de 22*-(20)-(20) y 22-(20)-(20) en conejos. Para cada dato se midió la concentración en el suero de bsHexAb intacto e IgG total usando ELISA biespecífico o específico de epratuzumab. Se calculó el % de bsHexAb intacto dividiendo la concentración en el suero medida con el ELISA biespecífico entre la determinada con el ensayo específico de epratuzumab, y multiplicando el cociente por 100. No se observó disociación en conejos. Barras de error, desviación estándar.

15 FIG. 10. Reducción drástica de Raji y linfocitos B normales de la sangre entera. Se incubó sangre entera heparinizada con el mAb indicado 5 nM durante dos días a 37°C antes del análisis de FACS.

FIG. 11. Representación esquemática de un vector de expresión C $_k$ -AD2-IgG-pdHL2.

FIG. 12. Representación esquemática de un vector de expresión C $_k$ -AD2-IgG-pGSHL

20 Descripción detallada

Definiciones

Salvo que se especifique lo contrario, “un” o “una” significa “uno o más”.

Como se usa en la presente memoria, los términos “y” y “o” se pueden usar para dar a entender la conjuntiva o disyuntiva. Es decir, ambos términos deben entenderse como equivalentes a “y/o” salvo que se exponga otra cosa.

25 Un “agente terapéutico” es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el tratamiento de una enfermedad. Los ejemplos de agentes terapéuticos incluyen anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, péptidos, fármacos, toxinas, enzimas, nucleasas, hormonas, inmunomoduladores, oligonucleótidos de sentido contrario, ARN de interferencia pequeños (ARNip), agentes quelantes, compuestos de boro, agentes fotoactivos, colorantes y radioisótopos.

30 Un “agente de diagnóstico” es un átomo, molécula o compuesto que es útil en el diagnóstico de una enfermedad. Los agentes de diagnóstico útiles incluyen, pero no se limitan a radioisótopos, colorantes (tales como complejo de biotina-estreptavidina), agentes de contraste, compuestos o moléculas fluorescentes, y agente potenciadores (p. ej., iones paramagnéticos) para generación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

35 Un “anticuerpo” como se usa en la presente memoria se refiere a una molécula de inmunoglobulina de longitud entera (es decir, que se encuentra de forma natural o formado por procesos de recombinación de fragmentos de genes de inmunoglobulinas normales) (p. ej., un anticuerpo IgG) o una parte inmunológicamente activa (es decir, que se une específicamente) de una molécula de inmunoglobulina, como un fragmento de anticuerpo. Un “anticuerpo” incluye anticuerpos monoclonales, policlonales, biespecíficos, multiespecíficos, murinos, quiméricos, humanizados y humanos.

40 Un “anticuerpo desnudo” es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo que no está unido a un agente terapéutico o de diagnóstico. La parte Fc de un anticuerpo desnudo intacto puede proporcionar funciones efectoras, tales como fijación del complemento y ADCC (véase, p. ej., Markrides, *Pharmacol Rev* 50:59-87, 1998). Otros mecanismos por los cuales los anticuerpos desnudos inducen muerte celular pueden incluir apoptosis. (Vaswani y Hamilton, *Ann Allergy Asthma Immunol* 81: 105- 119, 1998.)

45 Un “fragmento de anticuerpo” es una parte de un anticuerpo intacto tal como F(ab') $_2$, F(ab) $_2$, Fab', Fab, Fv, sFv, scFv, dAb y similares. Independientemente de la estructura, un fragmento de anticuerpo se une con el mismo antígeno que es reconocido por el anticuerpo de longitud entera. Por ejemplo, los fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos aislados que consisten en regiones variables, tales como los fragmentos “Fv” que consisten en las regiones variables de las cadenas pesada y ligera o moléculas de polipéptido monocatenarias recombinantes, en las que las regiones variables de las cadenas ligera y pesada están conectadas por un conector peptídico (“proteínas scFv”). Los “anticuerpos monocatenarios”, abreviado con frecuencia como “scFv” consisten en una cadena de polipéptido que comprende tanto un dominio de V $_H$ como uno de V $_L$ que interacciona para formar un sitio de unión al antígeno. Los dominios de V $_H$ y V $_L$ están normalmente unidos por un péptido de 1 a 25 restos de aminoácidos. Los fragmentos de anticuerpo también incluyen diacuerpos, triacuerpos y anticuerpos de dominio único (dAb).

50

Un “anticuerpo quimérico” es una proteína recombinante que contiene los dominios variables que incluyen regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de un anticuerpo derivado de una especie, preferiblemente un anticuerpo de roedor, mientras que los dominios constantes de la molécula de anticuerpo derivan de los de un anticuerpo humano. Para aplicaciones en veterinaria, los dominios constantes del anticuerpo quimérico pueden derivar de otras especies, tales como un gato o perro.

Un “anticuerpo humanizado” es una proteína recombinante en la que los CDR de un anticuerpo de una especie; p. ej., un anticuerpo de roedor, se transfieren de las cadenas variables pesada y ligera del anticuerpo del roedor a dominios de las cadenas variables pesada y ligera humanos, incluyendo secuencias de la región de armazón (FR) humana. Los dominios constantes de la molécula de anticuerpo derivan de los de un anticuerpo humano.

Un “anticuerpo humano” es un anticuerpo obtenido de ratones transgénicos que se han modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos específicos en respuesta a la exposición al antigénico. En esta técnica, se introducen elementos de locus de la cadena pesada y ligera humana en cepas de ratones derivados de líneas de citoblastos embrionarios que contienen alteraciones dirigidas de los locus de cadena pesada y de cadena ligera endógenos. Los ratones transgénicos pueden sintetizar anticuerpos humanos para antígenos humanos, y los ratones se pueden usar para producir hibridomas que segregan anticuerpos humanos. Se describen métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos en Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al., *Nature* 368:856 (1994), y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). También se puede construir un anticuerpo completamente humano por métodos de transfección genética o cromosómica, así como tecnología de presentación de fagos, todos los cuales se conocen en la técnica. (Véase, p. ej., McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990) para la producción de anticuerpos humanos y fragmentos de los mismos in vitro, a partir de repertorios de genes del dominio variable de inmunoglobulinas de donantes inmunizados). En esta técnica, se clonan genes del dominio variable de anticuerpos en el marco en un gen de proteína de recubrimiento mayor o menor de un bacteriófago filamentoso, y se presentan como fragmentos de anticuerpos funcionales en la superficie de la partícula de fago. Debido a que la partícula filamentosa contiene una copia de ADN monocatenaria del genoma del fago, las selecciones basadas en las propiedades funcionales del anticuerpo también dan como resultado la selección del gen que codifica el anticuerpo que presenta esas propiedades. De esta forma, el fago imita algunas de las propiedades del linfocito B. La presentación en fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos, para su revisión, véase, p. ej., Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993). Los anticuerpos humanos también pueden ser generados por linfocitos B activados in vitro. (Véase, patente de EE.UU. n° 5.567.610 y 5.229.275).

Como se usa en la presente memoria, la expresión “proteína de fusión de anticuerpo” es una molécula de unión al antígeno producida de forma recombinante en la que un anticuerpo o fragmento de anticuerpo está unido a otra proteína o péptido, tal como el mismo o diferente anticuerpo o fragmento de anticuerpo o un péptido de DDD o AD. La proteína de fusión puede comprender un solo componente de anticuerpo, una combinación multivalente o multiespecífica de diferentes componentes de anticuerpos o copias múltiples del mismo componente de anticuerpo. La proteína de fusión puede comprender adicionalmente un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo y un agente terapéutico. Los ejemplos de agentes terapéuticos adecuados para dichas proteínas de fusión incluyen inmunomoduladores y toxinas. Una toxina preferida comprende una ribonucleasa (RNasa), preferiblemente una RNasa recombinante.

Un “anticuerpo multiespecífico” es un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a al menos dos dianas que son de diferente estructura, p. ej., dos antígenos diferentes, dos epítomos diferentes en el mismo antígeno, o un hapteno y/o un antígeno o epítomo. Un “anticuerpo multivalente” es un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a al menos dos dianas que son de la misma o diferentes estructura. La valencia indica cuántos brazos o sitios de unión tiene el anticuerpo para un solo antígeno o epítomo; es decir, monovalente, bivalente, trivalente o multivalente. La multivalencia del anticuerpo significa que puede aprovecharse de interacciones múltiples en la unión a un antígeno, aumentando así la avidéz de la unión al antígeno. La especificidad indica a cuántos antígenos o epítomos es capaz de unirse un anticuerpo; es decir, monoespecífico, biespecífico, triespecífico, multiespecífico. Usando estas definiciones, un anticuerpo natural, p. ej., una IgG, es bivalente porque tiene dos brazos de unión pero es monoespecífica porque se une a un epítomo. Los anticuerpos multiespecíficos, multivalentes son construcciones que tienen más de un sitio de unión de diferente especificidad.

Un “anticuerpo biespecífico” es un anticuerpo que se puede unir simultáneamente a dos dianas que son de diferente estructura. Los anticuerpos biespecíficos (bsAb) y fragmentos de anticuerpo biespecífico (bsFab) pueden tener al menos un brazo que se une específicamente a, por ejemplo, un linfocito B, linfocito T, antígeno o epítomo de células mieloides, plasmática y mastocito y al menos otro brazo que se une específicamente a un conjugado dirigible que lleva un agente terapéutico o de diagnóstico. Se puede producir una variedad de anticuerpos biespecíficos usando ingeniería molecular.

Un “xenoantígeno” es un antígeno que se encuentra en más de una especie. Cuando se usa en la presente memoria en una vacuna para inducir una respuesta inmunitaria en un sujeto, el xenoinjerto es de una especie que es diferente de la del sujeto. Por ejemplo, un xenoinjerto que es útil en una vacuna humana puede ser de un ratón, una rata, un conejo y otra especie no humana.

Una preparación de anticuerpo o inmunotoxina, o una composición descrita en la presente memoria, se dice que se administra en una "cantidad terapéuticamente eficaz" si la cantidad administrada es fisiológicamente significativa. Un agente es fisiológicamente significativo si su presencia da como resultado un cambio detectable en la fisiología de un sujeto receptor. En realizaciones particulares, una preparación de anticuerpo es fisiológicamente significativa si su presencia produce una respuesta antitumoral o mitiga los signos y síntomas de un estado de enfermedad autoinmunitaria. Un efecto fisiológicamente significativo también podría ser producto de una respuesta inmunitaria humoral y/o celular en el sujeto receptor que conduce a la inhibición del crecimiento o muerte de células dianas.

Anticuerpos

Las técnicas para preparar anticuerpos monoclonales contra prácticamente cualquier antígeno diana son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Kohler y Milstein, *Nature* 256: 495 (1975), y Coligan et al. (eds.), CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY, VOL. 1, páginas 2.5.1-2.6.7 (John Wiley & Sons 1991). Brevemente, los anticuerpos monoclonales se pueden obtener inyectando en ratones una composición que comprende un antígeno, retirando el bazo para obtener linfocitos B, fusionando los linfocitos B con células de mieloma para producir hibridomas, clonando los hibridomas, seleccionando clones positivos que producen anticuerpos contra el antígeno, cultivando los clones para producir anticuerpos contra el antígeno y aislando los anticuerpos de los cultivos de hibridoma.

Los MAb se pueden aislar y purificar de los cultivos de hibridoma por una variedad de técnicas bien establecidas. Dichas técnicas de aislamiento incluyen cromatografía de afinidad con proteína A-Sefarosa, cromatografía de exclusión por tamaño molecular y cromatografía de intercambio iónico. Véase, por ejemplo, Coligan en las páginas 2.7.1-2.7.12 y páginas 2.9.1-2.9.3. Véase, también Baines et al., "Purification of Immunoglobulin G (IgG)", en METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, VOL. 10, páginas 79-104 (The Humana Press, Inc. 1992).

Después del aumento inicial de anticuerpos contra el inmunógeno, los anticuerpos se pueden secuenciar y posteriormente preparar por técnicas recombinantes. La humanización y quimerización de anticuerpos murinos y fragmentos de anticuerpos son bien conocidos para los expertos en la técnica. El uso de componentes de anticuerpos derivados de anticuerpos humanizados, quiméricos o humanos elimina los potenciales problemas asociados con la inmunogenicidad de regiones constantes murinas.

Anticuerpos quiméricos

Un anticuerpo quimérico es una proteína recombinante en la que las regiones variables de un anticuerpo humano se han sustituido por las regiones variables de, por ejemplo, un anticuerpo de ratón, que incluyen las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) del anticuerpo de ratón. Los anticuerpos quiméricos presentan menos inmunogenicidad y mayor estabilidad cuando se administran a un sujeto. Las técnicas generales para la clonación de dominios variables de inmunoglobulina murina se describen, por ejemplo, en Orlandi et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 86: 3833 (1989). Las técnicas para construir anticuerpos quiméricos son bien conocidas para los expertos en la técnica. Como un ejemplo, Leung et al., *Hybridoma* 13:469 (1994), produjeron una quimera LL2 combinando secuencias de ADN que codifican los dominios de V_k y V_h de LL2 murino, un anticuerpo monoclonal anti-CD22, con los respectivos dominios de la región constante κ e IgG_1 humanos.

Anticuerpos humanizados

Las técnicas para producir MAb humanizados son bien conocidas en la técnica (véase, p. ej., Jones et al., *Nature* 321: 522 (1986), Riechmann et al., *Nature* 332: 323 (1988), Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534 (1988), Carter et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 89: 4285 (1992), Sandhu, *Crit. Rev. Biotech.* 12: 437 (1992), y Singer et al., *J. Immun.* 150: 2844 (1993)). Un anticuerpo monoclonal quimérico o murino se puede humanizar por transferencia de los CDR de ratón de las cadenas variables pesada y ligera de la inmunoglobulina de ratón a los correspondientes dominios variables de un anticuerpo humano. Las regiones armazón (FR) de ratón en el anticuerpo monoclonal quimérico también se sustituyen por secuencias de FR humanas. Puesto que la simple la transferencia de CDR de ratón a FR humanas da como resultado a menudo una reducción o incluso pérdida de afinidad del anticuerpo, puede ser necesaria la modificación adicional con el fin de restablecer la afinidad original del anticuerpo murino. Esto se puede llevar a cabo por la sustitución de uno o más restos humanos en las regiones FR por sus homólogos murinos para obtener un anticuerpo que tiene bien afinidad por su epítipo. Véase, por ejemplo, Tempest et al., *Biotechnology* 9:266 (1991) y Verhoeyen et al., *Science* 239: 1534 (1988). En general, los restos de aminoácidos de la FR humana que difieren de sus homólogos murinos y están situados cerca de o tocando uno o más restos de CDR serían candidatos para la sustitución.

Anticuerpos humanos

Los métodos para producir anticuerpos totalmente humanos usando procedimientos combinatorios o animales transgénicos transformados con locus de inmunoglobulina humana, son conocidos en la técnica (p. ej., Mancini et al., 2004, *New Microbiol.* 27:315-28; Conrad y Scheller, 2005, *Comb. Chem. High Throughput Screen.* 8:117-26; Brekke y Loset, 2003, *Curr. Opin. Pharmacol.* 3:544-50). También se puede construir un anticuerpo totalmente humano por métodos de transfección genética o cromosómica, así como con tecnología de presentación en fagos, todos los cuales son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, McCafferty et al., *Nature* 348:552-553 (1990).

Dichos anticuerpos totalmente humanos se espera que presenten incluso menos efectos secundarios que los anticuerpos quiméricos o humanizados y que funcionen in vivo esencialmente como anticuerpos humanos endógenos. En algunas realizaciones, los métodos y procedimientos reivindicados pueden usar anticuerpos humanos producidos por dichas técnicas.

5 En una alternativa, se puede usar la técnica de presentación en fagos para generar anticuerpos humanos (p. ej., Dantas-Barbosa et al., 2005, *Genet. Mol. Res.* 4:126-40). Los anticuerpos humanos se pueden generar a partir de seres humanos normales o a partir de seres humanos que presentan una enfermedad particular, tal como cáncer (Dantas-Barbosa et al., 2005). La ventaja de construir anticuerpos humanos a partir de un individuo enfermo es que el repertorio de anticuerpos en la circulación se puede desviar hacia anticuerpos contra antígenos asociados con la enfermedad.

10 En un ejemplo no limitante de esta metodología, Dantas-Barbosa et al. (2005) construyeron una biblioteca de presentación en fagos de fragmentos de anticuerpos Fab humanos de pacientes con osteosarcoma. En general, se obtuvo el ARN total de linfocitos de la sangre en la circulación (ibidem). Los Fab recombinantes se clonaron de repertorios de anticuerpos de cadena μ , γ y κ y se insertaron en una biblioteca de presentación en fagos (ibidem). Los ARN se convirtieron en cADN y se usaron para hacer bibliotecas de cADN de Fab usando cebadores específicos contra las secuencias de inmunoglobulina de la cadena pesada y ligera (Marks et al., 1991, *J. Mol. Biol.* 222:581-97). La construcción de bibliotecas se llevó a cabo de acuerdo con Andris-Widhopf et al. (2000, En: *Phage Display Laboratory Manual*, Barbas et al. (eds), 1ª edición, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY págs. 9.1 a 9.22). Los fragmentos Fab finales se digirieron con endonucleasas de restricción y se insertaron en el genoma de bacteriófago para hacer la biblioteca de presentación en fagos. Dichas bibliotecas se pueden cribar mediante métodos de presentación en fagos estándar, como se conocen en la técnica (véase, p. ej., Pasqualini y Ruoslahti, 1996, *Nature* 380:364-366; Pasqualini, 1999, *The Quart. J. Nucl. Med.* 43:159-162).

15 La presentación en fagos se puede llevar a cabo en una variedad de formatos, para su revisión, véase, p. ej., Johnson y Chiswell, *Current Opinion in Structural Biology* 3:5564-571 (1993). También se pueden generar anticuerpos humanos mediante linfocitos B activados in vitro. Véanse las patentes de EE.UU. n° 5.567.610 y 5.229.275. El experto en la técnica comprenderá que estas técnicas son de ejemplo y que se puede usar cualquier método conocido para hacer y cribar anticuerpos o fragmentos de anticuerpos humanos.

20 En otra alternativa, se pueden usar animales transgénicos que se han modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos, para generar anticuerpos contra esencialmente cualquier diana inmunogénica, usando protocolos de inmunización convencionales. Los métodos para obtener anticuerpos humanos a partir de ratones transgénicos se describen en Green et al., *Nature Genet.* 7:13 (1994), Lonberg et al, *Nature* 368:856 (1994), y Taylor et al., *Int. Immun.* 6:579 (1994). Un ejemplo no limitante de dicho sistema es el XenoMouse® (p. ej., Green et al., 1999, *J. Immunol. Methods* 231:11-23) de Abgenix (Fremont, CA). En el XenoMouse® y animales similares, los genes de anticuerpos de ratón se han inactivado y sustituido por genes de anticuerpos humanos funcionales, mientras que permanece intacto el resto del sistema inmunitario de ratón.

25 El XenoMouse® se transformó con YAC (cromosomas artificiales de levadura) configurados con línea germinal que contenían partes de los locus de IgH e Igkappa humana, que incluían la mayoría de las secuencias de regiones variables, junto con genes auxiliares y secuencias reguladoras. El repertorio de regiones variables humanas se puede usar para generar linfocitos B que producen anticuerpos, que pueden ser procesados en hibridomas por técnicas conocidas. Un XenoMouse® inmunizado con un antígeno diana producirá anticuerpos humanos por la respuesta inmunitaria normal, los cuales se pueden recoger y/o producir por técnicas convencionales descritas anteriormente. Están disponibles una variedad de cepas de XenoMouse®, cada una de las cuales es capaz de producir una clase diferente de anticuerpo. Se ha mostrado que los anticuerpos humanos producidos de forma transgénica tienen potencial terapéutico, a la vez que retienen las propiedades farmacocinéticas de anticuerpos humanos normales (Green et al., 1999). El experto en la técnica comprenderá que las composiciones y métodos reivindicados no están limitados al uso del sistema XenoMouse® sino que se puede usar cualquier animal transgénico que se ha modificado genéticamente para producir anticuerpos humanos.

Clonación y producción de anticuerpos

30 Diferentes técnicas, tales como la producción de anticuerpos quiméricos o humanizados, pueden implicar procedimientos de clonación y construcción de anticuerpos. Las secuencias de V_{κ} (cadena ligera variable) y V_H (cadena pesada variable) para un anticuerpo de interés se pueden obtener por una variedad de procedimientos de clonación molecular, tales como RT-PCR, 5'-RACE y cribado de biblioteca de cADN. Los genes de V de un anticuerpo de una célula que expresa un anticuerpo murino, se pueden clonar por amplificación de PCR y secuenciar. Para confirmar su autenticidad, los genes de V_L y V_H clonados se pueden expresar en el cultivo celular como un Ab quimérico como describen Orlandi et al., (*Proc. Natl. Acad. Sci., USA*, 86: 3833 (1989)). Basado en secuencias de genes de V, se puede entonces diseñar y construir un anticuerpo humanizado como describen Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

El cADN se puede preparar a partir de cualquier línea de hibridoma conocida o línea celular transfectada que produce un anticuerpo murino por técnicas de clonación molecular generales (Sambrook et al., *Molecular Cloning, A*

laboratory manual, 2ª Ed (1989)). La secuencia de V_K para el anticuerpo se puede amplificar usando los cebadores VK1BACK y VK1FOR (Orlandi et al., 1989) o el conjunto de cebadores extendidos descrito por Leung et al. (*BioTechniques*, 15: 286 (1993)). Las secuencias de V_H se pueden amplificar usando la pareja de cebadores VH1BACK/VH1 FOR (Orlandi et al., 1989) o los cebadores que se reasocian con la región constante de la IgG murina descritos por Leung et al. (*Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los genes de V humanizados se pueden construir por una combinación de síntesis de moldes de oligonucleótidos largos y amplificación por PCR como se describe en Leung et al. (*Mol. Immunol.*, 32: 1413 (1995)).

Los productos de la PCR para V_K se pueden subclonar en un vector de estadificación, tal como un vector de estadificación basado en pBR327, que contiene un promotor de Ig, una secuencia de péptido señal y sitios de restricción convenientes. Los productos de la PCR para V_H se pueden subclonar en un vector de estadificación similar, tal como VHpBS basado en pBluescript. Los casetes de expresión que contienen las secuencias de V_K y V_H junto con el promotor y secuencias de péptido señal se pueden cortar de VKpBR y VHpBS y ligar en vectores de expresión adecuados, tales como pKh y pG1g, respectivamente (Leung et al., *Hybridoma*, 13:469 (1994)). Los vectores de expresión se pueden cotransfectar en una célula adecuada y vigilar en los líquidos sobrenadantes la producción de un anticuerpo quimérico, humanizado o humano. Alternativamente, los casetes de expresión de V_K y V_H se pueden cortar y subclonar en un solo vector de expresión, tal como pdHL2, como describen Gillies et al. (*J. Immunol. Methods* 125:191 (1989) y también mostrado en Losman et al., *Cancer*, 80:2660 (1997)).

En una realización alternativa, los vectores de expresión se pueden transfectar en células hospedantes que se han adaptado previamente para la transfección, crecimiento y expresión en medio exento de suero. Las líneas celulares de ejemplo que se pueden usar incluyen las líneas celulares Sp/EEE, Sp/ESF y Sp/ESF-X (véase, p. ej., las patentes de EE.UU. n° 7.531.327; 7.537.930 y 7.608.425). Estas líneas celulares de ejemplo se basan en la línea celular de mieloma Sp2/0, transfectada con un gen Bcl-EEE mutante, expuesto a metotrexato para amplificar secuencias de genes transfectados y previamente adaptados a la línea celular exenta de suero para la expresión de proteínas.

Fragmentos de anticuerpos

Los fragmentos de anticuerpos que reconocen epítopos específicos se pueden generar por técnicas conocidas. Los fragmentos de anticuerpos son porciones de unión al antígeno de un anticuerpo, tales como $F(ab')_2$, Fab' , $F(ab)_2$, Fab , Fv , sFv y similares. Los fragmentos de $F(ab')_2$ se pueden producir por digestión con pepsina de la molécula de anticuerpo y se pueden generar fragmentos Fab' por reducción de puentes disulfuro de los fragmentos $F(ab')_2$. Alternativamente, se pueden construir bibliotecas de expresión de Fab' (Huse et al., 1989, *Science*, 246:1274-1281) para permitir la identificación rápida y fácil de fragmentos de Fab' monoclonales con la especificidad deseada. Se pueden generar fragmentos $F(ab)_2$, por digestión con papaína de un anticuerpo.

Una molécula de Fv monocatenaria (scFv) comprende un dominio VL y un dominio VH. Los dominios VL y VH se asocian para formar un sitio de unión de la diana. Estos dos dominios se unen además covalentemente a un conector peptídico (L). Los métodos para hacer moléculas de scFv y diseñar conectores peptídicos adecuados se describen en la patente de EE.UU. n° 4.704.692, patente de EE.UU. n° 4.946.778, R. Raag y M. Whitlow, "Single Chain Fvs." *FASEB Vol 9:73-80* (1995) y R.E. Bird y B.W. Walker, "Single Chain Antibody Variable Regions", *TIBTECH*, Vol 9: 132-137 (1991).

También son conocidas en la materia las técnicas para producir anticuerpos de un solo dominio (DAB), como describen, por ejemplo, Cossins et al. (2006, *Prot Express Purif* 51:253-259).

Las técnicas para producir anticuerpos de un solo dominio también se conocen en la materia, como describen, por ejemplo, Cossins et al. (2006, *Prot Express Purif* 51:253-259). Los anticuerpos de un solo dominio (VHH) se pueden obtener, por ejemplo, de camellos, alpacas o llamas por técnicas de inmunización convencionales (Véase, por ejemplo, Muyldermans et al., *TIBS* 26:230-235, 2001; Yau et al., *J Immunol Methods* 281:161-75, 2003; Maass et al., *J Immunol Methods* 324:13-25, 2007). Los VHH pueden tener una capacidad de unión al antígeno potente y pueden interactuar con nuevos epítopos que son inaccesibles a las parejas VH-VL convencionales. (Muyldermans et al., 2001). La IgG de suero de alpaca contiene aproximadamente 50% de anticuerpos de IgG de solo cadena pesada de camélido (HCAbs) (Maass et al., 2007). Las alpacas se pueden inmunizar con antígenos conocidos, tales como TNF- α , y se pueden aislar VHH que se unen y neutralizan el antígeno diana (Maass et al., 2007). Los cebadores de la PCR que amplifican prácticamente todas las secuencias codificantes de VHH de alpaca se han identificado y se pueden usar para construir bibliotecas de presentación en fagos de VHH de alpaca, que se pueden usar para el aislamiento de fragmentos de anticuerpo por técnicas de bioselección por pasos convencionales bien conocidas en la técnica (Maass et al., 2007). En algunas realizaciones, se pueden usar fragmentos de anticuerpo VHH anticáncer pancreático en las composiciones y métodos reivindicados.

Cualquier fragmento de anticuerpo se puede preparar por hidrólisis proteolítica del anticuerpo de longitud entera o por expresión en *E. coli* o en otro hospedante, del ADN que codifica el fragmento. Se puede obtener un fragmento de anticuerpo por digestión con pepsina o papaína de anticuerpos de longitud entera por métodos convencionales. Estos métodos los describe, por ejemplo, Goldenberg, patentes de EE.UU. n° 4.036.945 y 4.331.647 y referencias que contienen las mismas. Véase también Nisonoff et al., *Arch Biochem. Biophys.* 89: 230 (1960); Porter, *Biochem.*

J. 73: 119 (1959), Edelman et al., en METHODS IN ENZYMOLOGY VOL. 1, página 422 (Academic Press 1967), y Coligan en páginas 2.8.1-2.8.10 y 2.10.-2.10.4.

Alotipos de anticuerpos

5 La inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos está asociada con el riesgo creciente de reacciones de infusión y menor duración de la respuesta terapéutica (Baert et al., 2003, *N Engl J Med* 348:602-08). La extensión en la que los anticuerpos terapéuticos inducen una respuesta inmunitaria en el hospedante se puede determinar en parte por el alotipo del anticuerpo (Stickler et al., 2011, *Genes and Immunity* 12:213-21). El alotipo de anticuerpo está relacionado con variaciones de la secuencia de aminoácidos en sitios específicos en las secuencias de la región constante del anticuerpo. Los alotipos de los anticuerpos de IgG que contienen una región constante de tipo cadena pesada y se designan como alotipos Gm (1976, *J Immunol* 117:1056-59).

10 Para los anticuerpos IgG1 humanos comunes, el alotipo más prevalente es G1m1 (Stickler et al., 2011, *Genes and Immunity* 12:213-21). Sin embargo, el alotipo G1m3 también se encuentra con frecuencia en caucasianos (Stickler et al., 2011). Se ha descrito que los anticuerpos G1m1 contienen secuencias alotípicas que tienden a inducir una respuesta inmunitaria cuando se administran a receptores no G1m1 (nG1m1), tales como pacientes con G1m3 (Stickler et al., 2011). Los anticuerpos de alotipo no G1m1 no son inmunógenos cuando se administran a pacientes con G1m1 (Stickler et al., 2011).

20 El alotipo G1m1 humano comprende los aminoácidos ácido aspártico en la posición de Kabat 356 y leucina en la posición de Kabat 358 en la secuencia de CH3 de la cadena pesada IgG1. El alotipo nG1m1 comprende los aminoácidos ácido glutámico en la posición de Kabat 356 y metionina en la posición de Kabat 358. Tanto el alotipo G1m1 como nG1m1 comprenden un resto de ácido glutámico en la posición de Kabat 357 y los alotipos se denominan a veces como alotipos DEL y EEM. Un ejemplo no limitante de las secuencias de la región constante de la cadena pesada para los anticuerpos de alotipo G1m1 y nG1m1 se muestra para los anticuerpos de ejemplo rituximab (SEQ ID NO: 85) y veltuzumab (SEQ ID NO: 86).

Secuencia de la región variable de la cadena pesada de rituximab (SEQ ID NO: 85)

25 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKAEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Región variable de la cadena pesada de veltuzumab (SEQ ID NO: 86)

30 ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL
 QSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVPEPKSCDKTHTCPPCPAP
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKT
 KPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
 QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGDS
 FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

35 Jefferis y Lefranc (2009, mAbs 1:1-7) revisaron las variaciones de secuencia características de los alotipos de IgG y su efecto en la inmunogenicidad. Describieron que el alotipo G1m3 se caracteriza por un resto de arginina en la posición de Kabat 214, comparado con un resto de lisina en la posición de Kabat 214 en el alotipo G1m17. El alotipo nG1m1,2 se caracterizaba por ácido glutámico en la posición de Kabat 356, metionina en la posición de Kabat 358 y alanina en la posición de Kabat 431. El alotipo G1m1,2 se caracterizaba por ácido aspártico en la posición de Kabat 356, leucina en la posición de Kabat 358 y glicina en la posición de Kabat 431. Además de las variantes de secuencia de la región constante de la cadena pesada, Jefferis y Lefranc (2009) describieron variantes de alotipo en la región constante de la cadena ligera kappa con el alotipo Km1 caracterizado por valina en la posición de Kabat 153 y leucina en la posición de Kabat 191, el alotipo Km1,2 por alanina en la posición de Kabat 153 y leucina en la posición de Kabat 191, y el alotipo Km3 se caracterizaba por alanina en la posición de Kabat 153 y valina en la posición de Kabat 191.

Con respecto a los anticuerpos terapéuticos, veltuzumab y rituximab son, respectivamente anticuerpos IgG1 humanizado y quimérico contra CD20, útiles para terapia de una amplia variedad de tumores malignos hematológicos y/o enfermedades autoinmunitarias. La tabla 1 compara las secuencias de alotipo de rituximab frente a veltuzumab. Como se muestra en la tabla 1, rituximab (G1m17,1) es un alotipo DEL IgG1, con una variación de secuencia adicional en la posición de Kabat 214 (cadena pesada CH1) de lisina en rituximab frente a arginina en veltuzumab. Se ha descrito que veltuzumab es menos inmunógeno en sujetos que rituximab (véase, p. ej., Morchhauser et al., 2009, *J Clin Oncol* 27:3346-53; Goldenberg et al., 2009, *Blood* 113:1062-70; Robak & Robak, 2011, *BioDrugs* 25:13-25), un efecto que se ha atribuido a la diferencia entre anticuerpos humanizados y quiméricos. Sin embargo, la diferencia en alotipos entre los alotipos EEM y DEL probablemente también explica la menor inmunogenicidad de veltuzumab.

Tabla 1. Alotipos de rituximab frente a veltuzumab

	Alotipo completo	Posición en la cadena pesada y alotipos asociados					
		214 (alotipo)		356/358 (alotipo)		431 (alotipo)	
Rituximab	G1m17,1	K	17	D/L	1	A	-
Veltuzumab	G1m3	R	3	E/M	-	A	-

Con el fin de reducir la inmunogenicidad de anticuerpos terapéuticos en individuos de genotipo nG1m1, es conveniente seleccionar el alotipo del anticuerpo para que se corresponda con el alotipo G1m3, caracterizado por arginina en la posición de Kabat 214, y el alotipo nulo mG1m1,2, caracterizado por ácido glutámico en la posición de Kabat 356, metionina en la posición de Kabat 358 y alanina en la posición de Kabat 431. Sorprendentemente, se encontró que la administración subcutánea repetida de anticuerpos G1m3 a lo largo de un periodo de tiempo prolongado no daba como resultado una respuesta inmunitaria significativa. En realizaciones alternativas, la cadena pesada de IgG4 humana en común con el alotipo G1m3 tiene arginina en Kabat 214, ácido glutámico en Kabat 356, metionina en Kabat 359 y alanina en Kabat 431. Puesto que parece que la inmunogenicidad está relacionada al menos en parte con los restos en estas posiciones, el uso de la región constante de la cadena pesada de IgG4 humana para anticuerpos terapéuticos también es una realización preferida. Las combinaciones de anticuerpos G1m3 IgG1 con anticuerpos IgG4 también puede ser útil para la administración terapéutica.

Anticuerpos conocidos

En diferentes realizaciones, los métodos y composiciones reivindicados pueden usar cualquiera de una variedad de anticuerpos conocidos en la técnica. Los anticuerpos útiles se pueden obtener comercialmente de una serie de fuentes conocidas. Por ejemplo, está disponible una variedad de líneas de hibridoma que secretan anticuerpos en la American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA). Se ha depositado un gran número de anticuerpos contra diferentes dianas de enfermedades, que incluyen, pero no se limitan a antígenos asociados con tumores, en la ATCC y/o se han publicado secuencias de regiones variables y están disponibles para usar en los métodos y composiciones reivindicados. Véase, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 7.312.318; 7.282.567; 7.151.164; 7.074.403; 7.060.802; 7.056.509; 7.049.060; 7.045.132; 7.041.803; 7.041.802; 7.041.293; 7.038.018; 7.037.498; 7.012.133; 7.001.598; 6.998.468; 6.994.976; 6.994.852; 6.989.241; 6.974.863; 6.965.018; 6.964.854; 6.962.981; 6.962.813; 6.956.107; 6.951.924; 6.949.244; 6.946.129; 6.943.020; 6.939.547; 6.921.645; 6.921.645; 6.921.533; 6.919.433; 6.919.078; 6.916.475; 6.905.681; 6.899.879; 6.893.625; 6.887.468; 6.887.466; 6.884.594; 6.881.405; 6.878.812; 6.875.580; 6.872.568; 6.867.006; 6.864.062; 6.861.511; 6.861.227; 6.861.226; 6.838.282; 6.835.549; 6.835.370; 6.824.780; 6.824.778; 6.812.206; 6.793.924; 6.783.758; 6.770.450; 6.767.711; 6.764.688; 6.764.681; 6.764.679; 6.743.898; 6.733.981; 6.730.307; 6.720.155; 6.716.966; 6.709.653; 6.693.176; 6.692.908; 6.689.607; 6.689.362; 6.689.355; 6.682.737; 6.682.736; 6.682.734; 6.673.344; 6.653.104; 6.652.852; 6.635.482; 6.630.144; 6.610.833; 6.610.294; 6.605.441; 6.605.279; 6.596.852; 6.592.868; 6.576.745; 6.572.856; 6.566.076; 6.562.618; 6.545.130; 6.544.749; 6.534.058; 6.528.625; 6.528.269; 6.521.227; 6.518.404; 6.511.665; 6.491.915; 6.488.930; 6.482.598; 6.482.408; 6.479.247; 6.468.531; 6.468.529; 6.465.173; 6.461.823; 6.458.356; 6.455.044; 6.455.040; 6.451.310; 6.444.206; 6.441.143; 6.432.404; 6.432.402; 6.419.928; 6.413.726; 6.406.694; 6.403.770; 6.403.091; 6.395.276; 6.395.274; 6.387.350; 6.383.759; 6.383.484; 6.376.654; 6.372.215; 6.359.126; 6.355.481; 6.355.444; 6.355.245; 6.355.244; 6.346.246; 6.344.198; 6.340.571; 6.340.459; 6.331.175; 6.306.393; 6.254.868; 6.187.287; 6.183.744; 6.129.914; 6.120.767; 6.096.289; 6.077.499; 5.922.302; 5.874.540; 5.814.440; 5.798.229; 5.789.554; 5.776.456; 5.736.119; 5.716.595; 5.677.136; 5.587.459; 5.443.953. 5.525.338. Estos son solo de ejemplo, y se conoce en la técnica una amplia variedad de otros anticuerpos y sus hibridomas. El experto en la técnica comprenderá que las secuencias de anticuerpos o hibridomas que segregan anticuerpos contra prácticamente cualquier antígeno asociado a enfermedad se pueden obtener mediante una búsqueda sencilla de las bases de datos de ATCC, NCBI y/o USPTO para anticuerpos contra una diana asociada con enfermedad seleccionada de interés. Los dominios de unión al antígeno de los anticuerpos clonados se pueden amplificar, cortar, ligar en un vector de expresión, transfectar en una célula hospedante adaptada y usar para la producción de proteínas, usando técnicas convencionales bien conocidas en la técnica (véanse, p. ej., las patentes de EE.UU. nº 7.531.327; 7.537.930;

7.608.425 y 7.785.880).

Los anticuerpos particulares que se pueden usar para la terapia del cáncer dentro del alcance de los métodos y composiciones reivindicados incluyen, pero no se limitan a LL1 (anti-CD74), LL2 y RFB4 (anti-CD22), RS7 (anti-glucoproteína epitelial-1 (EGP-I)), PAM4 y KC4 (ambos anti-mucina), MN-14 (anti-antígeno carcinoembrionario (CEA, también conocido como CD66e), Mu-9 (anti-antígeno específico de colon -p), Immu 31 (una anti-alfa-fetoproteína), TAG-72 (p. ej., CC49), Tn, J591 o HuJ591 (anti-PSMA (antígeno de membrana específico de próstata)), AB-PG1-XG1-026 (anti-dímero de PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX), hL243 (anti-HLA-DR), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetan (anti-CD20); panitumumab (anti-EGFR); rituximab (anti-CD20); tositumomab (anti-CD20); GA101 (anti-CD20); y trastuzumab (anti-ErbB2). Dichos anticuerpos son conocidos en la técnica (p. ej., patentes de EE.UU. n° 5.686.072; 5.874.540; 6.107.090; 6.183.744; 6.306.393; 6.653.104; 6.730.300; 6.899.864; 6.926.893; 6.962.702; 7.074.403; 7.230.084; 7.238.785; 7.238.786; 7.256.004; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.585.491; 7.612.180; 7.642.239; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. n° 20040202666 (ahora abandonada); 20050271671; y 20060193865). Los anticuerpos específicos conocidos útiles incluyen hPAM4 (patente de EE.UU. n° 7.282.567), hA20 (patente de EE.UU. n° 7.251.164), hA19 (patente de EE.UU. n° 7.109.304), hIMMU31 (patente de EE.UU. n° 7.300.655), hLL1 (patente de EE.UU. n° 7.312.318.), hLL2 (patente de EE.UU. n° 7.074.403), hMu-9 (patente de EE.UU. n° 7.387.773), hL243 (patente de EE.UU. n° 7.612.180), hMN-14 (patente de EE.UU. n° 6.676.924), hMN-15 (patente de EE.UU. n° 7.541.440), hR1 (solicitud de patente de EE.UU. 12/772.645), hRS7 (patente de EE.UU. n° 7.238.785), hMN-3 (patente de EE.UU. n° 7.541.440), AB-PG1-XG1-026 (solicitud de patente de EE.UU. 11/983.372, depositada como ATCC PTA-4405 y PTA-4406) y D2/B (WO 2009/130575).

Los anticuerpos anti-TNF- α son conocidos en la técnica y pueden ser útiles para tratar enfermedades inmunitarias, tales como enfermedad autoinmunitaria, disfunción inmunitaria (p. ej., enfermedad de injerto contra huésped, rechazo de trasplante de órganos) o diabetes. Los anticuerpos conocidos contra el TNF- α incluyen el anticuerpo humano CDP571 (Ofei et al., 2011, *Diabetes* 45:881-85); anticuerpos murinos MTNFAl, M2TNFAl, M3TNFAl, M302B y M303 (Thermo Scientific, Rockford, IL); infliximab (Centocor, Malvern, PA); certolizumab pegol (UCB, Brussels, Bélgica); y adalimumab (Abbott, Abbott Park, IL). Se pueden usar estos y muchos otros anticuerpos anti-TNF- α conocidos en los métodos y composiciones reivindicados. Otros anticuerpos útiles para terapia de desregulación inmunitaria o enfermedad autoinmunitaria incluyen, pero no se limitan a anticuerpos anti-linfocitos B tales como veltuzumab, epratuzumab, milatuzumab o hL243; tocilizumab (anti-receptor de IL-6); basiliximab (anti-CD25); daclizumab (anti-CD25); efalizumab (anti-CD11a); muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3); anti-CD40L (UCB, Brussels, Bélgica); natalizumab (anti-integrina α 4) y omalizumab (anti-IgE).

La diabetes de tipo 1 y tipo 2 se pueden tratar usando anticuerpos conocidos contra antígenos de linfocitos B, tales como CD22 (epratuzumab), CD74 (milatuzumab), CD 19 (hA19), CD20 (veltuzumab) o HLA-DR (hL243) (véase, p. ej., Winer et al., 2011, *Nature Med* 17:610-18). Los anticuerpos anti-CD3 también se han propuesto para terapia de la diabetes de tipo 1 (Cemea et al., 2010, *Diabetes Metab Rev* 26:602-05).

El factor inhibidor de la migración de macrófagos (MIF) es un regulador importante de la inmunidad innata y adaptativa y apoptosis. Se ha descrito que CD74 es el receptor endógeno para MIF (Leng et al., 2003, *J Exp Med* 197:1467-76). El efecto terapéutico de anticuerpos anti-CD74 antagonistas en rutas intracelulares mediadas por MIF se puede usar para el tratamiento de una amplia variedad de estados patológicos, tales como cánceres de vejiga, próstata, mama, pulmón, colon y leucemia linfocítica crónica (p. ej., Meyer-Siegler et al., 2004, *BMC Cancer* 12:34; Shachar & Haran, 2011, *Leuk Lymphoma* 52:1446-54); enfermedades autoinmunitarias tales como artritis reumatoide y lupus eritematoso sistémico (Morand y Leech, 2005, *Front Biosci* 10:12-22; Shachar y Haran, 2011, *Leuk Lymphoma* 52:1446-54); enfermedades renales tales como rechazo de aloinjerto renal (Lan, 2008, *Nephron Exp Nephrol.* 109:e79-83); y numerosas enfermedades inflamatorias (Meyer-Siegler et al., 2009, *Mediators Inflamm* epub 22 de marzo, 2009; Takahashi et al., 2009, *Respir Res* 10:33; Milatuzumab (hLL1) es un ejemplo de anticuerpo anti-CD74 de uso terapéutico para el tratamiento de enfermedades mediadas por MIF.

El sistema del complemento es una cascada compleja que implica la escisión proteolítica de glucoproteínas del suero a menudo activadas por receptores celulares. La "cascada del complemento" es constitutiva y no específica pero debe ser activada con el fin de funcionar. La activación del complemento da como resultado una secuencia unidireccional de reacciones enzimáticas y bioquímicas. En esta cascada, una proteína del complemento específica, C5, forma dos subproductos inflamatorios, muy activos, C5a y C5b, que activan conjuntamente los glóbulos blancos. Esto a su vez produce una serie de subproductos inflamatorios, que incluyen citoquinas dañinas, enzimas inflamatorias y moléculas de adhesión celular. Juntos, estos subproductos pueden conducir a la destrucción de tejido visto en muchas enfermedades inflamatorias. Esta cascada finalmente da como resultado la inducción de respuesta inflamatoria, quimiotaxis de fagocitos y opsonización, y lisis celular.

El sistema del complemento puede ser activado por dos rutas distintas, la ruta clásica y la ruta alternativa. La mayoría de los componentes del complemento están numerados (p. ej., C1, C2, C3, etc.) pero algunos se denominan "Factores". Algunos de los componentes deben ser escindidos enzimáticamente para activar sus funciones; otros simplemente se combinan para formar complejos que son activos. Los componentes activos de la ruta clásica incluyen C1q, C1r, C1s, C2a, C2b, C3a, C3b, C4a y C4b. Los componentes activos de la ruta alternativa incluyen C3a, C3b, Factor B, Factor Ba, Factor Bb, Factor D, y properdina. La última etapa de cada ruta es la misma

e implica al conjunto de componentes en un complejo ataque de membrana. Los componentes activos del complejo de ataque de membrana incluyen C5a, C5b, C6, C7, C8 y C9n.

Aunque cualquiera de estos componentes del sistema del complemento puede ser el objetivo de un complejo de anticuerpos, algunos de los componentes del complemento son preferidos. C3a, C4a y C5a hacen que los mastocitos liberen factores quimiotácticos tales como histamina y serotonina, que atraen fagocitos, anticuerpos y complemento, etc. Estos forman un grupo de objetivos preferidos. Otro grupo de objetivos preferidos incluyen C3b, C4b y C5b, que potencian la fagocitosis de células extrañas. Otro grupo preferido de objetivos son los componentes predecesores de estos dos grupos, es decir, C3, C4 y C5. C5b, C6, C7, C8 y C9 inducen la lisis de células extrañas (complejo de ataque de membrana) y forman todavía otro grupo preferido de objetivos.

C5a del complemento, como C3a, es una anafilatoxina. Media la inflamación y es un atractor quimiotáctico para la inducción de la liberación neutrófila de proteasas antimicrobianas y radicales del oxígeno. Por lo tanto, C5a y su predecesor C5 son objetivos particularmente preferidos. Dirigiéndose a C5, no solo se afecta a C5a, sino también a C5b, que inicia el ensamblaje del complejo de ataque de membrana. Por lo tanto, C5 es otro objetivo preferido. C3b, y su predecesor C3, también son objetivos preferidos, ya que tanto la ruta del complemento clásica como la alternativa dependen de C3b. Tres proteínas afectan a los niveles de este factor, el inhibidor C1, proteína H y factor I, y estos son también objetivos preferidos de acuerdo con la invención. Las proteínas reguladoras del complemento, tales como CD46, CD55 y CD59, pueden ser objetivos a los que se unen los complejos de anticuerpo.

Los factores de coagulación también son objetivos preferidos, en particular el factor tisular y la trombina. El factor tisular se conoce también como tromboplastina tisular, CD142, factor de coagulación III o factor III. El factor tisular es una glucoproteína receptor de membrana integral y un miembro de la superfamilia de receptores de citoquinas. El dominio extracelular de unión al ligando del factor tisular consiste en dos módulos estructurales o con la clasificación del factor tisular como un miembro de receptores de citoquinas de tipo 2. El factor tisular está implicado en la cascada de proteasas de coagulación de la sangre e inicia las cascadas de coagulación de la sangre tanto extrínseca como intrínseca, formando complejos de alta afinidad entre el dominio extracelular de factor tisular y los factores de coagulación de la sangre que circula, serina proteasas factor VII o factor VIIa. Estos complejos enzimáticamente activos activan entonces el factor IX y factor X, conduciendo a la generación de trombina y formación de coágulo.

El factor tisular es expresado por varios tipos de células, que incluyen monocitos, macrófagos y células endoteliales vasculares, y es inducido por IL-1, TNF- α o lipopolisacáridos bacterianos. La proteína quinasa C está implicada en la activación de citoquinas de la expresión de factor tisular de células endoteliales. La inducción de factor tisular por endotoxinas y citoquinas es un mecanismo importante para el inicio de la coagulación intravascular diseminada vista en pacientes con septicemia por Gram negativo. El factor tisular también parece que está implicado en una variedad de funciones no hemostáticas que incluyen inflamación, cáncer, función cerebral, respuesta inmunitaria y angiogénesis asociada a tumor. Por lo tanto, los complejos de anticuerpos que se dirigen al factor tisular son útiles no solo en el tratamiento de coagulopatías, sino también en el tratamiento de septicemia, cáncer, angiogénesis patológica, y otras enfermedades desreguladoras inflamatorias de acuerdo con la invención. Se sugiere una interacción compleja entre la ruta de coagulación y la red de citoquinas por la capacidad de varias citoquinas para influir en la expresión del factor tisular en una variedad de células y por los efectos de la unión del ligando al receptor. La unión del ligando (factor VIIa) se ha descrito que da una señal de calcio intracelular, indicando así que el factor tisular es un receptor verdadero.

La trombina es la forma activada del factor de coagulación II (protrombina); convierte el fibrinógeno en fibrina. La trombina es una potente quimiotaxina para macrófagos, y puede alterar su producción de citoquinas y metabolitos del ácido araquidónico. Es particularmente importante en las coagulopatías que acompañan la septicemia. Numerosos estudios han documentado la activación del sistema de coagulación sea en pacientes septicémicos o después de administración de LPS en modelos animales. A pesar de más de treinta años de investigación, los mecanismos de toxicidad hepática inducida por LPS todavía se entienden mal. Ahora está claro que implican una serie compleja y secuencial de interacciones entre mediadores celulares y humorales. En el mismo periodo de tiempo, la septicemia sistémica por organismos Gram negativos y sus secuelas se han convertido en un problema de salud importante, y los intentos de usar anticuerpos monoclonales dirigidos contra LPS o diferentes mediadores inflamatorios han dado solo fracasos terapéuticos. Los complejos de anticuerpos que se dirigen tanto a la trombina como a al menos a otro objetivo tratan los fracasos clínicos en el tratamiento de la septicemia.

En otras realizaciones, los complejos de anticuerpos se unen a MHC de clase I, MHC de clase II o moléculas auxiliares, tales como CD40, CD54, CD80 o CD86. El complejo de anticuerpo también se puede unir a una citoquina de activación de linfocitos T, o a un mediador de citoquinas, tal como NF- κ B.

En algunas realizaciones, uno de los dos objetivos diferentes puede ser el receptor celular de cáncer o antígeno asociado al cáncer, en particular uno que se selecciona del grupo que consiste en antígenos de linaje de linfocitos B (CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, etc.), VEGF, VEGFR, EGFR, antígeno carcinoembrionario (CEA), factor de crecimiento placentario (P1GF), tenascina, HER-2/*new*, EGP-1, EGP-2, CD25, CD30, CD33, CD38, CD40, CD45, CD52, CD74, CD80, CD138, NCA66, CEACAM1, CEACAM6 molécula de adhesión celular relacionada con antígeno carcinoembrionario 6), MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC16, IL-6, α -fetoproteína (AFP), A3, CA125, antígeno p

específico de colon (CSAp), receptor de folato, HLA-DR, gonadotropina coriónica humana (HCG), la, EL-2, factor de crecimiento similar a insulina (IGF) y receptor de IGF, KS-1, Le(y), MAGE, antígenos de necrosis, PAM-4, fosfatasa ácida prostática (PAP), Pr1, antígeno específico de próstata (PSA), antígeno de membrana específico de próstata (PSMA), S100, T101, TAC, TAG72, receptores TRAIL, y anhidrasa carbónica IX.

5 Los objetivos asociados con la septicemia y la desregulación inmunitaria y otros trastornos inmunitarios incluyen MIF, IL-1, IL-6, IL-8, CD74, CD83, y C5aR. Se ha encontrado que anticuerpos e inhibidores contra C5aR mejoran la supervivencia en roedores con septicemia (Huber-Lang et al., *FASEB J.* 72002; 16:1567-1574; Riedemann et al., *J Clin Invest* 2002; 110:101-108) y choque séptico y síndrome de dificultad respiratoria en el adulto en monos (Hangen et al., *J Surg Res* 1989; 46:195-199; Stevens et al., *J Clin Invest* 1986; 77:1812-1816). Por lo tanto, para la
10 septicemia uno de los dos objetivos diferentes preferiblemente es un objetivo que está asociado con la infección, tal como LPS/C5a. Otros objetivos preferidos incluyen HMGB-1, factor tisular, CD14, VEGF e IL-6, cada uno de los cuales está asociado con la septicemia o choque séptico. Los complejos de anticuerpos preferidos son aquellos que se dirigen a dos o más objetivos de HMGB-1, factor tisular y MIF, tal como MIF/factor tisular, y HMGB-1/factor tisular.

15 En otras realizaciones más, uno de los objetivos diferentes puede ser un objetivo que está asociado con la enfermedad de injerto contra huésped o rechazo de trasplante, tal como MIF (Lo et al., *Bone Marrow Transplant*, 30(6):375-80 (2002)). Uno de los diferentes objetivos también puede ser uno asociado con el síndrome de dificultad respiratoria agudo, tal como IL-8 (Bouros et al., *PMC Pulm Med*, 4(1):6 (2004), aterosclerosis o reestenosis, tal como MIF (Chen et al., *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 24(4):709-14 (2004), asma, tal como IL-18 (Hata et al., *Int Immunol*, Oct. 11, 2004, Epub ya disponible), una enfermedad granulomatosa, tal como TNF- α (Ulbricht et al., *Arthritis Rheum*, 50(8):2717-8 (2004), una neuropatía, tal como EPO carbamylada (eritropoyetina) (Leist et al., *Science* 305(5681):164-5 (2004), o caquexia, tal como IL-6 y TNF- α .

20 Otros objetivos incluyen C5a, LPS, IFN-gamma, B7; CD2, CD4, CD14, CD18, CD11a, CD11b, CD11c, CD 14, CD18, CD27, CD29, CD38, CD40L, CD52, CD64, CD83, CD147, CD154. La activación de células mononucleares por determinados antígenos microbianos, incluyendo LPS, puede ser inhibida en cierta medida por anticuerpos contra
25 CD18, CD11b o CD11c, que implica por lo tanto a las integrinas P2 (Cuzzola et al., *J Immunol* 2000; 164:5871-5876; Medvedev et al., *J Immunol* 1998; 160: 4535-4542). Se ha encontrado que CD83 tiene una función en la arteritis de células gigantes (GCA), que es una vasculitis sistémica que afecta a arterias de tamaño medio y grande, predominantemente a las ramas extracraneales del arco aórtico y de la propia aorta, dando como resultado la estenosis vascular y posterior isquemia tisular, y las graves complicaciones de ceguera, accidente cerebrovascular y síndrome del arco aórtico (Weyand y Goronzy, *N Engl J Med* 2003; 349:160-169; Hunder y Valente, En: "Inflammatory Diseases of Blood Vessels". G.S. Hoffman and C.M. Weyand, eds, Marcel Dekker, New York, 2002; 255-265). Se encontró que los anticuerpos contra CD83 anulaban la vasculitis en un modelo de ratón de la GCA humana GCA (Ma-Krupa et al., *J Exp Med* 2004; 199:173-183), sugiriendo a estos investigadores que las células dendríticas, que expresan CD83 cuando son activadas, son células de procesamiento de antígeno críticas en la
35 GCA. En estos estudios, usaron un MAb anti-CD38 de ratón (clon de IgG1 HB15e de Research Diagnostics). CD154, un miembro de la familia de TNF, es expresado en la superficie de linfocitos T CD4 positivos, y se ha descrito que un anticuerpo monoclonal humanizado contra CD154 producía un beneficio significativo en pacientes con lupus eritematoso sistémico activo (SLE) (Grammar et al., *J Clin Invest* 2003; 112:1506-1520). También sugiere que este anticuerpo debe ser útil en otras enfermedades autoinmunitarias (Kelsoe, *J Clin Invest* 2003; 112:1480-1482). Realmente, también se ha descrito que este anticuerpo era eficaz en pacientes con púrpura trombocitopénica inmunitaria refractaria (Kuwana et al., *Blood* 2004; 103:1229-1236).

40 En la artritis reumatoide, ha mostrado actividad un antagonista del receptor de interleuquina 1 recombinante, IL-1Ra o anakinra (Cohen et al., *Ann Rheum Dis* 2004; 63:1062-8; Cohen, *Rheum Dis Clin North Am* 2004; 30:365-80). Una mejora en el tratamiento de estos pacientes, que hasta ahora requería el tratamiento concomitante con metotrexato, es combinar la anakinra con una o más de las citoquinas efectoras proinflamatorias o quimioquinas efectoras proinflamatorias (citadas antes). De hecho, en una revisión de la terapia con anticuerpos para la artritis reumatoide, Taylor (*Curr Opin Pharmacol* 2003; 3:323-328) sugiere que además de anticuerpos contra TNF, son útiles otros
45 contra dichas citoquinas tales como IL-1, IL-6, IL-8, IL-15, IL-17 e IL-18.

50 La composición farmacéutica de la presente invención se puede usar para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad metabólica, tal como amiloidosis, o una enfermedad neurodegenerativa, tal como la enfermedad de Alzheimer. El bapineuzumab está en ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Alzheimer. Otros anticuerpos propuestos para el tratamiento para la enfermedad de Alzheimer incluyen Alz 50 (Ksiezak-Reding et al., 1987, *J Biol Chem* 263:7943-47), gantenerumab, y solanezumab. Se ha descrito que infliximab, un anticuerpo anti-TNF- α , reduce las placas de amiloide y mejora la cognición.

55 En una realización preferida, las enfermedades que se pueden tratar usando la invención como se define en las reivindicaciones, incluyen enfermedades cardiovasculares, tales como coágulos de fibrina, aterosclerosis, isquemia miocárdica e infarto. Los anticuerpos contra la fibrina (p. ej., scFv(59D8); T2G1s; MH1) son conocidos y en ensayos clínicos como agente para la formación de imágenes para describir dichos coágulos y embolias pulmonares, mientras que los anticuerpos antigranulocitos, tales como anticuerpos MN-3, MN-15, anti-NCA95, y anti-CD15,
60 pueden dirigirse a infartos de miocardio e isquemia miocárdica (Véase, p. ej., Patente de EE.UU. n.º 5.487.892; 5.632.968; 6.294.173; 7.541.440). Los anticuerpos antimacrófagos, anti-lipoproteína de baja densidad (LDL), anti-

MIF y anti-CD74 (p. ej., hLL1) se pueden usar para dirigirse a placas ateroscleróticas. El abciximab (anti-glicoproteína IIb/IIIa) se ha aprobado para uso adyuvante para la prevención de la reestenosis en las intervenciones coronarias percutáneas y en el tratamiento de la angina inestable (Waldmann et al., 2000, *Hematol* 1:394-408). Se ha descrito que los anticuerpos anti-CD3 reducen el desarrollo y progreso de la aterosclerosis (Steffens et al., 2006, *Circulation* 114:1977-84). Los anticuerpos contra LDL oxidadas inducen una regresión de la aterosclerosis establecida en un modelo de ratón (Ginsberg, 2007, *J Am Coll Cardiol* 52:2319-21). Se mostró que el anticuerpo anti-ICAM-1 reducía el daño celular isquémico después de oclusión arterial cerebral en ratas (Zhang et al., 1994, *Neurology* 44:1747-51). Los anticuerpos monoclonales disponibles en el mercado contra antígenos de leucocitos están representados por: anticuerpos monoclonales anti-células T OKT (disponibles en Ortho Pharmaceutical Company) que se unen a linfocitos T normales; los anticuerpos monoclonales producidos por los hibridomas que tienen los números de acceso en ATCC HB44, HB55, HB12, HB78 y HB2; G7E11, W8E7, NKP15 y G022 (Becton Dickinson); NEN9.4 (New England Nuclear); y FMC11 (Sera Labs). Se encuentra una descripción de anticuerpos contra antígenos de fibrina y plaquetas en Knight, *Semin. Nucl. Med.*, 20:52-67 (1990).

Otros anticuerpos que se pueden usar incluyen anticuerpos contra agentes de enfermedades infecciosas, tales como bacterias, virus, micoplasmas u otros patógenos. Muchos anticuerpos contra dichos agentes infecciosos son conocidos en la técnica y se puede usar cualquiera de dichos anticuerpos conocidos en los métodos y composiciones reivindicados. Por ejemplo, se conocen anticuerpos contra el antígeno de la glicoproteína gp120 del virus de inmunodeficiencia humana I (VIH-1), y algunos de dichos anticuerpos pueden tener una función inmunoprotectora en seres humanos. Véase, p. ej., Rossi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 86:8055-8058, 1990. Los anticuerpos anti-VIH conocidos incluyen el anticuerpo anti-envuelta descrito por Johansson et al. (*AIDS*. 2006 Oct 3;20(15): 1911-5), así como los anticuerpos anti-VIH descritos y vendidos por Polymun (Viena, Austria), descritos también en la patente de EE.UU. 5.831.034, patente de EE.UU. 5.911.989, y Vcelar et al., *AIDS* 2007; 21(16):2161-2170 y Joos et al., *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006; 50(5): 1773-9.

Los anticuerpos contra parásitos de la malaria se pueden dirigir contra las etapas de esporozoito, merozoito, esquizonte y gametocito. Se han generado anticuerpos monoclonales contra esporozoitos (antígeno cirumesporozoito), y se ha mostrado que neutralizan esporozoitos in vitro y en roedores (N. Yoshida et al., *Science* 207:71-73, 1980). Varios grupos han desarrollado anticuerpos contra *T. gondii*, el parásito protozoario implicado en la toxoplasmosis (Kasper et al., *J. Immunol.* 129:1694-1699, 1982; Id., 30:2407-2412, 1983). Se han desarrollado anticuerpos contra antígenos de superficie esquistosomular y se ha encontrado que actúan contra esquistosomas in vivo e in vitro (Simpson et al., *Parasitology*, 83:163-177, 1981; Smith et al., *Parasitology*, 84:83-91, 1982; Gryzch et al., *J. Immunol.*, 129:2739-2743, 1982; Zodda et al., *J. Immunol.* 129:2326-2328, 1982; Dissous et al., *J. immunol.*, 129:2232-2234, 1982).

Trypanosoma cruzi es el agente causante de la enfermedad de Chagas, y es transmitido por insectos reduviidae chupadores de sangre. Se ha generado un anticuerpo que inhibe específicamente la diferenciación de una forma del parásito a otra (de etapa de epimastigote a tripomastigote) in vitro, y que reacciona con una glucoproteína de la superficie celular; sin embargo, el antígeno está ausente de las formas del parásito en el mamífero (torrente sanguíneo) (Sher et al., *Nature*, 300:639-640, 1982).

Se conocen en la técnica anticuerpos antifúngicos, tales como anticuerpo antiesclerotina (patente de EE.UU. 7.910.702); anticuerpo antiglucuronoxilomanano (Zhong y Priofski, 1998, *Clin Diag Lab Immunol* 5:58-64); anticuerpos anticándida (Matthews y Burnie, 2001, 2:472-76); y anticuerpos anti-glucoesfingolípido (Toledo et al., 2010, *BMC Microbiol* 10:47).

Se han desarrollado anticuerpos adecuados contra la mayoría de los microorganismos (bacterias, virus, protozoos, hongos, otros parásitos) responsables de la mayoría de las infecciones en seres humanos, y se pueden haber usado previamente para fines de diagnóstico in vitro. Estos anticuerpos y anticuerpos recientes que se pueden generar por métodos convencionales, son adecuados para usar en la presente invención.

Inmunoconjugados

En algunas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de los mismos se pueden conjugar con uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico. No es necesario que los agentes terapéuticos sean los mismos, sino que pueden ser diferentes, p. ej., un fármaco y un radioisótopo. Por ejemplo, se puede incorporar ¹³¹I en una tirosina de un anticuerpo o proteína de fusión y un fármaco unido a un grupo amino épsilon de un resto de lisina. Los agentes terapéuticos y de diagnóstico se pueden unir, por ejemplo, a grupos SH reducidos y/o cadenas de hidratos de carbono. Se conocen en la técnica muchos métodos para hacer conjugados covalentes o no covalentes de agentes terapéuticos o de diagnóstico con anticuerpos o proteínas de fusión, y se puede usar cualquiera de dichos métodos conocidos.

Un agente terapéutico o de diagnóstico se puede unir a la región bisagra de un componente de anticuerpo reducido por la formación de enlace disulfuro. Alternativamente, dichos agentes se pueden unir usando un reticulador heterobifuncional, tal como *N*-succinil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP). Yu et al., *Int. J. Cancer* 56: 244 (1994). Las técnicas geneales para dicha conjugación son bien conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, Wong, *CHEMISTRY OF PROTEIN CONJUGATION AND CROSS-LINKING* (CRC Press 1991); Upešlacis et al,

"Modification of Antibodies by Chemical Methods," en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRINCIPLES AND APPLICATIONS, Birch et al. (eds.), páginas 187-230 (Wiley-Liss, Inc. 1995); Price, "Production and Characterization of Synthetic Peptide-Derived Antibodies," en MONOCLONAL ANTIBODIES: PRODUCTION, ENGINEERING AND CLINICAL APPLICATION, Ritter et al. (eds.), páginas 60-84 (Cambridge University Press 1995). Alternativamente, el agente terapéutico o de diagnóstico se puede conjugar por un resto hidrato de carbono en la región Fc del anticuerpo. El grupo hidrato de carbono se puede usar para aumentar la carga del mismo agente que está unido a un grupo tiol, o el resto hidrato de carbono se puede usar para unir un agente terapéutico o de diagnóstico diferente.

Los métodos para la conjugación de péptidos a componentes de anticuerpos por un resto hidrato de carbono del anticuerpo, son bien conocidos para los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Shih et al, *Int. J. Cancer* 41: 832 (1988); Shih et al., *Int. J. Cancer* 46: 1101 (1990); y Shih et al, patente de EE.UU. n° 5.057.313. El método general implica hacer reaccionar un componente de anticuerpo que tiene una parte de hidrato de carbono oxidada con un polímero soporte que tiene al menos una función amina libre. Esta reacción da como resultado un enlace de base de Schiff (imina) inicial, que se puede estabilizar por reducción a una amina secundaria para formar el conjugado final.

La región Fc puede estar ausente si el anticuerpo usado como el componente de anticuerpo del inmunocombinado es un fragmento de anticuerpo. Sin embargo, se puede introducir un resto hidrato de carbono en la región variable de la cadena ligera de un anticuerpo de longitud entera o fragmento de anticuerpo. Véase, por ejemplo, Leung et al, *J. Immunol* 154: 5919 (1995); Hansen et al, patente de EE.UU. n° 5.443.953 (1995), Leung et al, patente de EE.UU. n° 6.254.868. El resto de hidrato de carbono modificado se usa para unir el agente terapéutico o de diagnóstico.

En algunas realizaciones, se puede unir un agente quelante a un anticuerpo, fragmento de anticuerpo o proteína de fusión y usar para quelar un agente terapéutico o de diagnóstico, tal como un radionuclido. Los agentes quelantes de ejemplo incluyen, pero no se limitan a DTPA (tal como Mx-DTPA), DOTA, TETA, NETA o NOTA. Los métodos para la conjugación y uso de agentes quelantes para unir metales u otros ligandos a proteínas son bien conocidos en la técnica (Véase, p. ej., patente de EE.UU. n° 7.563.433).

En algunas realizaciones, se pueden unir metales radiactivos o iones paramagnéticos a proteínas o péptidos por reacción con un reactivo que tiene una cola larga, al cual se pueden unir una multiplicidad de grupos quelantes para enlazar iones. Dicha cola puede ser un polímero tal como polilisina, polisacárido u otras cadenas derivatizadas o derivatizables que tienen grupos colgantes a los que se pueden unir grupos quelantes tales como, p. ej., ácido etilendiaminetetraacético (EDTA), ácido dietilentriaminapentaacético (DTPA), porfirinas, poliaminas, éteres corona, bis-tiosemicarbazonas, polioximas, y grupos similares que se sabe que son útiles para este fin.

Los quelatos se pueden unir directamente a anticuerpos o péptidos, por ejemplo, como se describe en la patente de EE.UU. 4.824.659. Las combinaciones de metal-quelato particularmente útiles incluyen 2-bencil-DTPA y sus análogos de monometilo y ciclohexilo, usados con isótopos de diagnóstico en el intervalo de energía general de 60 a 4.000 keV, tales como ¹²⁵I, ¹³¹I, ¹²³I, ¹²⁴I, ⁶²Cu, ⁶⁴Cu, ¹⁸F, ¹¹¹In, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ^{99m}Tc, ^{94m}Tc, ¹¹C, ¹³N, ¹⁵O, ⁷⁶Br, para radioimágenes. Estos mismos quelatos, cuando forman complejos con metales no radiactivos, tales como manganeso, hierro y gadolinio, son útiles para MRI. Los quelatos macrocíclicos tales como NOTA, DOTA y TETA son útiles con una variedad de metales y radiometales, lo más en particular con radionucleidos de galio, itrio y cobre, respectivamente. Dichos complejos de metal-quelato se pueden hacer muy estables diseñando el tamaño del anillo del metal de interés. También están abarcados otros quelatos de tipo anillo tales como poliéteres macrocíclicos, que tienen interés para la unión estable de nucleidos, tales como ²²³Ra para RAIT.

Más recientemente, se han descrito métodos de marcaje con ¹⁸F útiles en técnicas de barrido de PET, por ejemplo, por reacción de F-18 con un metal u otro átomo, tal como aluminio. El conjugado de ¹⁸F-Al puede formar complejo con grupos quelantes, tales como DOTA, NOTA o NETA que se unen directamente a anticuerpos o se usan para marcar construcciones dirigibles en métodos previos al direccionamiento. Dichas técnicas de marcaje con F-18 se describen en la patente de EE.UU. n° 7.563.433.

45 Pre-direccionamiento

En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos se pueden administrar por un método de pre-direccionamiento, que usa complejos de anticuerpos biespecíficos o multispecíficos. En el pre-direccionamiento, el anticuerpo biespecífico o multispecífico comprende al menos un brazo de unión que se une a un antígeno presentado por una célula o tejido objetivo, mientras que al menos otro brazo de unión se une a un hapteno en una construcción dirigible. La construcción dirigible comprende uno o más haptenos y uno o más agentes terapéuticos y/o de diagnóstico.

El pre-direccionamiento es un procedimiento de varias etapas desarrollado originalmente para resolver la lenta eliminación de la sangre de anticuerpos dirigidos directamente, lo cual contribuye a toxicidad indeseable en tejidos normales tales como la médula ósea. Con el pre-direccionamiento, se une un radionucleido u otro agente terapéutico o de diagnóstico a una molécula de suministro pequeña (construcción dirigible) que es eliminada en minutos de la sangre. Se administra primero un anticuerpo biespecífico o multispecífico predirigido, que tiene sitios de unión para la construcción dirigible así como un antígeno diana, se deja que el anticuerpo libre se elimine de la circulación y después se administra la construcción dirigible.

Los métodos de pre-direccionamiento se describen, por ejemplo, en Goodwin et al., patente de EE.UU. nº 4.863.713; Goodwin et al., *J. Nucl. Med.* 29:226, 1988; Hnatowich et al., *J. Nucl. Med.* 28:1294, 1987; Oehr et al., *J. Nucl. Med.* 29:728, 1988; Klivanov et al., *J. Nucl. Med.* 29:1951, 1988; Sinitsyn et al., *J. Nucl. Med.* 30:66, 1989; Kalofonos et al., *J. Nucl. Med.* 31:1791, 1990; Schechter et al., *Int. J. Cancer* 48:167, 1991; Paganelli et al., *Cancer Res.* 51:5960, 1991; Paganelli et al., *Nucl. Med. Commun.* 12:211, 1991; patente de EE.UU. nº 5.256.395; Stickney et al., *Cancer Res.* 51:6650, 1991; Yuan et al., *Cancer Res.* 51:3119, 1991; patentes de EE.UU. nº 6.077.499; 7.011.812; 7.300.644; 7.074.405; 6.962.702; 7.387.772; 7.052.872; 7.138.103; 6.090.381; 6.472.511; 6.962.702; y 6.962.702.

Un método de pre-direccionamiento de tratamiento o diagnóstico de una enfermedad o trastorno en un sujeto se puede proporcionar por: (1) administración al sujeto de un complejo de anticuerpo que comprende un anticuerpo biespecífico o fragmento de anticuerpo; (2) administración opcionalmente al sujeto de una composición de eliminación, y dejar que la composición elimine el anticuerpo de la circulación; y (3) administración al sujeto de una construcción dirigible, que contiene uno o más agentes terapéuticos o de diagnóstico quelados o químicamente unidos.

DOCK-AND-LOCK™ (DNL™)

En realizaciones preferidas, un anticuerpo biespecífico o multiespecífico o un anticuerpo en complejo con uno o más efectores, tales como citoquinas, toxinas, xenoantígenos vehículos ARNip, se forma como un complejo de DOCK-AND-LOCK™ (DNL™) (Véase, p. ej., patentes de EE.UU. nº 7.521.056; 7.527.787; 7.534.866; 7.550.143; 7.666.400; 7.901.680; 7.906.118; 7.981.398; 8.003.111). En general la técnica aprovecha las interacciones de unión específicas y de alta afinidad que se producen entre una secuencia de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD) de subunidades reguladoras (R) de la proteína quinasa dependiente de cAMP (PKA) y una secuencia de dominio de anclaje (AD) derivada de cualquiera de una variedad de proteínas AKAP (Baillie et al., *FEBS Letters.* 2005; 579:3264. Wong y Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004; 5: 959). Los péptidos de DDD y AD se pueden unir a cualquier proteína, péptido u otra molécula. Debido a que las secuencias de DDD dimerizan espontáneamente y se unen a la secuencia de ADN, la técnica permite la formación de complejos entre cualquier molécula seleccionada que se pueda unir a secuencias de DDD o AD.

Aunque el complejo DNL™ convencional comprende un trímero con dos moléculas de DDD conectadas a una molécula de AD conectada, las variaciones en la estructura del complejo permiten la formación de dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, hexámeros y otros multímeros. En algunas realizaciones, el complejo de DNL™ puede comprender dos o más anticuerpos, fragmentos de anticuerpos o proteínas de fusión, que se unen al mismo determinante antigénico, o dos o más antígenos diferentes. El complejo de DNL™ puede comprender también uno o más de otros efectores, tales como proteínas, péptidos, inmunomoduladores, citoquinas, interleuquinas, interferones, proteínas de unión, ligandos péptidos, proteínas vehículo, toxinas, ribonucleasas tales como onconasa, oligonucleótidos inhibidores tales como ARNip, antígenos o xenoantígenos, polímeros tales como PEG, enzimas, agentes terapéuticos, hormonas, agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos o cualquier otra molécula o agregado.

La PKA, que tiene una función central en una de las rutas de transducción de señales mejor estudiada desencadenada por la unión del segundo mensajero cAMP a las subunidades R, se aisló por primera vez de músculo esquelético de conejo en 1968 (Walsh et al., *J. Biol. Chem.* 1968;243:3763). La estructura de la holoenzima consiste en dos subunidades catalíticas mantenidas en una forma inactiva por las subunidades R (Taylor, *J. Biol. Chem.* 1989; 264:8443). Las isozimas de la PKA se encuentran con dos tipos de subunidades R (RI y RII), y cada tipo tiene isoformas α y β (Scott, *Pharmacol. Ther.* 1991;50:123). Por lo tanto, las cuatro isoformas de las subunidades reguladoras de la PKA son RI α , RI β , RII α y RII β . Las subunidades R se han aislado solo como dímeros estables y se ha mostrado que el dominio de dimerización consiste en los primeros 44 restos amino terminales de RII α (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999; 6:222). Como se describe más adelante, partes similares de las secuencias de aminoácidos de otras subunidades reguladoras están implicadas en la dimerización y acoplamiento, cada una situada cerca del extremo N terminal de la subunidad reguladora. La unión de cAMP a las subunidades R conduce a la liberación de subunidades catalíticas activas para un espectro amplio de actividades de serina/treonina quinasa, que están orientadas hacia sustratos seleccionados a través de la compartimentalización de la PKA por su acoplamiento con AKAP (Scott et al., *J. Biol. Chem.* 1990;265:21561).

Puesto que la primera AKAP, proteína 2 asociada con microtúbulos, se caracterizó en 1984 (Lohmann et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984; 81:6723), se han identificado más de 50 AKAP que se localizan en diferentes sitios subcelulares, que incluyen la membrana plasmática, citoesqueleto de actina, núcleo, mitocondria y retículo endoplásmico, con estructuras diversas en especies que van desde levaduras a seres humanos (Wong y Scott, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2004;5:959). El AD de las AKAP para la PKA es una hélice anfipática de 14-18 restos (Carr et al., *J. Biol. Chem.* 1991;266:14188). Las secuencias de aminoácidos del AD son bastante variadas entre las AKAP individuales, con las afinidades de unión dadas para los dímeros de RII en el intervalo de 2 a 90 nM (Alto et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003; 100:4445). Las AKAP se unirán solo a subunidades R dimerizadas. Para RII α humana, el AD se une a una superficie hidrófoba formada por 23 restos amino terminales (Colledge y Scott, *Trends Cell Biol.* 1999; 6:216). Por lo tanto, el dominio de dimerización y el dominio de unión de AKAP de RII α humana están ambos localizados dentro de la misma secuencia de 44 aminoácidos N terminales (Newlon et al., *Nat. Struct. Biol.* 1999;6:222; Newlon et al., *EMBO J.* 2001;20:1651), que se denomina el DDD en la presente memoria.

Los autores de la invención han desarrollado una tecnología de plataforma para usar el DDD de subunidades reguladoras de PKA humana y el AD de AKAP como una pareja de módulos conectores excelentes para el acoplamiento de cualesquiera dos entidades, denominadas en lo sucesivo como **A** y **B**, en un complejo no covalente, que podría bloquearse además en un complejo de DNL™ por la introducción de restos de cisteína tanto en el DDD como el AD en posiciones estratégicas para facilitar la formación de enlaces disulfuro. La metodología general del procedimiento es como sigue. La entidad **A** se construye por unión de una secuencia de DDD a un precursor de **A**, produciendo un primer componente denominado en lo sucesivo **a**. Debido a que la secuencia de DDD afectaría a la formación espontánea de un dímero, **A** estaría compuesto por lo tanto de **a**₂. La entidad **B** se construye por unión de una secuencia de AD a un precursor de **B**, produciendo un segundo componente denominado en lo sucesivo **b**. El motivo dimérico de DDD contenido en **a**₂ creará un sitio de acoplamiento para la unión a la secuencia de AD contenida en **b**, facilitando así una asociación lista de **a**₂ y **b** para formar un complejo binario, trimérico de **a**₂**b**. Este suceso de unión se estabiliza con una reacción posterior para asegurar de forma covalente las dos entidades por puentes disulfuro, lo cual ocurre muy eficazmente basado en el principio de concentración local efectiva debido a que las interacciones de unión iniciales deberían acercar a los grupos tiol reactivos situados tanto en DDD como en AD (Chmura et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2001;98:8480) para el ligado específico de sitio. Usando diferentes combinaciones de conectores, módulos adaptadores y precursores, se pueden producir y usar una amplia variedad de construcciones de DNL™ de diferente estequiometría (Véase, p. ej., EE.UU. nº 7.550.143; 7.521.056; 7.534.866; 7.527.787 y 7.666.400).

Mediante la unión del DDD y AD alejado de los grupos funcionales de los dos precursores, dichos ligados específicos de sitio se espera que también conserven las actividades originales de los dos precursores. Este procedimiento es de naturaleza modular y se puede aplicar potencialmente para conectar, de forma específica de sitio y covalentemente, una amplia variedad de sustancias, incluyendo péptidos, proteínas, anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y otros motivos efectores con una amplia variedad de actividades. Usando el método de proteínas de fusión de construcción de efectores conjugados con AD y DDD descritos en los siguientes ejemplos, se puede incorporar prácticamente cualquier proteína o péptido en una construcción de DNL™. Sin embargo, la técnica no es limitante y se pueden usar otros métodos de conjugación.

Se conoce una variedad de métodos para hacer proteínas de fusión, que incluyen síntesis de ácidos nucleicos, hibridación y/o amplificación para producir un ácido nucleico bicatenario sintético que codifica una proteína de fusión de interés. Dichos ácidos nucleicos bicatenarios se pueden insertar en vectores de expresión para la producción de proteínas de fusión por técnicas de biología molecular convencionales (Véase, p. ej. Sambrook et al., *Molecular Cloning, A laboratory manual*, 2ª Ed, 1989). En dichas realizaciones preferidas, el motivo de AD y/o DDD se puede unir bien al extremo N-terminal o C-terminal de una proteína o péptido efectores. Sin embargo, el experto en la técnica comprenderá que el sitio de unión de un motivo de AD o DDD a un motivo efector puede variar, dependiendo de la naturaleza química del motivo efector y la o las partes del motivo efector implicadas en su actividad fisiológica. La unión específica de sitio de una variedad de motivos efectores se puede llevar a cabo usando técnicas conocidas en la materia, tal como el uso de reactivos de reticulación bivalentes y/u otras técnicas de conjugación química.

Relaciones estructura-función en motivos de AD y DDD

Para los diferentes tipos de construcciones de DNL™, se pueden usar diferentes secuencias de AD o DDD. A continuación se dan secuencias de DDD y AD de ejemplo.

DDD1

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

DDD2

CGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:2)

AD1

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

AD2

CGQIEYLAKQIVDNAIQQAGC (SEQ ID NO:4)

El experto en la técnica comprenderá que DDD1 y DDD2 se basan en la secuencia de DDD de la isoforma RII α humana de la proteína quinasa A. Sin embargo, en realizaciones alternativas, los motivos de DDD y AD se pueden basar en la secuencia de DDD de la forma RI α humana de la proteína quinasa A y una secuencia correspondiente de AKAP, como se ilustra en DDD3, DDD3C y AD3 a continuación.

DDD3

SLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEEAK
(SEQ ID NO:5)

DDD3C

MSCGGSLRECELYVQKHNIQALLKDSIVQLCTARPERPMAFLREYFERLEKEE
AK (SEQ ID NO:6)

AD3

5 CGFEELAWKIAKMIWSDVFQQGC (SEQ ID NO:7)

En otras realizaciones alternativas, se pueden usar otras variantes de secuencias de motivos de AD y/o DDD en la construcción de los complejos de DNL™. Por ejemplo, hay solo cuatro variantes de las secuencias de DDD de PKA humana, que corresponden a los motivos de DDD de PKA RI α , RI β , RII α y RII β . La secuencia de DDD de RII α es la base de DD1 y DD2 descritos antes. Las cuatro secuencias de DDD de PKA humana se muestran a continuación.
10 La secuencia de DDD representa los restos 1-44 de RI α , 1-44 de RI β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β . (Obsérvese que la secuencia de DDD 1 está ligeramente modificada respecto a la de DDD de RII α de la PKA humana).

PKA RI α

SLRECELYVQKHNIQALLKDVSIQVQLCTARPERPMAFLREYFEKLEKEEAK
(SEQ ID NO:8)

PKA RI β

SLKGCELYVQLHGIQQVLKDCIVHLCISKPERPMKFLREHFEEKLEKEENRQILA
(SEQ ID NO:9)

PKA RII α

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVGQPPDLVDFAVEYFTRLREARRQ (SEQ ID
NO:10)

PKA RII β

SIEIPAGLTELLQGFTVEVLRHQPADLLEFALQHFTRLQQENER (SEQ ID
NO:11)

15 Las relaciones estructura-función de los dominios AD y DDD se han sometido a investigación. (Véase, p. ej., Burns-Hamuro et al., 2005, *Protein Sci* 14:2982-92; Carr et al., 2001, *J Biol Chem* 276:17332-38; Alto et al., 2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445- 50; Hundsrucker et al., 2006, *Biochem J* 396:297-306; Stokka et al., 2006, *Biochem J* 400:493-99; Gold et al., 2006, *Mol Cell* 24:383-95; Kinderman et al., 2006, *Mol Cell* 24:397- 408).

20 Por ejemplo, Kinderman et al. (2006, *Mol Cell* 24:397-408) examinaron la estructura cristalina de la interacción de la unión de AD-DDD y concluyeron que la secuencia de DDD humana contenía una serie de restos de aminoácidos conservados que eran importantes en la formación de dímero o unión de AKAP, subrayados en la siguiente SEQ ID NO: 1. (Véase la figura 1 de Kinderman et al., 2006). El experto en la técnica comprenderá que en el diseño de variantes de secuencias de la secuencia de DDD, se evitaría convenientemente cambiar cualquiera de los restos subrayados, mientras que se pueden hacer sustituciones de aminoácidos conservados por restos que son menos

críticos para la dimerización y unión de AKAP.

SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

5 Como se discute con más detalle a continuación, se han caracterizado las sustituciones de aminoácidos conservados para cada uno de los veinte L-aminoácidos comunes. Por lo tanto, basándose en los datos de Kinderman (2006) y las sustituciones de aminoácidos conservados, se muestran las potenciales secuencias de DDD alternativas basadas en la SEQ ID NO: 1 en la tabla 2. Al hacer la tabla 2, solo se consideraron las sustituciones de aminoácidos altamente conservados. Por ejemplo, los restos cargados solo se sustituyeron por restos de la misma carga, los restos con cadenas laterales pequeñas se sustituyeron por restos con tamaño similar, las cadenas laterales de hidroxilo solo se sustituyeron por otros hidroxilos, etc. Debido al efecto único de la prolina en la estructura secundaria de aminoácidos, no se sustituyó la prolina por otros restos. Se muestra un número limitado de dichas potenciales secuencias de motivos de DDD alternativas en las SEQ ID NO: 12 a SEQ ID NO: 31 siguientes. El experto en la técnica comprenderá que se puede construir un número casi ilimitado de especies alternativas dentro del género de los motivos de DDD por técnicas convencionales, por ejemplo, usando un sintetizador de péptidos comercial o técnicas de mutagénesis dirigidas al sitio bien conocidas. El efecto de las sustituciones de aminoácidos en la unión del motivo de AD también se puede determinar fácilmente por técnicas convencionales, por ejemplo, como describen Alto et al. (2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445-50).

Tabla 2. Sustituciones de aminoácidos conservadas en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia consenso descrita como SEQ ID NO: 87.

S	H	I	Q	I	P	P	G	L	T	E	L	L	Q	G	Y	T	V	E	V	L	R	
T	K		N				A		S	D			N	A		S		D			K	
R																						

Q	Q	P	P	D	L	V	E	F	A	V	E	Y	F	T	R	L	R	E	A	R	A
N	N			E			D		L		D			S	K		K	D	L	K	L
									I										I		I
									V										V		V

20

- THIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:12)
- SKIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:13)
- SRIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:14)
- SHINIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:15)
- SHIQIPPALTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:16)
- SHIQIPPGLSELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:17)
- SHIQIPPGLTDLLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:18)

SHIQIPPGLTELLNGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:19)
 SHIQIPPGLTELLQAYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:20)
 SHIQIPPGLTELLQGYSVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:21)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVDVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:22)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLKQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:23)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRNQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:24)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQNPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:25)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPELVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:26)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVDFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:27)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFLVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:28)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFIVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:29)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFVVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:30)
 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVDYFTRLREARA (SEQ ID NO:31)

5 Alto et al. (2003, *Proc Natl Acad Sci USA* 100:4445-50) llevaron a cabo un análisis bioinformático de la secuencia de AD de diferentes proteínas AKAP para diseñar una secuencia de AD selectiva de RII llamada AKAP-IS (SEQ ID NO: 3), con una constante de unión para DDD de 0,4 nM. La secuencia AKAP-IS se diseñó como un antagonista peptídico de la unión de AKAP a la PKA. Los restos en la secuencia de AKAP-IS donde las sustituciones tenían tendencia a disminuir la unión a DDD están subrayados en la siguiente SEQ ID NO: 3. El experto en la técnica comprenderá que al diseñar variantes de secuencias de la secuencia de AD, se evitaría convenientemente cambiar cualquiera de los restos subrayados, mientras que se pueden hacer sustituciones por aminoácidos conservados de restos que son menos críticos para la unión de DDD. La tabla 3 muestra potenciales sustituciones de aminoácidos conservados en la secuencia de AKAP-IS (AD1, SEQ ID NO: 3), similares a las mostradas para DDD1 (SEQ ID NO: 1) en la tabla 2 anterior.

15 Se muestra una serie limitada de dichas potenciales secuencias de motivos de AD alternativas en las siguientes SEQ ID NO: 32 a SEQ ID NO: 49. De nuevo, el experto en la técnica podría hacer, ensayar y usar un número muy grande de especies dentro del género de las posibles secuencias de motivos de AD, basándose en los datos de Alto et al. (2003). Hay que indicar que la figura 2 de Alto (2003) muestra un número incluso mayor de potenciales sustituciones de aminoácidos que se pueden hacer, mientras que se retiene la actividad de unión a los motivos de DDD, basándose en los experimentos de unión reales.

AKAP-IS

QIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:3)

20 Tabla 3. Sustituciones de aminoácidos conservadas en AD1 (SEQ ID NO: 3). Secuencia consenso descrita como SEQ ID NO: 88.

Q	I	E	Y	L	<u>A</u>	K	Q	<u>I</u>	<u>V</u>	D	N	<u>A</u>	<u>I</u>	Q	Q	A
N	L	D	F	I		R	N			E	Q			N	N	L
	V		T	V												I
			S													V

NIEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:32)
 QLEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:33)
 QVEYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:34)
 QIDYLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:35)
 QIEFLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:36)
 QIETLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:37)
 QIESLAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:38)
 QIEYIAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:39)
 QIEYVAKQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:40)
 QIEYLARQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:41)
 QIEYLAKNIVDNAIQQA (SEQ ID NO:42)
 QIEYLAKQIVENAIQQA (SEQ ID NO:43)
 QIEYLAKQIVDQAIQQA (SEQ ID NO:44)
 QIEYLAKQIVDNAINQA (SEQ ID NO:45)
 QIEYLAKQIVDNAIQNA (SEQ ID NO:46)
 QIEYLAKQIVDNAIQQL (SEQ ID NO:47)
 QIEYLAKQIVDNAIQQI (SEQ ID NO:48)
 QIEYLAKQIVDNAIQQV (SEQ ID NO:49)

5 Gold et al. (2006, *Mol Cell* 24:383-95) utilizaron cristalografía y cribado de péptidos para desarrollar una secuencia SuperAKAP-IS (SEQ ID NO: 50), que presentaba una selectividad cinco órdenes de magnitud mayor para la isoforma RII de la PKa comparado con la isoforma RI. Los restos subrayados indican las posiciones de las sustituciones de aminoácidos, con respecto a la secuencia de AKAP-IS, que aumentaba la unión al motivo de DDD de RII α . En esta secuencia, el resto Q N-terminal se numera como el resto número 4 y el resto A C-terminal es el resto número 20. Los restos donde se podían hacer sustituciones para afectar a la afinidad por RII α eran los restos 8, 11, 15, 16, 18, 19 y 20 (Gold et al., 2006). Está contemplado que en algunas realizaciones alternativas, la secuencia SuperAKAP-IS pueda sustituir a la secuencia del motivo de AD de AKAP-IS para preparar construcciones de DNLTM.
 10 Se muestran otras secuencias alternativas que pueden sustituir a la secuencia de AD AKAP-IS en las SEQ ID NO: 51-53. Las sustituciones relativas a la secuencia AKAP-IS están subrayadas. Se prevé que, como en la secuencia de AD2 mostrada en la SEQ ID NO: 4, el motivo de AD también puede incluir los restos adicionales N-terminales cisteína y glicina y los restos C-terminales glicina y cisteína.

SuperAKAP-IS

QIEYVAKQIVDYAIHQA (SEQ ID NO:50)

15 Secuencias alternativas de AKAP

QIEYKAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:51)

QIEYHAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:52)

QIEYVAKQIVDHAIHQA (SEQ ID NO:53)

La figura 2 de Gold et al. describe secuencias de unión a DDD adicionales de una variedad de proteínas AKAP,

mostradas a continuación.

AKAP específicas de RII

AKAP-KL

PLEYQAGLLVQNAIQQAI (SEQ ID NO:54)

AKAP79

LLIETASSLVKNAIQLSI (SEQ ID NO:55)

AKAP-Lbc

LIEEAASRIVDAVIEQVK (SEQ ID NO:56)

AKAP específicas de RI

AKAPce

ALYQFADRFSELVISEAL (SEQ ID NO:57)

RIAD

LEQVANQLADQIIKEAT (SEQ ID NO:58)

PV38

5 FEELAWKIAKMIWSDVF (SEQ ID NO:59)

AKAP de especificidad doble

AKAP7

ELVRLSKRLVENAVLKAV (SEQ ID NO:60)

MAP2D

TAEVVSARIVQVVTAQAV (SEQ ID NO:61)

DAKAP1

QIKQAAFQLISQVILEAT (SEQ ID NO:62)

DAKAP2

LAWKIAKMIVSDVMQQ (SEQ ID NO:63)

10 Stokka et al. (2006, *Biochem J* 400:493-99) también desarrollaron competidores peptídicos de la unión de AKAP a la PKA, mostrados en las SEQ ID NO: 64-66. Los antagonistas peptídicos se denominaron Ht31 (SEQ ID NO: 64), RIAD (SEQ ID NO: 65) y PV-38 (SEQ ID NO: 66). El péptido Ht-31 presentaba una mayor afinidad por la isoforma RII de la PKA, mientras que RIAD y PV-38 mostraban mayor afinidad por RI.

Ht31

DLIEEAASRIVDAVIEQVKAAGAY (SEQ ID NO:64)

RIAD

LEQYANQLADQIIKEATE (SEQ ID NO:65)

PV-38

FEELAWKIAKMIWSDVFQQC (SEQ ID NO:66)

Hundsrucker et al. (2006, *Biochem J* 396:297-306) desarrollaron otros competidores peptídicos más para la unión de AKAP a la PKA, con una constante de unión tan baja como 0,4 nM al DDD de la forma RII de la PKA. Se proporcionan las secuencias de diferentes péptidos antagonistas de AKAP en la tabla 1 de Hundsrucker et al., reproducida en la siguiente tabla 4. AKAPIS representa un péptido sintético de unión a la subunidad RII. Todos los demás péptidos derivan de los dominios de unión a RII de las AKAP indicadas.

5

Tabla 4. Secuencias peptídicas de AKAP

	Secuencia peptídica
AKAPIS	QIEYLAKQIVD NAIQQA (SEQ ID NO:3)
AKAPIS-P	QIEYLAKQIPD NAIQQA (SEQ ID NO:67)
Ht31	KGADLIEEAASRIVDAVIEQVKAAG (SEQ ID NO:68)
Ht31-P	KGADLIEEAASRIPDAPIEQVKAAG (SEQ ID NO:69)
AKAP7 δ -wt-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:70)
AKAP7 δ -L304T-pep	PEDAELVRTSKRLVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:71)
AKAP7 δ -L308D-pep	PEDAELVRLSKRDVENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:72)
AKAP7 δ -P-pep	PEDAELVRLSKRLPENAVLKAVQQY (SEQ ID NO:73)
AKAP7 δ -PP-pep	PEDAELVRLSKRLPENAPLKAVQQY (SEQ ID NO:74)
AKAP7 δ -L314E-pep	PEDAELVRLSKRLVENAVEKAVQQY (SEQ ID NO:75)
AKAP1-pep	EEGLDRNEEIKRAAFQIISQVISEA (SEQ ID NO:76)
AKAP2-pep	LVDDPLEYQAGLLVQNAIQQAIAEQ (SEQ ID NO:77)
AKAP5-pep	QYETLLIETASSLVKNAIQLSIEQL (SEQ ID NO:78)
AKAP9-pep	LEKQYQEQL EEEEVAKVIVSMSIAFA (SEQ ID NO:79)
AKAP10-pep	NTDEAQEELAWKIAKMI VSDIMQQA (SEQ ID NO:80)
AKAP11-pep	VNL DKKAVLAEKIVAE IAIEKAEREL (SEQ ID NO:81)
AKAP12-pep	NGILELETKSSKLVQNI IQTAVDQF (SEQ ID NO:82)
AKAP14-pep	TQDKNYEDEL TQVALALVEDVINYA (SEQ ID NO:83)
Rab32-pep	ETSAKDNINIEEAARFLVEKILVNH (SEQ ID NO:84)

10 Los restos que eran altamente conservados entre los dominios de AD de las diferentes proteínas AKAP se indican a continuación subrayados con referencia a la secuencia de AKAP IS (SEQ ID NO: 3). Los restos son los mismos que los observados por Alto et al. (2003), con la adición del resto alanina C-terminal. (Véase FIG. 4 de Hundsrucker et al. (2006).) Las secuencias de los antagonistas peptídicos con afinidades particularmente altas para la secuencia de DDD de RII DDD son las de AKAP-IS, AKAP7 δ -wt-pep, AKAP7 δ -L304T-pep y AKAP7 δ -L308D-pep.

AKAP-IS

15 QIEYLAKQIVD~~NAIQQA~~ (SEQ ID NO:3)

Carr et al. (2001, *J Biol Chem* 276:17332-38) examinaron el grado de homología de secuencia entre las diferentes secuencias de DDD de unión a AKAP de proteínas humanas y no humanas e identificaron restos en las secuencias de DDD que parecía que eran las más altamente conservadas entre los diferentes motivos de DDD. Estas se indican a continuación subrayadas con referencia a la secuencia de DDD de RII α de PKA humana de SEQ ID NO: 1. Los restos que estaban particularmente conservados se indican además en cursiva. Los restos se solapan, pero no son idénticos a los que sugerían Kinderman et al. (2006) que eran importantes para la unión a las proteínas AKAP. El

20

experto en la técnica comprenderá que en el diseño de varias de secuencias de DDD, sería más preferido evitar cambiar los restos más conservados (en cursiva), y sería preferido evitar también cambiar los restos conservados (subrayados), mientras que se pueden considerar sustituciones de aminoácidos conservados para los restos que no están ni subrayados ni en cursiva.

5 SHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARA (SEQ ID NO:1)

Se muestra un conjunto modificado de sustituciones de aminoácidos conservados para la secuencia de DD1 (SEQ ID NO: 1), basada en los datos de Carr et al. (2001) en la tabla 5. Incluso con este conjunto reducido de secuencias sustituidas, hay más de 65.000 posibles secuencias de motivos de DDD alternativas que puede producir, ensayar y usar el experto en la técnica sin experimentación innecesaria. El experto en la técnica podrá obtener fácilmente dichas secuencias de aminoácidos de DDD alternativas como se ha descrito antes para la tabla 2 y tabla 3

Tabla 5. Sustituciones de aminoácidos conservadas en DDD1 (SEQ ID NO: 1). Secuencia consenso descrita como SEQ ID NO: 89.

S	<u>H</u>	<u>I</u>	Q	<u>I</u>	<u>P</u>	P	<u>G</u>	<u>L</u>	T	<u>E</u>	<u>L</u>	<u>L</u>	Q	<u>G</u>	<u>Y</u>	<u>T</u>	V	<u>E</u>	<u>V</u>	<u>L</u>	<u>R</u>	
T			N						S								I					
																	L					
																	A					

Q	<u>Q</u>	<u>P</u>	P	<u>D</u>	<u>L</u>	<u>V</u>	<u>E</u>	<u>F</u>	<u>A</u>	V	E	<u>Y</u>	<u>F</u>	T	R	<u>L</u>	R	<u>E</u>	A	<u>R</u>	A	
N										I	D			S	K		K			L		L
										L										I		I
										A									V		V	V

15 El experto en la técnica comprenderá que estas y otras sustituciones de aminoácidos en las secuencias de aminoácidos de DDD o AD se pueden usar para producir especies alternativas dentro del género de motivos de AD o DDD, usando técnicas que son convencionales en el campo y solo experimentación rutinaria.

Sustituciones de aminoácidos

20 En realizaciones alternativas, los métodos y composiciones descritos pueden implicar la producción y el uso de proteínas o péptidos con uno o más restos de aminoácidos sustituidos. Por ejemplo, las secuencias de DDD y/o AD usadas para hacer construcciones de DNL™ se pueden modificar como se ha descrito antes.

25 El experto en la técnica será consciente de que, en general, las sustituciones de aminoácidos típicamente implican el reemplazo de un aminoácido por otro aminoácido de propiedades relativamente similares (es decir, sustituciones de aminoácidos conservadas). Las propiedades de los diferentes aminoácidos y el efecto de la sustitución de aminoácidos en la estructura y función de las proteínas ha sido objeto de amplios estudios y conocimiento en la técnica.

30 Por ejemplo, se puede considerar el índice hidropático de los aminoácidos (Kyte y Doolittle, 1982, J. Mol. Biol., 157:105-132). El carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático basado en sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, 1982), estos son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína/cistina (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (- 0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamino (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Cuando se hacen sustituciones conservadas, se prefiere el uso de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , son más preferidos dentro de ± 1 y son incluso más preferidos dentro de $\pm 0,5$.

35 La sustitución de aminoácido también puede tener en cuenta la hidrofiliidad del resto de aminoácido (p. ej., patente de EE.UU. nº 4.554.101). Se han asignado valores de hidrofiliidad a restos de aminoácidos: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0); glutamato (+3,0); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina(+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ,+0,1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se prefiere el reemplazo de aminoácidos por otros de hidrofiliidad similar.

40 Otras consideraciones incluyen el tamaño de la cadena lateral del aminoácido. Por ejemplo, en general no sería preferido reemplazar un aminoácido con una cadena lateral compacta, tal como glicina o serina, por un aminoácido con una cadena lateral voluminosa, p. ej., triptófano o tirosina. El efecto de diferentes restos de aminoácidos en la

estructura secundaria de proteínas también es una consideración. A través de estudios empíricos, se ha determinado el efecto de diferentes restos de aminoácidos en la tendencia de dominios de proteínas a adoptar una estructura secundaria de hélice alfa, lámina beta o giro inverso, y se conoce en la técnica (Véase, p. ej., Chou y Fasman, 1974, *Biochemistry*, 13:222-245; 1978, *Ann. Rev. Biochem.*, 47: 251-276; 1979, *Biophys. J.*, 26:367-384).

- 5 Basándose en dichas consideraciones y extensos estudios empíricos, se han construido tablas de sustituciones de aminoácidos conservadas y se conocen en la técnica. Por ejemplo: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina. Alternativamente: Ala (A) leu, ile, val; Arg (R) gln, asn, lys; Asn (N) his, asp, lys, arg, gln; Asp (D) asn, glu; Cys (C) ala, ser; Gln (Q) glu, asn; Glu (E) gin, asp; Gly (G) ala; His (H) asn, gln, lys, arg; Ile (I) val, met, ala, phe, leu; Leu (L) val, met, ala, phe, ile; Lys (K) gln, asn, arg; Met (M) phe, ile, leu; Phe (F) leu, val, ile, ala, tyr; Pro (P) ala; Ser (S), thr; Thr (T) ser; Trp (W) phe, tyr; Tyr (Y) trp, phe, thr, ser; Val (V) ile, leu, met, phe, ala.

- 15 Otras consideraciones para sustituciones de aminoácidos incluyen si el residuo está localizado o no en el interior de una proteína o está expuesto al disolvente. Para los restos interiores, las sustituciones conservadas incluirían: Asp y Asn; Ser y Thr; Ser y Ala; Thr y Ala; Ala y Gly; Ile y Val; Val y Leu; Leu e Ile; Leu y Met; Phe y Tyr; Tyr y Trp. (Véase, p. ej., sitio en internet de PROWL en rockefeller.edu). Para los restos expuestos a disolvente, las sustituciones conservadas incluirían: Asp y Asn; Asp y Glu; Glu y Gln; Glu y Ala; Gly y Asn; Ala y Pro; Ala y Gly; Ala y Ser; Ala y Lys; Ser y Thr; Lys y Arg; Val y Leu; Leu e Ile; Ile y Val; Phe y Tyr. (ibidem). Se han construido diferentes matrices para ayudar a la selección de sustituciones de aminoácidos, tales como la matriz de puntuación PAM250, matriz Dayhoff, matriz Grantham, matriz McLachlan, matriz Doolittle, matriz Henikoff, matriz Miyata, matriz Fitch, matriz Jones, matriz Rao, matriz Levin y matriz Risler (idem).

- 20 En la determinación de sustituciones de aminoácidos, se pueden considerar la existencia de enlaces intermoleculares o intramoleculares, tales como la formación de enlaces iónicos (puentes salinos) entre restos con carga positiva (p. ej., His, Arg, Lys) y restos con carga negativa (p. ej., Asp, Glu) o enlaces disulfuro entre restos de cisteína cercanos.

- 25 Los métodos de sustitución de cualquier aminoácido por cualquier otro aminoácido en una secuencia de proteína codificada, son bien conocidos y son un asunto de experimentación rutinaria para el experto en la técnica, por ejemplo, por la técnica de mutagénesis dirigida al sitio, o por síntesis y ensamblaje de oligonucleótidos que codifican una sustitución de aminoácido y corte y empalme en una construcción de vector de expresión.

Agentes terapéuticos

- 30 En realizaciones alternativas, se pueden usar agentes terapéuticos tales como agentes citotóxicos, agentes antiangiogénicos, agentes proapoptóticos, antibióticos, hormonas, antagonistas de hormonas, quimioquinas, fármacos, profármacos, toxinas, enzimas u otros agentes, bien conjugados con las inmunotoxinas objeto o administrados por separado antes, simultáneamente con o después de la inmunotoxina. Los fármacos útiles pueden tener una propiedad farmacéutica seleccionada del grupo que consiste en antimetabólica, antiquinasa, alquilante, antimetabolito, antibiótico, alcaloide, antiangiogénico, agentes proapoptóticos y combinaciones de los mismos.

- 35 Los fármacos de ejemplo útiles pueden incluir 5-fluorouracilo, apilidina, azaribina, anastrozol, antraciclinas, bendamustina, bleomicina, bortezomib, briostatina-1, busulfán, caliqueamicina, camptotecina, carboplatino, 10-hidroxycamptotecina, carmustina, celebex, clorambucilo, cisplatino (CDDP), inhibidores de Cox-2, irinotecán (CPT-11), SN-38, carboplatino, cladribina, camptotecanos, ciclofosfamida, citarabina, dacarbazina, docetaxel, dactinomicina, daunorubicina, doxorubicina, 2-pirrolinodoxorubicina (2P-DOX), ciano-morfolino doxorubicina, doxorubicina glucurónido, epirubicina glucurónido, estramustina, epipodofilotoxina, agentes de unión a receptores de estrógenos, etopósido (VP16), etopósido, glucurónido, etopósido fosfato, floxuridina (FUdR), 3',5'-O-dioleoil-FudR (FUdR-dO), fludarabina, flutamida, inhibidores de la farnesil-proteína transferasa, gemcitabina, hidroxiurea, idarubicina, ifosfamida, L-asparaginasa, lenolidamida, leucovorin, lomustina, mecloretamina, melfalán, mercaptopurina, 6-mercaptopurina, metotrexato, mitoxantrona, mitramicina, mitomicina, mitotano, navelbina, nitrosourea, plicomicina, procarbazona, paclitaxel, pentostatina, PSI-341, raloxifeno, semustina, estreptozocina, tamoxifeno, taxol, temazolomida (una forma acuosa de DTIC), transplatino, talidomida, tioguanina, tiotepá, tenipósido, topotecán, mostaza de uracilo, vinorelbina, vinblastina, vincristina y alcaloides de la vinca.

- 40 Las toxinas útiles pueden incluir ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), p. ej., onconasa, DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diférica, exotoxina de pseudomonas, endotoxina de pseudomonas.

Las quimioquinas útiles pueden incluir RANTES, MCAF, MIP1-alfa, MIP1-Beta e IP-10.

- 55 En algunas realizaciones, pueden ser útiles agentes antiangiogénicos, tales como angiostatina, baculostatina, canstatina, maspina, anticuerpos anti-VEGF, péptidos y anticuerpos anti-PIGF, anticuerpos anti-factor de crecimiento vascular, anticuerpos anti-Flk-1, anticuerpos y péptidos anti-Fit-1, anticuerpos anti-Kras, anticuerpos anti-cMET, anticuerpos anti-MIF (factor inhibidor de la migración de macrófagos), péptidos de laminina, péptidos de fibronectina, inhibidores del activador de plasminógeno, inhibidores de metaloproteasa tisular, interferones, interleuquina-12, IP-10, Gro-B, trombospondina, 2- metoxiestradiol, proteína relacionada con proliferina, carboxiamidotriazol, CM101,

Marimastat, pentosán polisulfato, angiopoyetina-2, interferón-alfa, herbimicina A, PNU145156E, fragmento de prolactina 16K, Linomida (roquinimex), talidomida, pentoxifilina, genisteína, TNP-470, endostatina, paclitaxel, acutina, angiostatina, cidofovir, vincristina, bleomicina, AGM-1470, factor de plaquetas 4 o minociclina.

5 Los inmunomoduladores útiles se pueden seleccionar de una citoquina, un factor de crecimiento de citoblastos, una linfotóxina, un factor hematopoyético, un factor estimulador de colonia (CSF), un interferón (IFN), eritropoyetina, trombopoyetina y una combinación de los mismos. Son específicamente útiles las linfotóxicas tales como el factor de necrosis tumoral (TNF), factores hematopoyéticos, tales como interleuquina (IL), factor estimulador de colonias, tal como factor estimulador de colonia de granulocitos (G-CSF) o factor estimulador de colonia de granulocitos-macrófagos (GM-CSF), interferón, tal como interferones α , β o γ , y factor de crecimiento de citoblastos, tales como el denominado "factor S1". Están incluidas entre las citoquinas las hormonas de crecimiento tales como hormona de crecimiento humana, N-metil hormona de crecimiento humana y hormona de crecimiento bovino; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas glucoproteínas tales como la hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimuladora de tiroideos (TSH), y hormona luterizante (LH); factor de crecimiento hepático; prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario, proteína OB; factor de necrosis tumoral α y β ; sustancia inhibidora de mullerian; péptido asociado a la gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento vascular endotelial; integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF- β ; factor de crecimiento de plaquetas; factores de crecimiento transformantes (TGF) tales como TGF- α y TGF- β ; factor de crecimiento similar a insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón α , β y γ ; factores estimuladores de colonias (CSF) tales como CSF de macrófagos (M-CSF); interleuquinas (IL) tales como IL-1, IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, ligando kit o FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT.

25 Los radionucleidos útiles incluyen, pero no se limitan a ^{111}In , ^{177}Lu , ^{212}Bi , ^{213}Bi , ^{211}At , ^{62}Cu , ^{67}Cu , ^{90}Y , ^{125}I , ^{131}I , ^{32}P , ^{33}P , ^{47}Sc , ^{111}Ag , ^{67}Ga , ^{143}Pr , ^{153}Sm , ^{161}Tb , ^{166}Dy , ^{166}Ho , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{189}Re , ^{212}Pb , ^{223}Ra , ^{225}Ac , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{77}As , ^{89}Sr , ^{99}Mo , ^{105}Rh , ^{109}Pd , ^{143}Pr , ^{149}Pm , ^{169}Er , ^{194}Ir , ^{198}Au , ^{199}Au y ^{211}Pb . El radionucleido terapéutico preferiblemente tiene una energía de desintegración de 20 a 6.000 keV, preferiblemente en los intervalos de 60 a 200 keV para un emisor Auger, 100-2.500 keV para un emisor beta, y 4.000-6.000 keV para un emisor alfa. Las energías de desintegración máximas de nucleidos que emiten partículas beta útiles preferiblemente son de 20-5.000 keV, más preferiblemente 100-4.000 keV, y lo más preferiblemente 500-2.500 keV. También se prefieren los radionucleidos que se desintegran sustancialmente con partículas que emiten Auger. Por ejemplo, Co-58, Ga-67, Br-80m, Tc-99m, Rh-103m, Pt-109, In-111, Sb-119, I-125, Ho-161, Os-189m e Ir-192. Las energías de desintegración de nucleidos que emiten partículas beta útiles preferiblemente son <1.000 keV, más preferiblemente <100 keV, y lo más preferiblemente <70 keV. También se prefieren los radionucleidos que se desintegran sustancialmente con generación de partículas alfa. Dichos radionucleidos incluyen, pero no se limitan a: Dy-152, At-211, Bi-212, Ra-223, Rn-219, Po-215, Bi-211, Ac-225, Fr-221, At-217, Bi-213 y Fm-255. Las energías de desintegración de radionucleidos que emiten partículas alfa útiles son preferiblemente 2.000-10.000 keV, más preferiblemente 3.000-8.000 keV, y lo más preferiblemente 4.000-7.000 keV. Los potenciales radioisótopos adicionales útiles incluyen ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{75}Br , ^{198}Au , ^{224}Ac , ^{126}I , ^{133}I , ^{77}Br , $^{113\text{m}}\text{In}$, ^{95}Ru , ^{97}Ru , ^{103}Ru , ^{105}Ru , ^{107}Hg , ^{203}Hg , $^{121\text{m}}\text{Te}$, $^{122\text{m}}\text{Te}$, $^{125\text{m}}\text{Te}$, ^{165}Tm , ^{167}Tm , ^{168}Tm , ^{197}Pt , ^{109}Pd , ^{105}Rh , ^{142}Pr , ^{143}Pr , ^{161}Tb , ^{166}Ho , ^{199}Au , ^{57}Co , ^{58}Co , ^{51}Cr , ^{59}Fe , ^{75}Se , ^{201}Tl , ^{225}Ac , ^{76}Br , ^{169}Yb , y similares. Algunos nucleidos de diagnóstico útiles pueden incluir ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{89}Zr , ^{94}Tc , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, $^{99\text{m}}\text{Tc}$, o ^{111}In .

45 Los agentes terapéuticos pueden incluir un agente o colorante fotoactivo. Las composiciones fluorescentes, tales como fluorocromo, y otros cromógenos o colorantes, tales como porfirinas sensibles a la luz visible, se han usado para detectar y tratar lesiones dirigiendo la luz adecuada a la lesión. En terapia, esto se ha denominado fotorradiación, fototerapia o terapia fotodinámica. Véase, Jori et al. (eds.), PHOTODYNAMIC THERAPY OF TUMORS AND OTHER DISEASES (Librería Progetto 1985); van den Bergh, *Chem. Britain* (1986), 22:430. Además, se han acoplado anticuerpos monoclonales con colorantes fotoactivados para lograr la fototerapia. Véase, Mew et al., *J. Immunol.* (1983), 130:1473; idem., *Cancer Res.* (1985), 45:4380; Oseroff et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1986), 83:8744; idem., *Photochem. Photobiol.* (1987), 46:83; Hasan et al., *Prog. Clin. Biol. Res.* (1989), 288:471; Tatsuta et al., *Lasers Surg. Med.* (1989), 9:422; Pelegrin et al., *Cancer* (1991), 67:2529.

50 Otros agentes terapéuticos útiles pueden comprender oligonucleótidos, en especial oligonucleótidos de sentido contrario que preferiblemente se dirigen contra oncogenes y productos oncogénicos, tales como bcl-2 o p53. Una forma preferida de oligonucleótido terapéutico es el ARNip. El experto en la técnica comprenderá que se puede unir cualquier ARNip o ARN de interferencia a un anticuerpo o fragmento del mismo para suministrar a un tejido objetivo. Se conocen en la técnica muchas especies de ARNip contra una amplia variedad de objetivos, y cualesquiera de dichos ARNip conocidos se puede usar en los métodos y composiciones reivindicados.

60 Las especies de ARNip conocidas de uso potencial incluyen las específicas para IKK-gamma (patente de EE.UU. 7.022.828); VEGF, Flt-1 y Flk-1/KDR (patente de EE.UU. 7.148.342); Bcl2 y EGFR (patente de EE.UU. 7.541.453); CDC20 (patente de EE.UU. 7.550.572); transducina (beta)-tipo 3 (patente de EE.UU. 7.576.196); KRAS (patente de EE.UU. 7.576.197); anhidrasa carbónica II (patente de EE.UU. 7.579.457); componente del complemento 3 (patente de EE.UU. 7.582.746); receptor de interleuquina-1 asociado a quinasa 4 (IRAK4) (patente de EE.UU. 7.592.443); survivina (patente de EE.UU. 7.608.7070); superóxido dismutasa 1 (patente de EE.UU. 7.632.938); protoncogén MET (patente de EE.UU. 7.632.939); proteína precursora de amiloide beta (APP) (patente de EE.UU. 7.635.771);

IGF-1R (patente de EE.UU. 7.638.621); ICAM1 (patente de EE.UU. 7.642.349); factor de complemento B (patente de EE.UU. 7.696.344); p53 (7.781.575), y apolipoproteína B (7.795.421).

5 Están disponibles especies de ARNip adicionales de fuentes comerciales, tales como Sigma-Aldrich (St Louis, MO), Invitrogen (Carlsbad, CA), Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA), Ambion (Austin, TX), Dharmacon (Thermo Scientific, Lafayette, CO), Promega (Madison, WI), Mirus Bio (Madison, WI) y Qiagen (Valencia, CA), entre muchas otras. Otras fuentes disponibles al público de especies de ARNip incluyen la base de datos de siRNAdb en Stockholm Bioinformatics Centre, la base de datos MIT/ICBP siRNA, la RNAi Consortium shRNA Library en el Broad Institute, y la Probe database en el NCBI. Por ejemplo, hay 30.852 especies de ARNip en la NCBI Probe database.

10 El experto en la técnica comprenderá que para cualquier gen de interés, o bien ya se ha diseñado una especie de ARNip, o uno lo puede diseñar fácilmente usando herramientas de software disponibles al público. Cualquiera de dichas especies de ARNip se puede suministrar usando los complejos de DNL presentes.

Las especies de ARNip de ejemplo conocidas en la técnica se citan en la tabla 6. Aunque el ARNip se suministre como una molécula bicatenaria, por simplicidad solo se muestran las secuencias de la cadena codificante en la tabla 6.

15 Tabla 6. Secuencias de ARNip de ejemplo

Objetivo	Secuencia	SEQ ID NO
VEGF R2	AATGCGGCGGTGGTGACAGTA	SEQ ID NO:90
VEGF R2	AAGCTCAGCACACAGAAAGAC	SEQ ID NO:91
CXCR4	UAAAAUCUUCCUGCCCACCdTdT	SEQ ID NO:92
CXCR4	GGAAGCUGUUGGCUGAAAAdTdT	SEQ ID NO:93
PPARC1	AAGACCAGCCUCUUUGCCCAG	SEQ ID NO:94
Dinamina 2	GGACCAGGCAGAAAACGAG	SEQ ID NO:95
Catenina	CUAUCAGGAUGACGCGG	SEQ ID NO:96
Proteína de unión a E1A	UGACACAGGCAGGCUUGACUU	SEQ ID NO:97
Activador de Plasminógeno	GGTGAAGAAGGGCGTCCAA	SEQ ID NO:98
K-ras	GATCCGTTGGAGCTGTTGGCGTAGTT CAAGAGACTCGCCAACAGCTCCA TTTGAAA	SEQ ID NO:99
Sortilina 1	AGGTGGTGTTAACAGCAGAG	SEQ ID NO:100
Apolipoproteína E	AAGGTGGAGCAAGCGGTGGAG	SEQ ID NO:101
Apolipoproteína E	AAGGAGTTGAAGGCCGACAAA	SEQ ID NO:102
Bcl-X	UAUGGAGCUGCAGAGGAUGdTdT	SEQ ID NO:103
Raf-1	TTTGAATATCTGTGCTGAGAACACA GTTCTCAGCACAGATATTCTTTT	SEQ ID NO:104

Factor de transcripción de choque térmico 2	AATGAGAAAAGCAAAAGGTGCCCTGTCTC	SEQ ID NO:105
IGFBP3	AAUCAUCAUCAAGAAAGGGCA	SEQ ID NO:106
Tiorredoxina	AUGACUGUCAGGAUGUUGCdTdT	SEQ ID NO:107
CD44	GAACGAAUCCUGAAGACAUCU	SEQ ID NO:108
MMP14	AAGCCTGGCTACAGCAATATGCCTGTCTC	SEQ ID NO:109
MAPKAPK2	UGACCAUCACCGAGUUUAUdTdT	SEQ ID NO:110
FGFR1	AAGTCGGACGCAACAGAGAAA	SEQ ID NO:111
ERBB2	CUACCUUUCUACGGACGUGdTdT	SEQ ID NO:112
BCL2L1	CTGCCTAAGGCGGATTTGAAT	SEQ ID NO:113
ABL1	TTAUCCUUCUUCGGGAAGUC	SEQ ID NO:114
CEACAM1	AACCTTCTGGAACCCGCCAC	SEQ ID NO:115
CD9	GAGCATCTTCGAGCAAGAA	SEQ ID NO:116
CD151	CATGTGGCACCGTTTGCTT	SEQ ID NO:117
Caspasa 8	AACTACCAGAAAGGTATACCT	SEQ ID NO:118
BRCA1	UCACAGUGUCCUUUAUGUAdTdT	SEQ ID NO:119
p53	GCAUGAACCGGAGGCCCAUTT	SEQ ID NO:120
CEACAM6	CCGGACAGTTCCATGTATA	SEQ ID NO:121

El experto en la técnica comprenderá que la tabla 6 representa una muestra muy pequeña del número total de especies de ARNip conocidas en la técnica, y que se puede usar cualquiera de dichos ARNip conocidos en los métodos y composiciones reivindicados.

5 Agentes de diagnóstico

Los agentes de diagnóstico se seleccionan preferiblemente del grupo que consiste en un radionucleido, un agente de contraste radiológico, un ion paramagnético, un metal, un marcador fluorescente, un marcador quimiluminiscente, un agente de contraste de ultrasonidos y un agente fotoactivo. Dichos agentes de diagnóstico son bien conocidos y se puede usar cualquiera de dichos agentes de diagnóstico conocidos. Los ejemplos no limitantes de agentes de diagnóstico pueden incluir un radionucleido tal como ^{110}In , ^{111}In , ^{177}Lu , ^{18}F , ^{52}Fe , ^{62}Cu , ^{64}Cu , ^{67}Cu , ^{67}Ga , ^{68}Ga , ^{86}Y , ^{90}Y , ^{89}Zr , $^{94\text{m}}\text{Tc}$, ^{94}Tc , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{120}I , ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I , $^{154-158}\text{Gd}$, ^{32}P , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{51}Mn , $^{52\text{m}}\text{Mn}$, ^{55}Co , ^{72}As , ^{75}Br , ^{76}Br , $^{82\text{m}}\text{Rb}$, ^{83}Sr , u otros emisores gamma, beta, o de positrones. Los iones paramagnéticos útiles pueden incluir (III), manganeso (II), hierro (III), hierro (II), cobalto (II), níquel (II), cobre (II), neodimio (III), samario (III), iterbio (III), gadolinio (III), vanadio (II), terbio (III), disprosio (III), holmio (III) o erbio (III). Los agentes de contraste de metales pueden incluir lantano (III), oro (III), plomo (II) o bismuto (III). Los agentes de contraste de ultrasonidos pueden comprender liposomas, tales como liposomas cargados de gas. Los agentes de diagnóstico radiopacos se pueden seleccionar de compuestos, compuestos de bario, compuestos de galio y compuestos de talio. Se conoce una amplia variedad de marcadores fluorescentes en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeriterina, ficocianina, aloficocianina, o-ftalaldehído y fluorescamina. Los marcadores quimiluminiscentes útiles pueden incluir luminol, isoluminol, un éster de acridinio aromático, un imidazol, una sal de acridinio o un éster de oxalato.

Métodos de tratamiento terapéutico

Varias realizaciones de la invención como se definen en las reivindicaciones se refieren a métodos de tratamiento de un cáncer en un sujeto, tal como un mamífero, incluyendo seres humanos, animales domésticos o mascotas, tales como perros y gatos, que comprenden administrar al sujeto una cantidad terapéuticamente eficaz de un inmunoconjugado citotóxico.

En una realización, las enfermedades inmunológicas que se pueden tratar con las presentes inmunotoxias pueden incluir, por ejemplo, enfermedades de articulaciones tales como espondilitis anquilosante, artritis reumatoide juvenil, artritis reumatoide; enfermedades neurológicas tales como esclerosis múltiple y miastenia grave; enfermedad pancreática tal como diabetes, en especial diabetes de inicio juvenil; enfermedad del tracto gastrointestinal tal como hepatitis activa crónica, enfermedad celiaca, colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn, anemia perniciosa; enfermedades de la piel tales como psoriasis o esclerodemia; enfermedades alérgicas tales como asma y en afecciones relacionadas con trasplante tales como enfermedad de injerto contra huésped y rechazo de aloinjerto.

La administración de los inmunoconjugados citotóxicos se puede complementar mediante la administración simultánea o secuencial de una cantidad terapéuticamente eficaz de otro anticuerpo que se une a o es reactivo con otro antígeno en la superficie de la célula diana. Los MAb adicionales preferidos comprenden al menos un MAb humanizado, quimérico o humano seleccionado del grupo que consiste en un MAb reactivo con CD4, CD5, CD8, CD14, CD15, CD16, CD19, IGF-1R, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD45, CD46, CD52, CD54, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD95, CD126, CD133, CD138, CD154, CEACAM5, CEACAM6, B7, AFP, PSMA, EGP-1, EGP-2, anhidrasa carbónica IX, antígeno PAM4, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5, Ia, MIF, HM1.24, HLA-DR, tenascina, Flt-3, VEGFR, P1GF, ILGF, IL-6, IL-25, tenascina, TRAIL-R1, TRAIL-R2, factor de complemento C5, producto oncogénico o una combinación de los mismos. Los expertos en la técnica conocen diferentes anticuerpos útiles, tales como anticuerpos anti-CD 19, anti-CD20, y anti-CD22. Véase, por ejemplo, Ghetie et al., *Cancer Res.* 48:2610 (1988); Hekman et al., *Cancer Immunol. Immunother.* 32:364 (1991); Longo, *Curr. Opin. Oncol.* 8:353 (1996), patente de EE.UU. N° 5.798.554; 6.187.287; 6.306.393; 6.676.924; 7.109.304; 7.151.164; 7.230.084; 7.230.085; 7.238.785; 7.238.786; 7.282.567; 7.300.655; 7.312.318; 7.501.498; 7.612.180; 7.670.804; y publicación de solicitud de patente de EE.UU. N° 20080131363; 20070172920; 20060193865; y 20080138333.

La terapia con inmunotoxinas se puede complementar además con la administración, sea simultánea o secuencial de al menos un agente terapéutico. Por ejemplo, "CVB" (1,5 g/m² de ciclofosfamida, 200-400 mg/m² de etopósido, y 150-200 mg/m² de carmustina) es un régimen usado para tratar el linfoma no Hodgkin. Patti et al., *Eur. J. Haematol.* 51: 18 (1993). Otros regímenes quimioterapéuticos de combinación adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Freedman et al., "Non-Hodgkin's Lymphomas", en *CANCER MEDICINE, VOLUME 2, 3ª Edición*, Holland et al. (eds.), páginas 2028-2068 (Lea y Febiger 1993). Como una ilustración, los regímenes quimioterapéuticos de primera generación para el tratamiento del linfoma no Hodgkin de grado intermedio (NHL) incluyen C-MOPP (ciclofosfamida, vincristina, procarbazona y prednisona) y CHOP (ciclofosfamida, doxorubicina, vincristina, y prednisona). Un régimen quimioterapéutico de segunda generación útil es m-BACOD (metotrexato, bleomicina, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, dexametasona y leucovorin), mientras que un régimen de tercera generación adecuado es MACOP-B (metotrexato, doxorubicina, ciclofosfamida, vincristina, prednisona, bleomicina y leucovorin). Fármacos útiles adicionales incluyen butirato de fenilo, bendamustina, y briostatina-1.

Las presentes inmunotoxinas se pueden formular de acuerdo con métodos conocidos para preparar composiciones farmacéuticamente útiles, de modo que la inmunotoxina se combina en una mezcla con un excipiente farmacéuticamente adecuado. La disolución salina tamponada con fosfato es un ejemplo de un excipiente farmacéuticamente adecuado. Otros excipientes adecuados son bien conocidos por los expertos en la técnica. Véase, por ejemplo, Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª Edición* (Lea y Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edición* (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de los mismos.

Las presentes inmunotoxinas se pueden formular para la administración por vía intravenosa, por ejemplo, inyección de bolo o infusión continua. Preferiblemente, la inmunotoxina se infunde a lo largo de un periodo de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, a lo largo de un periodo de menos de aproximadamente 3 horas. Por ejemplo, los primeros 25-50 mg se podrían infundir en 30 minutos, preferiblemente incluso 15 min, y el resto se podría infundir a lo largo de las siguientes 2-3 h. Las formaciones para inyección se pueden presentar en forma farmacéutica unitaria, p. ej., en ampollas o recipientes de múltiples dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden tener formas tales como suspensiones, soluciones o emulsiones en vehículos oleosos o acuosos, y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o de dispersión. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para reconstituir con un vehículo adecuado, p. ej., agua exenta de pirógenos estéril, antes de usar.

Se pueden usar métodos farmacéuticos adicionales para controlar la duración de la acción de las inmunotoxinas. Las preparaciones de liberación controlada se pueden preparar mediante el uso de polímeros para formar complejo o adsorber las inmunotoxinas. Por ejemplo, los polímeros biocompatibles incluyen matrices de poli(etileno-co-acetato de vinilo) y matrices de un copolímero polianhídrido de un dímero de ácido esteárico y ácido sebáico. Sherwood et al., *Bio/Technology* 10: 1446 (1992). La velocidad de liberación de dicha matriz depende del peso molecular de la inmunotoxina, la cantidad de inmunotoxina dentro de la matriz y el tamaño de las partículas dispersas. Saltzman et al., *Biophys. J.* 55: 163 (1989); Sherwood et al., véase antes. Se describen otras formas farmacéuticas sólidas en Ansel et al., *PHARMACEUTICAL DOSAGE FORMS AND DRUG DELIVERY SYSTEMS, 5ª Edición* (Lea y Febiger 1990), y Gennaro (ed.), *REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES, 18ª Edición* (Mack Publishing Company 1990), y ediciones revisadas de los mismos.

La inmunotoxina se puede administrar también a un mamífero por vía subcutánea o incluso por otras vías parenterales. Además, la administración puede ser por infusión continua o por uno o múltiples bolos. Preferiblemente, la inmunotoxina se infunde a lo largo de un periodo de menos de aproximadamente 4 horas, y más preferiblemente, a lo largo de un periodo de menos de aproximadamente 3 horas.

- 5 De forma más general, la dosis de una inmunotoxina administrada para seres humanos variará dependiendo de factores tales como la edad, peso, altura, sexo, afección médica general y antecedentes médicos previos del paciente. Puede ser conveniente proporcionar al receptor una dosis de inmunotoxina que esté en el intervalo de aproximadamente 1 mg/kg a 25 mg/kg como una infusión intravenosa individual, aunque también se puede administrar una dosis menor o mayor según dicten las circunstancias. Una dosis de 1-20 mg/kg para un paciente de 10 70 kg, por ejemplo, es 70-1.400 mg, o 41-824 mg/m² para un paciente de 1,7 m. La dosis se puede repetir según sea necesario, por ejemplo, una vez por semana durante 4-10 semanas, una vez por semana durante 8 semanas, o una vez por semana durante 4 semanas. También se puede dar con menos frecuencia, tal como cada dos semanas durante varios meses o mensualmente o trimestralmente durante muchos meses, según sea necesario en una terapia de mantenimiento.
- 15 Alternativamente, una inmunotoxina se puede administrar como una dosis cada 2 o 3 semanas, repetida durante un total de al menos 3 dosis. O, la construcción se puede administrar dos veces por semana durante 4-6 semanas. Si la dosis se reduce a aproximadamente 200-300 mg/m² (340 mg por dosis para un paciente de 1,7 m, o 4,9 mg/kg para un paciente de 70 kg), se puede administrar una vez o incluso dos veces por semana durante 4 a 10 semanas. Alternativamente, se puede reducir la pauta posológica, en concreto cada 2 o 3 semanas durante 2-3 meses. Sin embargo, se ha determinado, que incluso dosis más altas, tales como 20 mg/kg una vez por semana o una vez cada 20 2-3 semanas, se pueden administrar por infusión i.v. lenta, durante ciclos de dosificación repetidos. La pauta posológica opcionalmente se puede repetir en otros intervalos y las dosis se pueden dar a través de diferentes rutas parenterales, con el ajuste adecuado de la dosis y la pauta posológica.

25 En realizaciones preferidas, las inmunotoxinas son útiles para terapia del cáncer. Los ejemplos de cánceres incluyen, pero no se limitan a carcinoma, linfoma, glioblastoma, melanoma, sarcoma y leucemia, mieloma o tumores malignos linfoides. Ejemplos más particulares de dichos cánceres se indican a continuación e incluyen: cáncer de células escamosas (p. ej., cáncer de células escamosas epiteliales), sarcoma de Ewing, tumor de Wilms, astrocitomas, cáncer de pulmón que incluye cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón no microcítico, adenocarcinoma de pulmón y carcinoma escamoso de pulmón, cáncer de peritoneo, cáncer hepatocelular, 30 cáncer gástrico o estomacal que incluye cáncer gastrointestinal, cáncer de páncreas, glioblastoma multiforme, cáncer de cuello uterino, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de vejiga, hepatoma, carcinoma hepatocelular, tumores neuroendocrinos, cáncer medular de tiroides, carcinoma tiroideo diferenciado, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de colon, cáncer de recto, cáncer de endometrio o carcinoma uterino, carcinoma de glándulas salivales, cáncer de riñón o renal, cáncer de próstata, cáncer vulvar, carcinoma anal, carcinoma de pene, 35 así como cáncer de cabeza y cuello. El término "cáncer" incluye células o tumores malignos primarios (p. ej., aquellos cuyas células no han migrado a sitios en el cuerpo del sujeto distintos del sitio del tumor o tumor maligno original) y células o tumores malignos secundarios (p. ej., aquellos que surgen de la metástasis, la migración de células malignas o células de tumores a sitios secundarios que son diferentes del sitio del tumor original). Los cánceres propios para los métodos de tratamiento de la presente invención implican células que expresan, expresan 40 en exceso o expresan de forma anómala IGF-1R.

Otros ejemplos de cánceres o tumores malignos incluyen, pero no se limitan a: leucemia linfoblástica infantil aguda, leucemia linfoblástica aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemia mieloide aguda, carcinoma adrenocortical, cáncer hepatocelular en adultos (primario), cáncer hepático en adultos (primario), leucemia linfocítica aguda en adultos, leucemia mieloide aguda en adultos, linfoma de Hodgkin en adultos, leucemia linfocítica en adultos, linfoma no Hodgkin en adultos, 45 cáncer de hígado primario en adultos, sarcoma de tejido blando en adultos, linfoma relacionado con el SIDA, tumores malignos relacionados con el SIDA, cáncer anal, astrocitoma, cáncer de vías biliares, cáncer de vejiga, cáncer de hueso, glioma del tronco cerebral, tumores cerebrales, cáncer de mama, cáncer de la pelvis renal y del uréter, linfoma del sistema nervioso central (primario), linfoma del sistema nervioso central, astrocitoma cerebeloso, astrocitoma cerebral, cáncer de cuello uterino, cáncer hepatocelular (primario) en la infancia, cáncer de hígado (primario) infantil, leucemia linfoblástica aguda infantil, leucemia mieloide aguda infantil, glioma de tronco 50 encefálico infantil, astrocitoma cerebeloso infantil, astrocitoma cerebral infantil, tumores extracraneales infantiles de células germinales, enfermedad de Hodgkin infantil, linfoma de Hodgkin infantil, glioma hipotalámico y de rutas visuales infantil, leucemia linfoblástica infantil, meduloblastoma infantil, linfoma no Hodgkin infantil, tumores neuroectodérmicos primitivos pineales y supratentoriales infantiles, cáncer de hígado primario infantil, rhabdomyosarcoma infantil, sarcoma de tejido blando infantil, glioma de rutas visuales e hipotalámico infantil, leucemia linfocítica crónica, leucemia mielógena crónica, cáncer de colon, linfoma cutáneo de células T, carcinoma de células de los islotes de páncreas endocrino, cáncer de endometrio, ependimoma, cáncer epitelial, cáncer de esófago, sarcoma de Ewing y tumores relacionados, cáncer pancreático exocrino, tumor extracraneal de células germinales, tumor extragonadal de células germinales, 55 cáncer del conducto biliar extrahepático, cáncer de ojo, cáncer de mama femenino, enfermedad de Gaucher, cáncer de vesícula biliar, cáncer gástrico, tumor carcinoide gastrointestinal, tumores gastrointestinales, tumores de células germinales, tumor trofoblástico gestacional, leucemia de células pilosas, cáncer de cabeza y cuello, cáncer hepatocelular, linfoma de Hodgkin, hipergammaglobulinemia, cáncer de hipofaringe, cánceres intestinales, melanoma intraocular, carcinoma de células de los islotes, cáncer de páncreas de 60

las células de los islotes, sarcoma de Kaposi, cáncer de riñón, cáncer de laringe, cáncer labial y de cavidad oral, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, trastornos linfoproliferativos, macroglobulinemia, cáncer de mama masculino, mesotelioma maligno, timoma maligno, meduloblastoma, melanoma, mesotelioma, cáncer escamoso de cuello metastásico primario oculto, cáncer escamoso de cuello metastásico primario, cáncer escamoso de cuello metastásico, mieloma múltiple, mieloma múltiple/neoplasia de células plasmáticas, síndrome mielodisplásico, leucemia mielógena, leucemia mieloide, trastornos mieloproliferativos, cáncer del seno paranasal y cavidad nasal, cáncer de nasofaringe, neuroblastoma, linfoma no Hodgkin, cáncer de piel no melanoma, cáncer de pulmón no microcítico, cáncer escamoso de cuello metastásico primario oculto, cáncer de orofaringe, osetosarcoma/sarcoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno, osteosarcoma/histiocitoma fibroso maligno de hueso, cáncer epitelial de ovario, tumor de células germinales ováricas, tumor ovárico con bajo potencial maligno, cáncer de páncreas, paraproteinemias, policitemia vera, cáncer de paratiroides, cáncer de pene, feocromocitoma, tumor pituitario, linfoma primario del sistema nervioso central, cáncer primario de hígado, cáncer de próstata, cáncer rectal, cáncer de células renales, cáncer de pelvis renal y uréter, retinoblastoma, rhabdomyosarcoma, cáncer de la glándula salival, sarcomas de sarcooidosis, síndrome de Sezary, cáncer de piel, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de intestino delgado, sarcoma de tejido blando, cáncer escamoso de cuello, cáncer de estómago, tumores neuroectodérmicos y pineales supratentoriales primitivos, linfoma de células T, cáncer de testículo, timoma, cáncer de tiroides, cáncer de células de transición de la pelvis renal y uréter, cáncer de pelvis renal y uréter transicional, tumores trofoblásticos, cáncer de células de uréter y pelvis renal, cáncer de uretra, cáncer de útero, sarcoma uterino, cáncer de vagina, glioma de rutas visuales e hipotalámico, cáncer de vulva, macroglobulinemia de Waldenstrom, tumor de Wilms y cualquier otra enfermedad hiperproliferativa, además de neoplasia, situada en un sistema de órganos citado antes.

La invención como se define en las reivindicaciones, se puede usar para tratar afecciones malignas o premalignas y para prevenir el avance a un estado neoplásico o maligno, que incluye, pero no limitado a los descritos antes. Dichos usos están indicados en afecciones conocidas o sospechosas de progreso precedente a neoplasia o cáncer, en particular, donde no se ha producido crecimiento de células no neoplásicas que consiste en hiperplasia, metaplasia, o lo más en particular displasia (para una revisión de dichas afecciones de crecimiento anómalo, véase Robbins y Angell, *Basic Pathology*, 2ª Ed., W. B. Saunders Co., Philadelphia, pág. 68-79 (1976)).

La displasia con frecuencia es un precursor del cáncer, y se encuentra principalmente en el epitelio. Es la forma más desordenada de crecimiento de células no neoplásicas, que implica una pérdida en uniformidad celular individual y en la orientación arquitectónica de células. La displasia se produce de forma característica cuando existe irritación o inflamación crónica. Los trastornos displásicos que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a displasia ectodérmica anhidrótica, displasia anterofacial, displasia torácica asfíxica, displasia auricular-digital, displasia broncopulmonar, displasia cerebral, displasia de cuello uterino, displasia condroctodérmica, displasia cleidocraneal, displasia ectodérmica congénita, displasia craneodiafisaria, displasia craneocarpotarsal, displasia craneomafisaria, displasia de la dentina, displasia diafisaria, displasia ectodérmica, displasia del esmalte, displasia encefalo-oftálmica, displasia epifisaria hemimélica, displasia epifisaria múltiple, displasia epifisaria punteada, displasia epitelial, displasia facioidigitogenital, displasia fibrosa familiar de mandíbulas, displasia plegada blanca familiar, displasia fibromuscular, displasia fibrosa ósea, displasia ósea florida, displasia renal-retiniana hereditaria, displasia ectodérmica hidrótica, displasia ectodérmica hipohidrótica, displasia tímica linfopénica, displasia mamaria, displasia mandibulofacial, displasia metafisaria, displasia de Mondini, displasia fibrosa monostótica, displasia mucoepitelial, displasia epifisaria múltiple, displasia oculoauriculovertebral, displasia oculodentodigital, displasia oculoverttebral, displasia odontogénica, displasia oftalmomandibulomélica, displasia cementaria periapical, displasia fibrosa poliostótica, displasia espondiloepifisaria pseudocondroplásica, displasia retiniana, displasia septoóptica, displasia espondiloepifisaria y displasia ventriculoradial.

Trastornos preneoplásicos adicionales que se pueden tratar incluyen, pero no se limitan a trastornos disproliferativos benignos (p. ej., tumores benignos, afecciones fibroquísticas, hipertrofia tisular, pólipos o adenomas intestinales y displasia esofágica), leucoplasia, queratosis, enfermedad de Bowen, piel de granjero, queilitis solar y queratosis solar.

En realizaciones preferidas, la invención se usa para inhibir el crecimiento, avance y/o metástasis de cánceres, en particular los citados antes.

Enfermedades, trastornos y/o afecciones hiperproliferativas adicionales incluyen, pero no se limita a avance y/o metástasis de tumores malignos y trastornos relacionados tales como leucemia (que incluyen leucemias agudas (p. ej., leucemia linfocítica aguda, leucemia mielocítica aguda (incluidas mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica y eritroleucemia)) y leucemias crónicas (p. ej., leucemia mielocítica crónica (granulocítica) y leucemia linfocítica crónica), policitemia vera, linfomas (p. ej., enfermedad de Hodgkin y enfermedad no Hodgkin), mieloma múltiple, macroglobulinemia de Waldenstrom, enfermedad de la cadena pesada y tumores sólidos que incluyen, pero no se limitan a sarcomas y carcinomas tales como fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteogénico, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomyosarcoma, rhabdomyosarcoma, carcinoma de colon, cáncer de páncreas, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinomas, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico,

carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilm, cáncer de cuello uterino, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón de células pequeñas, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, emangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma y retinoblastoma.

Vectores de expresión

También se describen secuencias de ADN que comprende un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, fragmento de anticuerpo, toxina o constituyente de proteína de fusión de una inmunotoxina, tal como una construcción DNL™. Las proteínas de fusión pueden comprender un anticuerpo o fragmento o toxina unido a, por ejemplo, un motivo de AD o DDD.

También se describen vectores de expresión que comprenden las secuencias de ADN codificantes. Los vectores pueden contener secuencias que codifican las regiones constantes de la cadena ligera y pesada y la región bisagra de una inmunoglobulina humana a la que se pueden unir secuencias de región variable quimérica, humanizada o humana. Los vectores pueden contener adicionalmente promotores que expresan la proteína o proteínas codificadas en una célula hospedante seleccionada, potenciadores y secuencias señal o líder. Los vectores que son particularmente útiles son pHL2 o GS. Más preferiblemente, las regiones constantes de la cadena ligera y pesada y la región bisagra pueden ser de una inmunoglobulina de mieloma EU humano, donde opcionalmente al menos uno de los aminoácidos en las posiciones del alotipo se cambia a la encontrada en un alotipo de IgG1 diferente, y en donde opcionalmente el aminoácido 253 de la cadena pesada de EU basada en el sistema de numeración de EU se puede sustituir por alanina. Véase, Edelman et al., *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 63: 78-85 (1969). En otras realizaciones, una secuencia de IgG1 se puede convertir en una secuencia de IgG4.

El experto en la técnica comprenderá que los métodos de construcciones de expresión genéticamente modificadas y la inserción en células hospedantes para expresar proteínas modificadas, son bien conocidos en la técnica y un asunto de experimentación rutinaria. Las células hospedantes y métodos de expresión de los anticuerpos clonados o fragmentos se han descrito, por ejemplo, en la patente de EE.UU. N° 7.531.327 y 7.537.930.

Kits

También se describen kits que contienen componentes adecuados para tratar o diagnosticar el tejido enfermo en un paciente. Los kits de ejemplo pueden contener una o más inmunotoxinas como se describe en la presente memoria. Si la composición que contiene los componentes para la administración no se formula para el suministro por el canal alimentario, tal como por suministro oral, se puede incluir un dispositivo capaz de suministrar los componentes del kit por alguna otra vía. Un tipo de dispositivo, para aplicaciones tales como el suministro parenteral, es una jeringa que se usa para inyectar la composición en el cuerpo de un sujeto. También se pueden usar dispositivos de inhalación. En algunas realizaciones, se puede proporcionar un agente terapéutico en forma de una jeringa precargada o bolígrafo de autoinyección que contiene una formulación líquida, estéril o preparación liofilizada.

Los componentes del kit se pueden envasar juntos o separados en dos o más recipientes. En algunas realizaciones, los recipientes pueden ser viales que contienen formulaciones liofilizadas estériles de una composición, que son adecuadas para reconstituir. Un kit también puede contener uno o más tampones adecuados para la reconstitución y/o dilución de otros reactivos. Otros recipientes que se pueden usar incluyen, pero no se limitan a una bolsa, bandeja, caja, tubo o similar. Los componentes del kit se pueden envasar y mantener de forma estéril con los recipientes. Otro componente que se puede incluir son instrucciones de uso para una persona que use el kit.

Ejemplos

Ejemplo 1. Producción y uso de complejos de DNL™ que muestra estabilidad, farmacocinética y eficacia mejoradas por unión de motivos de AD al extremo C-terminal de la cadena ligera de anticuerpo

Los autores de la invención exploraron la producción y uso de complejos de Dock-and-Lock™ (DNL™), que incorporan moléculas de IgG con un motivo de AD fusionado en el extremo C-terminal de la cadena ligera kappa (en lo sucesivo denominados complejos "C_k" o proteínas de fusión), en lugar del extremo C-terminal del Fc (en lo sucesivo denominado "C_H"). En el siguiente ejemplo, los complejos de C_k DNL™ también se indican con un asterisco (p. ej., 20*-2b). Dos prototipos de ejemplo derivados de C_k, un anticuerpo hexavalente biespecifico anti-CD22/CD20, que comprende epratuzumab (anti-CD22) y cuatro Fab de veltuzumab (anti-CD20), y una inmunocitoquina que se dirige a CD20, que comprende veltuzumab y cuatro moléculas de interferón-α2b, presentaban funciones efectoras de Fc potenciadas in vitro, así como farmacocinética, estabilidad y actividad anti-linfoma in vivo mejoradas, comparados con sus homólogos derivados de Fc. Estos resultados superiores inesperados favorecen el uso de conjugados de DNL™ con el diseño de C_k para el desarrollo clínico.

El C_k-IgG-IFNα, denominado 20*-2b, tiene un tamaño molecular y composición similares a su homólogo Fc-IgG-IFNα, 20-2b, comprendiendo cada uno veltuzumab y 4 copias del FNα2b fusionadas en los extremos C-terminales de las cadenas ligera o pesada, respectivamente. El C_k-bsHexAb, denominado 22*-(20)-(20), y su homólogo Fc-bsHexAb, 22-(20)-(20), comprendían cada uno epratuzumab y 4 Fabs de veltuzumab, que estaban conjugados en

los extremos C-terminales de las cadenas ligera y pesada, respectivamente. Comparado con los inmunoconjugados basados en Fc análogos, C_k-IgG-IFN α y C_k-bsHexAb eran más estables in vivo, eran eliminados más lentamente de la circulación y tenían función efectora de Fc mejorada, que potenciaba significativamente la eficacia in vivo.

Métodos

5 Anticuerpos y cultivo celular - Immunomedics proporcionó veltuzumab (IgG1 anti-CD20), epratuzumab (IgG1 anti-CD22), un mAb anti-IFN α murino, hMN-14 (labetuzumab), veltuzumab mAb antiidiotipo de rata (WR2), y un mAb antiidiotipo de rata para epratuzumab (WN). Los anticuerpos secundarios conjugados con HRP eran de Jackson Immunoresearch (Westgrove, PA). El suero bovino fetal (FBS) inactivado con calor se obtuvo de Hyclone (Logan, UT). Todos los demás medios de cultivo celular y complementos se adquirieron de Invitrogen Life Technologies (Carlsbad, CA). Las células SpESFX-10 (Rossi et al., 2011, *Biotechnol. Prog.* 27:766-775) y los clones de producción se mantuvieron en H-SFM. La línea celular Daudi se adquirió en ATCC y se cultivó en FBS-RPMI al 10% (Manassas, VA).

15 Construcciones de DNLTM - Los métodos para la producción de construcciones de DNLTM basadas en C_k se describen a continuación con mayor detalle. Para C_{H3}-AD2-IgG-veltuzumab, C_{H3}-AD2-IgG-epratuzumab, C_{H1}-DDD2-Fab-veltuzumab, e IFN α 2b-DDD2, la generación de los vectores de expresión de mamífero y los clones de producción, y su uso para la conjugación DNLTM de 20-2b y 22-(20)-(20), se han descrito previamente (Rossi et al., 2008, *Cancer Res.* 68:8384-8392; Chang et al., 2009, *Bioconjug. Chem.* 20:1899-1907; Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). C_k-AD2-IgG, se generó por ingeniería recombinante, de modo que el péptido AD2 se fusionó en el extremo C-terminal de la cadena ligera kappa (FIG. 1a). Debido a que el extremo C de C_k es un resto de cisteína, que forma un puente disulfuro con C_{H1}, se usó un conector "bisagra" de 16 restos de aminoácidos (SEQ ID NO: 122) para separar el AD2 del puente disulfuro de C_k-V_{H1}. El objetivo de este procedimiento era obtener la unión completa y actividades de todos los Fab y grupos efectores, mientras que se mantenía una función efectora de Fc completa. El objetivo último era mantener una Pk que se acerque a la de la IgG y prevenga la disociación intracelular de los módulos, lo cual supuestamente se produce por proteólisis después de absorción del complejo en la célula.

25 El primer módulo C_k-AD2-IgG se construyó para veltuzumab (hA20), con módulos C_k-AD2-IgG adicionales producidos posteriormente para milatuzumab (hLLI), epratuzumab (hLL2) y hR1(anti-IGF-1R). Estos módulos se han usado para generar anticuerpos hexavalentes e inmunocitoquinas, que se compararon con construcciones de composición similar que se hicieron con los correspondientes módulos C_{H3}-AD2-IgG. Los vectores de expresión de mamíferos para C_k-AD2-IgG -veltuzumab y C_k-AD2-IgG-epratuzumab se construyeron usando el vector pdHL2, que se usó previamente para la expresión de los módulos homólogos C_{H3}-AD2-IgG. Se sintetizó una secuencia de nucleótidos de 2208 pb (SEQ ID NO: 130) que comprendía la secuencia del vector pdHL2 que iba desde el sitio de restricción de *Bam HI* dentro del intrón V_k/C_k al sitio de restricción de *Xho I* 3' del intrón C_k, con la inserción de la secuencia codificante para el conector bisagra (EFPKPSTPPGSSGGAP, SEQ ID NO: 122) y AD2 en marco en el extremo 3' de la secuencia codificante para C_k. Esta secuencia sintética se insertó en los vectores de expresión IgG-pdHL2 para veltuzumab y epratuzumab por los sitios de restricción de *Bam HI* y *Xho I*. La generación de clones de producción con SpESFX-10 se llevó a cabo como se ha descrito para los módulos C_{H3}-AD2-IgG (Rossi et al., 2008, *Cancer Res.* 68:8384-8392; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). C_k-AD2-IgG-veltuzumab y C_k-AD2-IgG-epratuzumab se produjeron mediante clones de producción transfectados de forma estable en un cultivo discontinuo en botella giratoria, y se purificaron del líquido sobrenadante en una sola etapa usando cromatografía de afinidad de proteína A MABSELECTTM (GE Healthcare).

30 Siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente para 22-(20)-(20) (Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171), se conjugó C_k-AD2-IgG-epratuzumab con C_{H1}-DDD2-Fab-veltuzumab (FIG. 1b), un módulo basado en Fab derivado de veltuzumab, para generar el bsHexAb 22*-(20)-(20), donde el 22* indica el módulo de C_k-AD2 de epratuzumab y cada (20) simboliza un dímero estabilizado de Fab de veltuzumab (FIG. 1c). Las propiedades de 22*-(20)-(20) se compararon con las de 22-(20)-(20), el Fc-bsHexAb análogo que comprende C_{H3}-AD2-IgG-epratuzumab (FIG. 1d), que tiene composición y tamaño molecular similares, pero una arquitectura diferente.

35 Siguiendo el mismo procedimiento descrito previamente para 20-2b (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871), C_k-AD2-IgG-veltuzumab (FIG. 1a), se conjugó con IFN α 2b-DDD2, un módulo de IFN α 2b con un péptido de DDD2 fusionado en su extremo C-terminal (FIG. 1e), para generar 20*-2b (FIG. 1f), que comprende veltuzumab con un IFN α 2b dimérico fusionado en cada cadena ligera. Las propiedades de 20*-2b se compararon con las de 20-2b (FIG. 1g), que es el homólogo Fc-IgG-IFN α . Cada uno de los bsHexAbs e IgG-IFN α se aislaron de la mezcla de reacción por cromatografía de afinidad con MABSELECTTM.

40 Producción de vectores de ADN para la expresión de módulos de C_k-AD2-IgG - Se sintetizó una secuencia de ADN de 2208 pares de bases (SEQ ID NO: 130) que comprendía la secuencia del vector de expresión pdHL2 desde el sitio de restricción de *Bam HI* (dentro del intrón V_k/C_k) al sitio de restricción *Xho I* (que precede el casete de expresión de la cadena pesada), con la inserción de la secuencia codificante para el conector bisagra (SEQ ID NO: 122) y AD2 (SEQ ID NO: 4), en marco en el extremo 3' de la secuencia codificante para C_k. Esta secuencia sintética se insertó en los sitios de restricción de *Bam HI*/*Xho I* en el vector de expresión para veltuzumab (hA20-pdHL2) en una sola etapa de clonación, para generar C_k-AD2-IgG-hA20-pdHL2 (FIG. 11). Igualmente, el fragmento de 2208

pares de bases se insertó en los vectores de expresión pGSHL para for epratumab, milatumab y hR1 usando sitios de restricción Bam HI/Xho I (FIG. 12).

La secuencia de ácido nucleico sintética para la conversión de IgG-pdHL2 en CK-AD2-IgG- pdHL2 se muestra en la SEQ ID NO: 130. Los sitios de restricción 5' Bam HI y 3' Xho I están subrayados. La secuencia codificante para el péptido C_κ-conector bisagra-AD2 se muestra en negrita.

5

GGATCCCCGCAATTCTAAACTCTGAGGGGGTCCGGATGACGTGGCCATTCTTTGCCT
AAAGCATTGAGTTTACTGCAAGGTCAGAAAAGCATGCAAAGCCCTCAGAATGGC
TGCAAAGAGCTCCAACAAAACAATTTAGAACTTTATTAAGGAATAGGGGGAAGC
TAGGAAGAACTCAAACATCAAGATTTTAAATACGCTTCTTGGTCTCCTTGCTA
TAATTATCTGGGATAAGCATGCTGTTTTCTGTCTGTCCCTAACATGCCCTGTGATT
ATCCGCAAACAACACACCCAAGGGCAGAACTTTGTTACTTAAACACCATCCTGT
TGCTTCTTTCCCTCAGGAAGTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCT
GATGAGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCT
ATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTA
ACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCA
GCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCT
GCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGTGAGTTCCCTAAACCCAGCACTCCACCCGGATCTTCCGGCGGCGCTCC
CTGTGGCCAGATCGAGTACCTGGCCAAGCAGATCGTGGACAACGCCATCCAGCA
GGCCGGGTGCTAGAGGGAGAAGTGCCCCACCTGCTCCTCAGTTCAGCCTGACC
CCCTCCCATCCTTTGGCCTCTGACCTTTTTTCCACAGGGGACCTACCCCTATTGCG
GTCTCCAGCTCATCTTTCACCTCACCCCCCTCCTCCTCCTTGGCTTTAATTATGCT
AATGTTGGAGGAGAATGAATAAATAAAGTGAATCTTTGCACCTGTGGTTTCTCTC
TTTCTCATTTAATAATTATTATCTGTTGTTTTACCAACTACTCAATTTCTTTATA
AGGGACTAAATATGTAGTCATCCTAAGGCGCATAACCATTTATAAAAATCATCCT
TCATTCTATTTTACCCTATCATCCTCTGCAAGACAGTCCCTCCCTCAAACCCACAAG
CCTTCTGTCTCACAGTCCCCTGGGCCATGGTAGGAGAGACTTGCTTCTTGT
CCCCCTCAGCAAGCCCTCATAGTCTTTTTAAGGGTGACAGGTCTTACAGTCA
TATATCCTTTGATTCAATTCCCTGAGAATCAACCAAAGCAAATTTTTCAAAGAA
GAAACCTGCTATAAAGAGAATCATTTCATTGCAACATGATATAAAATAACAACAC
AATAAAAGCAATTAATAAACAACAATAGGGAAATGTTTAAAGTTCATCATGGT
ACTTAGACTTAATGGAATGTCATGCCTTATTTACATTTTTAAACAGGTAAGT
GACTCCTGTCTGCCAAGGGCCGTATTGAGTACTTTCCACAACCTAATTTAATCCA
CACTATACTGTGAGATTAATAAATTCATTAATAAATGTTGCAAAGGTTCTATAAAG
CTGAGAGACAAATATATTCTATAACTCAGCAATTCCCCTTCTAGGGGTTTCGACT
GGCAGGAAGCAGGTCATGTGGCAAGGCTATTTGGGGAAGGGAAAATAAAACCA
CTAGGTAAACTTGTAGCTGTGGTTTGAAGAAGTGGTTTTGAAACACTCTGTCCAG
CCCCACCAAACCGAAAGTCCAGGCTGAGCAAAACACCACCTGGGTAATTTGCAT
TTCTAAAATAAGTTGAGGATTCAGCCGAAACTGGAGAGGTCCTCTTTTAACTTAT
TGAGTTCAACCTTTTAATTTTAGCTTGAGTAGTTCTAGTTTCCCCAAACTTAAGTT
TATCGACTTCTAAAATGTATTTAGAATTTTCGACCAATTCTCATGTTTGACAGCTTA
TCATCGCTGCACTCCGCCGAAAAGTGGCTCGGCTCTGCCAAGGACGCGGGGC
GCGTACTATGCGTGGGCTGGAGCAACCGCCTGCTGGGTGCAAACCCTTTGCGCC
CGGACTCGTCCAACGACTATAAAGAGGGCAGGCTGTCTCTAAGCGTCACCACG
ACTTCAACGTCCTGAGTACCTTCTCCTCACTTACTCCGTAGCTCCAGCTTACCAG
ATCCCTCGAG (SEQ ID NO:130)

Producción y purificación de módulos de C_κ-AD2-IgG - el vector C_κ-AD2-IgG-hA20-pdHL2 se linearizó por digestión con la enzima de restricción Sal I y se transfeció en células de mieloma SpESFX-10 por electroporación. Después de la electroporación, las células se cultivaron en placas de cultivo tisular de 96 pocillos y se seleccionaron clones

transfectantes con metotrexato (MTX) 0,05 μ M. Los clones se cribaron según la expresión de proteína por ELISA tipo sándwich usando pocillos recubiertos con WR2 (hA20 anti-I δ) y detección con Fab de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

5 Los tres vectores de expresión C $_k$ -AD2-IgG-pGSHL se transfectaron de forma similar a la anterior, pero se cultivaron en medio exento de glutamina para la selección, en lugar de MTX. Los clones se cribaron según la expresión de proteína por ELISA tipo sándwich usando pocillos recubiertos anti-I δ s específicos de anticuerpo y detección con Fab de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa.

10 Los clones de mayor producción se expandieron y cultivaron en botellas giratorias para la expresión de proteínas. Los módulos de C $_k$ -AD2-IgG se purificaron usando cromatografía de afinidad de proteína A. La productividad de las líneas celulares era similar a la de la IgG o C $_{H3}$ -AD2-IgG. El SDS-PAGE reductor resolvió una banda de proteína para el polipéptido hA20 Kappa-AD2 con una movilidad relativa de acuerdo con su peso molecular calculado (26.951 Da) y mayor que hA20 Kappa (23.204 Da) (no se muestra). De forma esperada, los polipéptidos de la cadena pesada de C $_k$ -AD2-IgG-hA20 co-migraban con los de hA20 IgG.

15 Anticuerpos hexavalentes biespecíficos hechos por DNLTM con C $_k$ -AD2-IgG - Los anticuerpos hexavalentes biespecíficos (bsHexAbs) se generaron combinando los módulos de C $_k$ -AD2-IgG con módulos de C $_{H3}$ -DDD2-Fab de diferente especificidad y llevando a cabo la conjugación de DNLTM en condiciones de oxidorreducción suaves. Se produjeron seis bsHexAbs y un HexAb mono-específico y se caracterizaron, como se ilustra por la construcción denominada 20C $_k$ -(74)-(74) (alternativamente, 20 * -(74)-(74)), donde el primer código (20C $_k$ o 20 *) indica el módulo C $_k$ -AD2-IgG y los códigos entre paréntesis indican módulos de Fab-DDD2 diméricos estabilizados. Por lo tanto, 20C $_k$ -(74)-(74) (o 20 * -(74)-(74)) comprende veltuzumab (anti-CD20) fusionado con cuatro Fab anti-CD74 derivados de milatuzumab. Las partes componentes de los 7 HexAbs se dan en la tabla 7.

Tabla 7. Anticuerpos hexavalentes biespecíficos que se dirigen a tumores malignos de linfocitos B

HexAb	Módulo de IgG-AD2 (mAb original)	Módulo de Fab-DDD2 (mAb original)	Valencia		
			CD20	CD22	CD74
20C $_k$ -(22)-(22)	C $_k$ -AD2-IgG-hA20 (veltuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hLL2 (epratuzumab)	2	4	
20C $_k$ -(74)-(74)	C $_k$ -AD2-IgG-hA20 (veltuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hLL1 (milatuzumab)	2		4
20C $_k$ -(20)-(20)	C $_k$ -AD2-IgG-hA20 (veltuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hA20 (veltuzumab)	6		
22C $_k$ -(20)-(20)*	C $_k$ -AD2-IgG-hLL2 (epratuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hA20 (veltuzumab)	4	2	
22C $_k$ -(74)-(74)	C $_k$ -AD2-IgG-hLL2 (epratuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hLL1 (milatuzumab)		2	4
74C $_k$ -(20)-(20)	C $_k$ -AD2-IgG-hLL1 (milatuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hA20 (veltuzumab)	4		2
74C $_k$ -(22)-(22)	C $_k$ -AD2-IgG-hLL1 (milatuzumab)	C $_{H3}$ -DDD2-Fab-hLL2 (epratuzumab)		4	2

*Hexavalente mono-específico

25 Cada uno de los HexAb se produjo y se purificó de una forma similar. Se proporciona una descripción detallada de una preparación de 22 * -(20)-(20) como un ejemplo. Un exceso molar de C $_{H3}$ -DD2-Fab-hA20 (42 mg) se mezcló con 25 mg de C $_k$ -AD2-IgG-hLL2 en tampón de Tris-Citrato (pH 7,5 \pm 0,2). Se añadieron glutatión reducido y EDTA 2 mM y 1 mM, respectivamente, y la reacción se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente, antes de la adición de glutatión oxidado 4 mM y una incubación adicional de 4 horas a temperatura ambiente. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de cromatografía (proteína A) MABSELECTTM de 5 ml, que se lavó con PBS antes de elución del bsHexAb con citrato 0,1 M, pH 3,5. La construcción 22 * -(20)-(20) se dializó en PBS 0,04 M, pH 7,4. Se recuperaron un total de 56 mg de 22 * -(20)-(20), que representaba 96% de rendimiento. La HPLC de exclusión por tamaño molecular (SE-HPLC) dio un solo pico de proteína homogénea con un tiempo de retención de acuerdo con una proteína de peso molecular de ~368 kDa (no se muestra). El pico de SE-HPLC para los bsHexAb basados en C $_k$ -AD2 apareció con un tiempo de retención ligeramente más largo comparado con los correspondientes bsHexAb basados en C $_{H3}$ -AD2 (no se muestra), que tienen una composición y peso molecular similares, indicando que el primero tiene un radio de Stokes menor y son moléculas más compactas, comparadas con el último.

40 20(C $_k$)-2b, una inmunocitoquina IgG-IFN α basada en C $_k$ -AD2-IgG-hA20 - Se preparó una inmunocitoquina que comprende veltuzumab fusionado con cuatro grupos IFN α 2b usando el método de DNLTM combinando C $_k$ -AD2-IgG-hA20 con IFN α 2b-DDD2 (FIG. 1f). C $_k$ -AD2-IgG-hA20 (54 mg) se combinó con 81,1 mg de IFN α -DDD2. Se añadieron EDTA (1 mM) y glutatión reducido (2 mM) y la disolución se mantuvo durante 5 horas a temperatura ambiente. Se añadió glutatión oxidado (4 mM) a la mezcla, que se mantuvo durante la noche a temperatura ambiente. El 20 * -2b se purificó hasta casi homogeneidad usando dos etapas de cromatografía de afinidad

secuenciales. Primero, se aplicó la mezcla de reacción a una columna de 4 ml MABSELECT™ (Proteína A). La proteína eluyó con 4 volúmenes de columna (16 ml) de Polisorbato-80 al 0,02%, citrato 50 mM, pH 3,5 directamente en 16 ml de P-80 al 0,02%, imidazol 80 mM, NaCl 1 M, Na₂HPO₄ 100 mM y la disolución se ajustó a pH 7,3 con Na₂HPO₄ 50 mM, imidazol 40 mM, NaCl 500 mM. El eluyente ajustado se aplicó a una columna de 8 ml de Ni-SEPHAROSE® 6 FF equilibrada con P-80 al 0,02%, imidazol 40 mM, NaCl 0,5 M, NaPO₄ 50 mM, pH 7,5. Se eluyeron un total de 85 mg de 20(C_k)-2b con 5 volúmenes de columna de imidazol 500 mM, P-80 al 0,02%, NaCl 50 mM, NaH₂PO₄ 20 mM, pH 7,5.

El análisis por SE-HPLC dio un pico de proteína principal para 20*-2b con un tiempo de retención de acuerdo con una proteína de ~250 kDa (no se muestra). El pico de 20*-2b apareció con un tiempo de retención más largo que el de 20-2b, que comprende los mismos componentes (veltuzumab y cuatro IFN α 2b) y tiene un peso molecular similar, indicando que el primero tiene un radio de Stokes menor y es más compacto que el último, similar a lo que se observó para los HexAb.

Métodos analíticos - La cromatografía líquida de alto rendimiento con exclusión por tamaño molecular (SE-HPLC) se llevó a cabo usando columnas UHR SEC de 4 μ m (Waters Corp., Milford MA). El análisis por SDS- PAGE se llevó a cabo usando gradiente de geles de Tris-glicina de 4 - 20% (Invitrogen, Gaithersburg, MD). El IEF se llevó a cabo a 1000 V, 20 mM y 25 vatios durante 1 h, usando pH 6 -10,5 placas de IEF de agarosa ISO GEL® (Lonza, Basel, Suiza) en una celda de electroforesis horizontal BIO-PHORESIS® (Bio-Rad, Hercules, CA). Todos los ensayos colorimétricos (ELISA y MTS) y fluorométricos (CDC y ADCC) se cuantificaron en un lector de placa ENVISION® 2100 Multilabel (PerkinElmer, Waltham, MA).

Unión a células - La unión a células se midió por citometría de flujo en un GUAVA® PCA usando el software de GUAVA® Express (Millipore Corp., Billerica, MA). Veltuzumab y 20*-2b se marcaron con ficoeritrina (PE) usando un kit de marcaje de IgG humana ZENON® R-Phycoerythrin siguiendo el protocolo del fabricante (Invitrogen, Molecular Probes). Se incubaron células Daudi con el PE-veltuzumab y PE-20*-2b (0,1 - 15 nM) durante 30 min a temperatura ambiente y se lavaron con BSA-PBS al 1% antes del análisis. Las gráficas de concentración frente a intensidad media de fluorescencia (MFI) se analizaron por regresión lineal.

Citotoxicidad in vitro. Las células Daudi se pusieron en placas de 96 pocillos con 10.000 células/pocillo y se incubaron a 37°C durante 3 días en presencia de concentraciones crecientes de 20*-2b o 20-2b. Las densidades de las células viables se determinaron usando el ensayo de proliferación celular de CELLTITER 96® basado en MTS (Promega, Madison, WI).

Mediciones de unión a FcRn - La unión a FcRn se evaluó por resonancia de plasmones de superficie en un instrumento BIACORE® X (GE Healthcare) siguiendo los métodos de Wang et al. (2011, *Drug Metab Dispos.* 39:1469-1477). Se generó FcRn monocatenario soluble siguiendo los métodos de Feng et al. (2011, *Protein Expr. Purif.* 79:66-71). El dominio extracelular de la cadena pesada de FcRn humano se fusionó con β 2-microglobulina por un conector peptídico flexible. La proteína de fusión se expresó usando un vector pdHL2 modificado en células SpESFX-10 de transfección, y se purificó usando Ni-Sepharose. El scFcRn purificado se inmovilizó sobre un chip biosensor CM5 usando un kit de acoplamiento de amina (GE Healthcare) hasta una densidad de ~600 unidades de respuesta (RU). Los artículos de ensayo se diluyeron con tampón de ejecución a pH 6,0 [NaPO₄ 50 mM, NaCl 150 mM, y tensioactivo 20 al 0,05% (v/v)] hasta 400, 200, 100, 50, y 25 nM y se unieron al scFcRn inmovilizado durante 3 min para alcanzar el equilibrio, seguido de 2 min de disociación con el caudal a 30 μ l/min. El chip sensor se regeneró con tampón de ejecución a pH 7,5 entre ejecuciones. Para determinar la afinidad de unión a FcRn (K_D) a pH 6,0, se usaron los datos de las cinco concentraciones simultáneamente para ajustar un modelo de reacción de dos estados (software BIAevaluation; GE Healthcare). La bondad del ajuste se indicó por los valores de χ^2 .

Análisis PK - Se compararon la farmacocinética (Pk) y estabilidad in vivo entre 20*-2b y 20-2b después de inyección intravenosa (i.v.) o subcutánea (s.c) en ratones. Se administró a grupos de 18 ratones Swiss-Webster dosis de 1 mg de 20*-2b o 20-2b por inyección i.v. o s.c. Se usaron 3 ratones por tiempo de medición, los animales se sacrificaron y se extrajo la sangre a las 6, 16, 24, 48, 72 y 96 horas. Por lo tanto, cada muestra de suero representa un animal/tiempo de medición independiente. Para la medición del IgG-IFN α intacto y total (intacto más disociado), los pocillos de microvaloración se recubrieron por adsorción de WR2, un anticuerpo de rata anti-Id para veltuzumab, con 5 μ g/ml en Na₂CO₃ 0,5 M, pH 9,5. Después de bloqueo con BSA-PBS al 2%, las diluciones de suero en tampón de anticuerpo (gelatina al 0,1%, proclina al 0,05%, Tween-20 al 0,05%, NaCl 0,1 M, NaPO₄ 0,1 M, pH 7,4) se incubaron en los pocillos recubiertos durante 2 h. Para la medición de IgG-IFN α intacto, los pocillos se detectaron por sonda con un mA b anti-IFN α de ratón (5 μ g/ml en tampón de anticuerpo) durante 1 h, seguido de detección con anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc de ratón conjugado con HRP. Para la medición de la IgG veltuzumab total, los pocillos se detectaron por sonda con anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humana conjugado con HRP durante 1 h.

Para la medición de los bsHexAb intactos y totales, pocillos de microvaloración se recubrieron por adsorción de WN, un anticuerpo anti-idiotipo de rata contra epratuzumab. Se incuaron diluciones seriadas en los pocillos recubiertos durante 2 h. Para la detección de los bsHexAb intactos, los pocillos se detectaron por sonda con WR2 conjugado con HRP (1 μ g/ml en tampón de anticuerpo) durante 1 h. Para la detección del IgG de epratuzumab, los pocillos se detectaron por sonda con anticuerpo de cabra anti-IgG-Fc humana conjugado con HRP durante 1 h.

La señal se reveló con disolución de sustrato de dihidrocloruro de o-fenilendiamina y se midió la DO a 490 nM. La concentración de las especies intacta y total se extrapola a partir de las curvas de referencia específicas de la construcción. La Pk se analizó usando el paquete de software WINNONLIN® Pk (v5.1; Pharsight Corp.; Mountain View, CA).

5 Métodos in vivo y ex vivo - La inyección y recogida de suero de conejos se llevó a cabo en Biological Laboratories (Pipersville, PA). Para los estudios Pk, se inyectaron a 10 ratones Swiss-Webster macho de 10 semanas de edad (Taconic, Germantown, NY) y conejos blancos de Nueva Zelanda, por vía subcutánea (SC) y también intravenosa (IV) para los ratones, agentes de ensayo diluidos en PBS. Se obtuvieron muestras de sangre por punción cardiaca y de la vena de la oreja para ratones y conejos, respectivamente. Se aisló el suero de la sangre coagulada por
10 centrifugación y se diluyó con tampón de anticuerpo, antes del análisis por ELISA.

Se recogieron muestras de sangre humana de donantes sanos. La actividad de ADCC y CDC se ensayaron como se ha descrito previamente (Rossi et al., 2008, *Cancer Res.* 68, 8384- 8392). Para la ADCC, se incubaron células Daudi durante 4 h a 37°C con PBMC, que se aislaron de sangre de donantes sanos, con una relación de efector:objetivo 50:1 usando agentes de ensayo 33 nM.

15 Eficacia in vivo en ratones - Se inoculó a ratones SCID homocigotos C.B.17 de 8-12 semanas de edad (Taconic) por vía intravenosa $1,5 \times 10^7$ células Daudi el día 0. Para comparación de los bsHexAb, se administró tratamiento por inyección SC los días 1 y 5. Para comparación de los IgG-IFN α , los tratamientos se administraron como una sola inyección SC el día 7. Se usó solución salina como un tratamiento de control. Los animales, vigilados diariamente, se sacrificaron compasivamente cuando desarrollaron parálisis de las extremidades traseras o si se volvieron moribundos de otra forma. Además, los ratones se sacrificaron si perdían más de 20% de su peso corporal inicial. Las curvas de supervivencia se analizaron usando gráficas de Kaplan-Meier, usando el paquete de software Prism (v4.03) (GraphPad Software, Inc., San Diego, CA). Algunos valores atípicos determinados por ensayo Z crítico se censuraron de los análisis.

20 Análisis estadísticos - Se determinó la significación estadística ($P < 0,05$) usando las pruebas de la T de Student para todos los resultados excepto para las curvas de supervivencia in vivo, que se evaluaron por análisis de log-rank.

Resultados

Síntesis de inmunocombinados basados en C κ - La síntesis de DNL™ produjo preparaciones homogéneas de 22*-(20)-(20), 22-(20)-(20), 20*-2b y 20-2b. Por SDS-PAGE (no reductora), cada conjugado se resolvió en un grupo estrecho de bandas con movilidad relativa de acuerdo con su tamaño esperado (no se muestran los datos) y en condiciones reductoras, solo eran evidentes las bandas que representan los polipéptidos constituyentes para cada conjugado, demostrando un grado alto de pureza (no se muestra). Para cada conjugado, la SE-HPLC dio un pico principal que tenía un tiempo de retención de acuerdo con su tamaño molecular (no se muestra). Los tiempos de retención más largos observados para 22*-(20)-(20) y 20*-2b se deben probablemente a su estructura más compacta, comparados con 22-(20)-(20) y 20-2b, respectivamente. El enfoque isoeléctrico mostró que 20*-2b y 20-2b tienen un pI similar (pI calculado = pH 7,22), sin evidencia de módulos de IgG-AD2 (pI = pH 7,86) o IFN α 2b-DDD2 (pI = pH 6,87) sin reaccionar.

40 Ambos conjugados retienen la unión completa de los mAb originales, como se muestra para 20*-2b, que presentaba unión idéntica que veltuzumab a células vivas Daudi (FIG. 6). La citotoxicidad también era similar entre las versiones de C κ y Fc en células Daudi ($EC_{50} = 0,2$ pM), demostrando unión a CD20 equivalente y actividad específica de IFN α (FIG. 7).

Farmacocinética - Se ha descrito previamente que los T $_{1/2}$ para los Fc-bsHexAb eran aproximadamente la mitad de prolongados que sus mAb originales en ratones (Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). En el estudio inicial, que medía las concentraciones en el suero de 22*-(20)-(20), 22-(20)-(20) y epratuzumab en ratones a lo largo de un periodo de 72 h después de inyección subcutánea (SC) (FIG. 2a), 22-(20)-(20) alcanzaba la concentración máxima a las 16 h y era eliminado con un T $_{1/2}$ de aproximadamente 1 día, similar a los hallazgos anteriores. En comparación, tanto epratuzumab como 22*-(20)-(20) alcanzaban niveles máximos entre 24 h y 48 h, mientras que se eliminaban de forma similar, pero más despacio que 22-(20)-(20). Un estudio posterior que vigilaba la eliminación a lo largo de 5 días encontró de nuevo que 22*-(20)-(20) tenía Pk superior, mostrando una concentración máxima ~2 veces mayor en el suero, con un T $_{1/2}$ y tiempo medio de permanencia (MRT) mayores, terminando con un área bajo la curva (AUC) 3,8 veces mayor. (FIG. 2b; Tabla 8).

50 Como en los ratones, los parámetros k determinados en los conejos, eran ~2 veces mayores para 22*-(20)-(20), dando como resultado un AUC 3,3 veces mayor, comparado con 22-(20)-(20) (FIG. 2c y d; Tabla 8). Es importante, que las concentraciones de 22*-(20)-(20) después de administración SC tanto en ratones como en conejos se mantenían durante periodos más largos.

55

Tabla 8. Resumen de los parámetros farmacocinéticos

Especie	Vía	Dosis	Construcción	T _{1/2} (h)	T _{máx} (h)	C _{máx} (µg/ml)	AUC(0-∞) (h*µg/ml)	MRT (h)
Ratón	IV	1,0	20*-2b	36,2	6,0	649,0	32516,5	55,2
			20-2b	17,1	6,0	629,8	15514,0	19,1
Ratón	SC	1,0	20*-2b	37,9	16,0	312,1	18318,2	62,1
			20-2b	16,0	16,0	146,0	6498,6	30,9
Ratón	SC	0,5	22*-(20)-(20)	106,5	24,0	50,6	6704,7	153,1
			22-(20)-(20)	54,5	16,0	26,5	1752,9	85,2
Conejo	SC	18	22*-(20)-(20)	117,9	53,3	31,6	6079,1	179,6
			22-(20)-(20)	51,1	37,3	17,8	1838,4	89,2

T_{1/2}, semivida de eliminación; T_{máx}, tiempo de concentración máxima; C_{máx}, concentración máxima; AUC, área bajo la curva; MRT, tiempo medio de permanencia.

- 5 La afinidad de unión (K_D) de los bsHexAb para el receptor de Fc neonatal (FcRn) se evaluó por resonancia de plasmones de superficie y se encontró que era 66 y 310 nM para 22*-(20)-(20) y 22-(20)-(20), respectivamente (P = 0,01). La afinidad de epratuzumab (16 nM) era aproximadamente 10 veces más fuerte que la de 22*-(20)-(20) (P=0,007) (Tabla 9).

Tabla 9. Resumen de análisis Biacore para la afinidad de unión al receptor Fc neonatal

	Epratuzumab			22*-(20)-(20)			22-(20)-(20)		
	k _d	k _a	K _D	k _d	k _a	K _D	k _d	k _a	K _D
Experimento 1	0,0242	1,64x10 ⁶	15,0	0,0395	2,80x10 ⁵	141,1	0,0458	1,48x10 ⁵	309,5
Experimento 2	0,0218	1,56x10 ⁶	17,9	0,0404	2,26x10 ⁵	178,8	0,0411	1,54x10 ⁵	266,9
Experimento 3	0,0239	1,56x10 ⁶	15,8	0,0441	2,48x10 ⁵	177,8	0,0419	1,19x10 ⁵	352,1
Media	0,0233	1,59x10 ⁶	16,3	0,0413	2,51x10 ⁵	165,9	0,0429	1,40x10 ⁵	309,5
± D.E.	±0,0013	±4,62x10 ⁴	±1,5	±0,0024	±2,72x10 ⁴	±21,5	±0,0025	±1,87x10 ⁴	±42,6

k_d = 1/s; k_a = 1 /Ms; K_D = k_d/k_a dado como concentración nM

- 10 Las construcciones de Fc-IgG-IFNα, tales como 20-2b, también eran eliminadas de la circulación más rápido que su mAb original (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871). Sin embargo, cuando se compararon los parámetros Pk de 20*-2b y 20-2b después de inyección bien SC o intravenosa (IV) (FIG. 3), el T_{1/2}, C_{máx}, y MRT era cada uno de nuevo aproximadamente 2 veces mayor para 20*-2b, dando como resultado un AUC 2,8 veces mayor, comparado con 20-2b (Tabla 8). Para la administración IV, 20*-2b tenía un T_{1/2} y MRT 2 y 2,8 veces más largo, respectivamente, y un AUC 2 veces mayor.

- 15 Estabilidad in vivo - Los Fc-bsHexAbs y Fc-IgG-IFNα son estables ex vivo en el suero (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). Sin embargo, el análisis de muestras de suero de estudios Pk anteriores sugería que estas construcciones se disocian in vivo a lo largo del tiempo, supuestamente por procesamiento intracelular. Los autores de la invención compararon la estabilidad in vivo de 20*-2b y 20-2b midiendo las concentraciones de IgG-IFNα intacto y el veltuzumab total, lo que permitía diferenciar las especies intactas de las disociadas (FIG. 3c). El % de IgG-IFNα intacto se representó frente al tiempo (FIG. 3d), y se calcularon las velocidades de disociación para 20-2b y 20*-2b por regresión lineal de 0,97%/h y 0,18%/h, respectivamente. Se llevó a cabo un análisis similar en muestras de suero después de inyección SC de bsHexAbs en ratones, con velocidades de disociación in vivo para 22-(20)-(20) y 22*-(20)-(20) calculadas de 0,55%/h y 0,19%/h, respectivamente (FIG. 8).
- 20 Es interesante, que tanto 22-(20)-(20) como 22*-(20)-(20) eran completamente estables in vivo después de inyecciones SC en ratones (FIG. 9). La razón para la diferencia de estabildades in vivo entre ratones y conejos no se conoce.

Función efectora - Los autores de la invención describieron que Fc-IgG-IFNα y Fc-bsHexAb no inducían CDC medible in vitro, incluso cuando su mAb original tenía una potente actividad (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-

3871; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). De acuerdo con resultados previos, veltuzumab presentaba una CDC fuerte, mientras que no había actividad evidente para 20-2b (FIG. 4a). Sin embargo, 20*-2b inducían CDC fuerte, que se acercaba a la potencia de veltuzumab (FIG. 4a). En estas condiciones in vitro, epratuzumab carecía de CDC, mientras que 22-(20)-(20) lograba un aumento modesto, y 22*-(20)-(20) inducía incluso mayor actividad, que era ~10 veces menos potente que veltuzumab (Fig. 4b).

A diferencia de la CDC, los conjugados basados en Fc no tenían ADCC reducida, sino que en su lugar 20-2b presentaba ADCC potenciada comparado con veltuzumab (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871). Dependiendo del donante de PBMC, epratuzumab inducía poca o no inducía ADCC in vitro, y no sorprendentemente, 22-(20)-(20) no mostraba una mejora estadísticamente significativa (FIG. 4c). Sin embargo, la ADCC asociada con 22*-(20)-(20) no era significativamente diferente de la de veltuzumab, cuando se usaban las PBMC de un donante con ADCC alta (FIG. 4c). Con un donante de PBMC con ADCC baja, 22*-(20)-(20) tenía actividad potenciada (11,4% de lisis), comparado con epratuzumab (2.3%) y 22-(20)-(20) (4,3%), pero era menor que la de veltuzumab (18,5%) ($P=0,0326$, no se muestran los datos).

Eficacia in vivo - Como se ha descrito previamente, 20-2b es notablemente potente en el tratamiento de ratones que llevan xenoinjertos de linfoma de Burkitt Daudi humano, que son muy sensibles a la muerte directa por IFN α (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871). Usando el mismo modelo, los conjugados basados en C_k demostraron actividad antitumoral incluso más potente que sus homólogos basados en Fc (FIG. 5a). Aunque tanto 20-2b como 20*-2b con una sola dosis de 1 μ g curaron a la mayoría de los animales, con tiempo medio de supervivencia (MST) mayor de 189 días, 20*2b, pero no 20-2b, con 0,25 μ g mantenía su potencia, proporcionando evidencia de la eficacia terapéutica significativamente mejor (MST >189 días con 7/8 curas para 20*2b frente a 134,5 con solo 3/8 supervivientes para 20-2b; $P=0,0351$). Un equivalente molar de veltuzumab (0,6 μ g) frente a 1 μ g de 20-2b aumentaba el MST en solo 12,5 días frente al control de disolución salina. La superioridad de otra construcción de C_k diferente frente a la construcción de Fc original se mostró de nuevo en el modelo de Daudi diseminado, donde se administraron a los animales dos inyecciones (días 1 y 5) de dosis alta (1 mg) o baja (10 μ g) de 22*-(20)-(20) o 22-(20)-(20) (FIG. 5b). Para la dosis alta, el MST era >123 y 71 días con 100% y 10% de supervivencia para 22*-(20)-(20) y 22-(20)-(20), respectivamente ($P<0,0001$). Con el tratamiento de dosis baja, el MST era 91 días para 22*-(20)-(20) con 2 ratones que sobreviven, comparado con 50,5 días para 22-(20)-(20) sin supervivientes ($P=0,0014$). Dosis más altas de cada bsHexAb mejoraron la supervivencia significativamente más ($P<0,0001$) que epratuzumab solo o en combinación con C_{H1}-DDD2-Fab-veltuzumab, que se administraron con un equivalente molar frente a la dosis de 1 mg de bsHexAb. Con la dosis 100 veces menor, ambos bsHexAb eran superiores a la dosis alta de epratuzumab ($P<0,003$), y 22*-(20)-(20), pero no 22-(20)-(20), era superior a la dosis alta de epratuzumab más C_{H1}-DDD2-Fab-veltuzumab ($P<0,0001$).

Discusión

Los diferentes formatos de proteínas de fusión basadas en anticuerpos, incluyendo bsAb (Kontermann, 2010, *Curr Opin Mol Ther* 12:176-183) e inmunocitoquinas (Kontermann, 2012, *Arch Biochem Biophys* 526:194-205), se pueden clasificar ampliamente en tres grupos, basados en donde se fusionan los motivos adicionales en la IgG entera, un Fc o un fragmento de unión al antígeno, tal como Fab, scFv o diacuerpo. Mientras que la fusión con Fc puede aumentar el T_{1/2}, y la fusión con fragmentos de unión al antígeno impartiría direccionamiento, solo con la fusión con IgG se podría esperar lograr un anticuerpo director, función efectora de Fc completa y Pk notablemente extendida. Debido a que no todos los diseños de fusión de IgG creados son iguales, se sabe que las actividades efectoras y la Pk varían ampliamente entre los diferentes formatos e incluso entre construcciones particulares del mismo diseño.

Los complejos de DNLTM son excepcionales para producir inmunoconjugados que retienen la avidéz de unión por el antígeno completa del anticuerpo director y la actividad biológica de las moléculas efectoras añadidas (p. ej., citoquinas), y tienen una potente eficacia tanto in vitro como in vivo (Rossi et al., 2012, *Bioconjug. Chem* 23:309-323; Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171; Rossi et al., 2010, *Cancer Res.* 70:7600-7609; Rossi et al., 2011, *Blood* 118:1877-1884). Sin embargo, Fc-bsHexAb y Fc-IgG-IFN α eran eliminados de la circulación a una velocidad aproximadamente doble que sus mAb originales. La Pk subóptima es una deficiencia común asociada con los inmunoconjugados que se atribuye principalmente a la unión dinámica alterada al FcRn (Kuo y Aveson, 2011, *MAbs*. 3:422-430). Para mejorar la Pk, los autores de la invención diseñaron una nueva clase de módulo de IgG-AD2 que tenía el péptido de AD2 fusionado en el extremo C-terminal de la cadena ligera. El nuevo módulo se usó para ensamblar C_k-bsHexAb y C_k-IgG-IFN α , que no solo presentaba propiedades in vitro comparables con las de los homólogos basados en Fc, incluyendo la unión al antígeno, actividad específica de IFN α y citotoxicidad in vitro, sino también tenían Pk, estabilidad in vivo y actividad efectora de Fc superiores, lo cual en conjunto da como resultado una mayor eficacia in vivo, comparada con los homólogos ya potentes basados en Fc.

La Pk superior de los C_k-bsHexAb y C_k-IgG-IFN α se atribuye lo más probablemente a su mayor afinidad de unión al FcRn, que era dos veces más fuerte a pH 6,0 para 22*-(20)-(20), comparado con 22-(20)-(20). La unión a FcRn es mediada por las partes de los dominios C_{H2} y C_{H3} de la IgG, con sitios de contacto críticos situados cerca del extremo C-terminal del Fc (Huber et al., 1993, *J Mol Biol* 230:1077-1083; Raghavan et al., 1994, *Immunity*. 1:303-315). Considerando que el T_{1/2} de 22*-(20)-(20) estaba en el intervalo del de epratuzumab (Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171), no era previsible que la unión a FcRn fuera aproximadamente 10 veces más débil para el primero

(155 nM). Sin embargo, usando este mismo método, se midió la K_D de FcRn a 42 y 92 nM para otros mAb humanizados, que típicamente tienen P_k similar a la de epratuzumab (no se muestran los datos). El $T_{1/2}$ no está necesariamente correlacionado con la K_D de FcRn a pH 6,0 (Dall'Acqua, 2002, *J Immunol* 169:5171-5180; Gurbaxani et al., 2006, *Mol Immunol* 43, 1462-1473). Se ha sugerido que la velocidad de disociación a pH 7,4 es igualmente importante o quizás más en la determinación de $T_{1/2}$ (Wang, 2011, *Drug Metab Dispos.* 39:1469-1477). Aunque los contactos de FcRn:IgG se limitan al dominio Fc, el dominio de unión al antígeno puede tener un impacto negativo en la unión de FcRn, como se pone de manifiesto por el hecho de que la mayoría de los anticuerpos terapéuticos comparten un Fc muy similar (IgG₁), aunque varían ampliamente en K_D y $T_{1/2}$ de FcRn (Suzuki, 2010, *J Immunol* 184:1968-1976). Factores adicionales incluyen endocitosis, relación ligando:anticuerpo, estabilidad estructural del anticuerpo, pl del anticuerpo y oxidación de metionina (Kuo & Aveson, 2011, *MABs.* 3:422-430).

Para las proteínas de fusión, el K_D y $T_{1/2}$ de FcRn pueden influir la naturaleza y localización de la pareja de fusión (Suzuki et al., 2010, *J Immunol* 184:1968-1976; Lee et al., 2003, *Clin Pharmacol Ther* 73, 348-365). Se observó que el $T_{1/2}$ para cada IgG-IFN α era más corto que para el correspondiente bsHexAb que se ensamblaba usando la misma clase de módulo de IgG-AD2. Por ejemplo, el $T_{1/2}$ de 20*-2b (37,9 h) era notablemente más corto que el de 22*-(20)-(20) (106,5 h), sugiriendo que, independientemente de su localización, los grupos IFN α tienen un impacto negativo en la unión de FcRn, quizás disminuyendo el pl del aducto.

El presente ejemplo identifica el extremo C-terminal de la cadena ligera como la localización más ventajosa para la fusión con la IgG. Una inmunocitoquina de IL-12 monocatenaria fusionada con el extremo N-terminal de la cadena pesada de un anticuerpo anti-HER2 IgG₃ retenía la unión a HER2 (Peng et al., 1999, *J Immunol* 163:250-258)¹⁷. Se aplicó una estrategia similar usando DNL™ construyendo un módulo de IgG-AD2 que tenía el péptido de AD2 fusionado al extremo N-terminal de la cadena pesada de veltuzumab. Sin embargo, los bsHexAb e IgG-IFN α hechos con este módulo no se unían a CD20 en las células (no se muestran los datos). Esto podía deberse al tamaño grande de los grupos (Fab)₂ o (IFN α 2b)₂ adicionales. El que estos conjugados se unan a mAb antiidiotipo sugiere que la naturaleza del antígeno, que es un bucle extracelular pequeño de CD20, podría ser un factor. El extremo C-terminal de la cadena pesada es la localización más común y conveniente para la fusión con IgG (Kontermann, 2012, *Arch Biochem Biophys* 526:194-205). Sin embargo, esta también es la localización más probable para tener impacto negativo en la unión a FcRn y la P_k . Por ejemplo, una inmunocitoquina de GM-CSF fusionada en el extremo C de la cadena pesada de una IgG₃ anti-HER2 presentaba $T_{1/2}$ notablemente reducido (10 horas) comparado con el mAb original (110 horas) (Dela Cruz et al., 2000, *J Immunol* 165:5112-5121). Los bsAb basados en Fc también sufren P_k reducida. Como un ejemplo, un bsAb que tiene un scFv anti-IGF-1R fusionado en el extremo C-terminal de la cadena pesada de una IgG anti-EGFR era eliminado de la circulación en ratones dos veces más rápido ($T_{1/2}$ = 9,93 h), comparado con el mAb original ($T_{1/2}$ = 20,36 h) (Dong et al., 2011, *MABs.* 3:273-288).

Croasdale y colaboradores estudiaron sistemáticamente el efecto de la localización de la fusión con bsAb tetravalentes de IgG-scFv usando una IgG₁ anti-IGF-1R fusionada en los extremos C o N de las cadenas pesadas o ligeras, con un scFv anti-EGFR (Croasdale et al., 2012, *Arch. Biochem Biophys* 526:206-18). La fusión de scFv a la IgG en el extremo C de la cadena ligera producía los rendimientos más altos, tenía el $T_{1/2}$ más prolongado y era la más efectiva in vivo. Los autores indicaban que cada construcción se unía a FcRn y Fc γ R1IIa; sin embargo, no se daba la K_D . Entre los diferentes formatos, la fusión C-terminal de la cadena pesada tenía el $T_{1/2}$ más corto. La fusión en el extremo N o C de la cadena pesada daba como resultado ADCC sustancialmente reducida o pérdida completa, respectivamente. Alternativamente, la fusión en el extremo C de la cadena ligera no disminuía la ADCC.

Los resultados de los autores de la invención muestran que la localización de la fusión puede tener impacto en la ADCC. Para los bsHexAb que comprenden epratuzumab como la IgG, que tiene ADCC mínima, se midió una fuerte ADCC para 22*-(20)-(20), pero no para 22-(20)-(20), sugiriendo que esta función efectora Fc era proporcionada por la adición de los cuatro Fab anti-CD20, y que su localización de fusión es crítica. Además, 22*-(20)-(20) mostró CDC moderada, que no era detectada para epratuzumab, y solo aumentaba de forma modesta para 22-(20)-(20), sugiriendo que esta función efectora todavía se puede impartir a un mAb que carece de CDC por la adición de Fab de un mAb inductor de CDC, y que la actividad es sensible a la localización del sitio de fusión. Esto se demostraba claramente con IgG-IFN α , donde Fc-IgG-IFN, 20-2b, no tenía CDC detectable y 20*-2b inducía una potente actividad, similar a veltuzumab.

Aunque los Fc-bsHexAb y Fc-IgG-IFN α son bastante estables en sueros humanos o de ratón y sangre entera (Rossi et al., 2009, *Blood* 114:3864-3871; Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171), las fusiones de Fc, en particular, no eran completamente estables in vivo. Los conjugados basados en Fc se disociaban a una velocidad de 0,5-1,0%/h en ratones, comparado con <0,2%/h para las construcciones basadas en C_k. Debido a que la disociación no se ha observado nunca ex vivo, se piensa que se produce por un proceso intracelular. Es interesante que no hubiera pruebas de inestabilidad in vivo en conejos, incluso después de 5 días. El resto de lisina C-terminal de la cadena pesada a menudo es escindido proteolíticamente durante la producción del anticuerpo. Las proteínas de fusión basadas en Fc comunes, donde se fusionan grupos adicionales en la lisina C-terminal, potencialmente pueden ser escindidas in vivo por proteasas, tales como plasmina, que escinde después de exponer los restos de lisina (Gillies et al., 1992, *Proc Natl Acad Sci U. S. A* 89, 1428-1432).

En resumen, este estudio demuestra las propiedades in vivo superiores de los bsAb e inmunocitoquinas hechas como complejos de DNL™ con fusión en el extremo C-terminal de la cadena ligera, sugiriendo que el extremo C de

la cadena ligera es la localización de fusión preferida para la mayoría de los inmunocombinados con uso clínico previsto.

Ejemplo 2. Producción y uso de complejos de DNL™ basados en C_k para el tratamiento de enfermedades autoinmunitarias

5 Antecedentes

El lupus eritematoso sistémico (LES) se ha clasificado como una enfermedad autoinmunitaria que implica muchos sistemas de órganos, como un trastorno reumático multisistémico inflamatorio, o como una enfermedad vascular de colágeno. Los corticosteroides siguen siendo la base de tratamiento a largo plazo para la mayoría de los pacientes, incluso los que están en remisión clínica, son mantenidos usando dosis bajas. Las dosis altas de esteroides, en particular pulso i.v. de 0,5-1,0 g de metilprednisolona, son un tratamiento de referencia para la atención integral de un brote agudo, con inmunosupresores (azatioprina, ciclofosfamida, metotrexato, etc.) en general usados en casos graves cuando otros tratamientos son ineficaces. La citotoxicidad asociada con los inmunosupresores así como los problemas de la terapia de corticosteroides sistémicos a largo plazo proporciona incentivos para desarrollar terapias dirigidas y menos tóxicas, en particular aquellas con efectos que moderan los esteroides. No se han aprobado nuevos agentes como productos terapéuticos para el LES en 50 años hasta la reciente aprobación de Benlysta (belimumab) en marzo de 2011.

Aunque la visión convencional de los linfocitos B es como precursores de células plasmáticas que producen inmunoglobulina, también pueden tener otras funciones en la patogénesis de la LES, tales como presentación de autoantígenos, promoción de la interrupción de la tolerancia de linfocitos T periféricos, y posiblemente por activación de poblaciones de linfocitos T con baja afinidad hacia los autoantígenos (Looney, 2010, *Drugs* 70:529-540; Mok, 2010, *Int J Rheum Dis* 13:3-11; Goldenberg, 2006, *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1341- 1353; Thauan et al., 2010, *Blood* 116:515-521). Debido a la función central de los linfocitos B en la patogénesis de autoinmunidad, se espera que la inmunoterapia de linfocitos B dirigidos ofrezca valor terapéutico para la LES. Por ejemplo, Benlysta es un anticuerpo monoclonal (mAb) que inhibe la activación de linfocitos B por bloqueo del factor activante de linfocitos B.

Otro objetivo de los linfocitos B es CD22, una glucoproteína de 135 kD que es un miembro restringido de los linfocitos B de la superfamilia de inmunoglobulinas, y un miembro de la familia de sialoadhesión de moléculas de adhesión que regulan la activación de linfocitos B y la interacción con linfocitos T (p. ej., Camahan et al., 2007, *Mol Immunol* 44:1331-1341; Haas et al., 2006, *J Immunol* 177:3063-3073; Haas et al., 2010, *J Immunol* 184:4789-4800). CD22 tiene 7 dominios extracelulares y es rápidamente internalizada cuando se reticula con su ligando natural, produciendo una potente señal coestimuladora en linfocitos B primarios. CD22 es un objetivo molecular atractivo para la terapia debido a su expresión restringida; no está expuesto en citoblastos o células pre-B embrionarias ni tampoco se desprende normalmente de la superficie de células que llevan antígeno.

Epratuzumab es un anticuerpo anti-CD22 humanizado que está en ensayos clínicos avanzados. Los ensayos clínicos con epratuzumab se han llevado a cabo para pacientes con linfoma no Hodgkin, leucemias, macroglobulinemia de Waldenström, síndrome de Sjogren y LES, y abarcan la experiencia en más de 1000 pacientes. En el estudio clínico inicial con epratuzumab en el linfoma no Hodgkin (NHL) u otros tumores malignos de linfocitos B, los pacientes recibieron 4 infusiones semanales consecutivas de epratuzumab en dosis en el intervalo de 120 a 1000 mg/m²/semana (Goldenberg, 2006, *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1341-1353; Goldenberg et al., 2006, *Arthritis Rheum* 54:2344-2345; Leonard et al., 2003, *J Clin Oncol* 21:3051-3059; Leonard et al., 2008, *Cancer* 113:2714-2723). La toxicidad relacionada con el tratamiento típicamente implica náuseas, escalofríos/rigidez, fiebre y otras reacciones a la infusión leves o moderadas transitorias que ocurren principalmente durante la primera infusión semanal. Los niveles de linfocitos B periféricos disminuían después de la terapia con epratuzumab, pero no se veían otros cambios consistentes en RBC, ANC, plaquetas, inmunoglobulinas o niveles de linfocitos T después de tratamiento. Los niveles en la sangre de epratuzumab después de la 4ª infusión semanal aumentaban de una forma dependiente de la dosis, y epratuzumab permanecía en la circulación con una semivida de 23 días. Es interesante que se describieron efectos antitumorales potenciados en formas indolentes y agresivas de NHL cuando epratuzumab se combinó con rituximab anti-CD20 (Goldenberg, 2006, *Expert Rev Anticancer Ther* 6:1341-1353; Leonard et al., 2005, *J Clin Oncol* 23:5044-5051; Leonard et al., 2008, *Cancer* 113:2714-2723; Strauss et al., 2006, *J Clin Oncol* 24:3880-3886). Epratuzumab está entrando en dos ensayos de registro de fase III para el tratamiento de pacientes de LES. También hay de destacar que rituximab también ha mostrado actividad en pacientes con LES (Ramos-Casals et al., 2009, *Lupus* 18:767-776).

Puesto que la combinación de rituximab y epratuzumab mostró eficacia antilinfoma mejorada sin toxicidad aumentada en pacientes (Leonard et al., 2008, *Cancer* 113:2714-2723), los autores de la invención diseñaron y evaluaron bsAb tanto contra CD20 como contra CD22, que incluían un diseño anterior basado en el formato de IgG-(scFv)₂ (Qu et al., 2008, *Blood* 111:2211- 2219) y el diseño más reciente de DNL™ basado en el formato hexavalente de IgG-(Fab)₄, que dio como resultado 22-(20)-(20) y 20-(22)-(22) (Rossi et al., 2009 *Blood* 113:6161-6171). Específicamente, 22-(20)-(20) comprende epratuzumab y 4 Fab de veltuzumab adicionales y por lo tanto se une a CD22 de forma bivalente y a CD20 de forma tetravalente. Igualmente, el otro bsAb, 20-(22)-(22), que comprende veltuzumab y 4 Fab de epratuzumab, se une a CD20 de forma bivalente y a CD22 de forma tetravalente. Para los HexAb originales, denominados en los sucesivos C_H3-HexAb, los dos tipos de módulos son C_H3-AD2-IgG y

C_H1-DDD2-Fab. Cada uno de estos módulos se produce como una proteína de fusión en células de mieloma y se purifica mediante cromatografía de afinidad de proteína A (C_H3-AD2-IgG) o KappaSelect (C_H1-DDD2-Fab).

Un HexAb puede ser monoespecífico o biespecífico. Los C_H3-HexAb comprenden una pareja de dímeros Fab-DDD2 conectados a una IgG completa en el extremo carboxilo de las dos cadenas pesadas, por lo tanto tiene seis brazos de Fab y un dominio común de Fc. Por ejemplo, el código 20-(22)-(22) designa el HexAb biespecífico que comprende una IgG anti-CD22 divalente de epratuzumab y una pareja dimérica de brazos de Fab anti-CD20 de veltuzumab.

Como se ha discutido en el ejemplo 1 anterior, los autores de la invención han desarrollado un formato de HexAb alternativo usando un nuevo módulo de IgG-AD2, C_k-AD2-IgG, que tiene el péptido AD2 fusionado en el extremo carboxilo de la cadena ligera kappa, en lugar de en el extremo del Fc. La combinación con C_H1- DDD2-Fab da como resultado una estructura de C_k-HexAb, que tiene una arquitectura diferente, pero composición similar (6 Fab y un Fc), a C_H3-HexAb, que tiene los cuatro Fab adicionales conectados al extremo de la cadena ligera. Como se ha descrito antes, los C_k-HexAb presentan funciones efectoras superiores y tienen farmacocinética (Pk) significativamente mejorada, comparada con el C_H3-HexAb original.

Los C_k-HexAb son particularmente adecuados para aplicaciones in vivo ya que presentan Pk favorable, son estables in vivo, y pueden ser menos inmunógenos puesto que tanto los péptidos de DDD como de AD derivan de proteínas humanas y los componentes del anticuerpo constitutivos están humanizados. Además, cada uno de los anticuerpos anti-CD22/CD20 induce potencialmente citotoxicidad directa contra diferentes linfomas y líneas de células de leucemia que expresan CD20/CD22 sin la necesidad de un anticuerpo secundario para realizar el hiperentrecruzamiento, que se requiere para los mA b originales. Los estudios in vivo confirmaban la eficacia de los bsAb para inhibir el crecimiento de xenoinjertos de linfoma de Burkitt en ratones, indicando por lo tanto que su mayor tamaño no afectaba al direccionamiento al tumor y penetración en el tejido.

Resultados preliminares

Experiencia clínica con epratuzumab - Se han llevado a cabo estudios clínicos para examinar la eficacia de epratuzumab en formas indolentes y agresivas de NHL solo en combinación con rituximab. Los datos publicados muestran que el anticuerpo se puede dar semanalmente durante 4 semanas en una infusión de < 1 h hasta dosis de 1.000 mg/m², y parece que la dosis óptima es 360 mg/m², y da como resultado respuestas objetivas muy duraderas en 43% de los pacientes foliculares a los que se dio esta dosis óptima, con un tercio que comprendían CR. Cuando se combinaba semanalmente durante 4 semanas con rituximab, los pacientes de NHL indolente, folicular, mostraron una respuesta objetiva de 67% global (7% de PR y 60% de CR/Cru), con recaída de un solo paciente a los 19 meses de seguimiento. Los autores de la invención y otros han estudiado la combinación de rituximab y epratuzumab con sus dosis completas recomendadas semanalmente x 4 en ensayos de EE.UU. y Europa multicéntricos, indicando los resultados una tasa de CR mayor que la observada en estudios históricos con rituximab solo, en poblaciones de pacientes similares.

Para el lupus, los estudios completados incluyeron 331 individuos únicos que recibieron al menos una dosis de epratuzumab (Shoenfeld et al. (Eds.), *Immunotherapeutic Agents for SLE*. Future Medicine Ltd; 2012). En el estudio inicial, Domer et al. administraron 360 mg/m² a 14 pacientes con LES moderadamente activo (Domer et al., 2006, *Arthritis Res Ther* 8:R74). Los pacientes recibieron 360 mg/m² de epratuzumab por vía intravenosa cada 2 semanas durante cuatro dosis, con premedicación de analgésicos/antihistaminas (pero no esteroides) y se vigilaron durante hasta 32 semanas. El fármaco tenía efectos tan pronto como a las 6 semanas, con 93% que demostraban mejoras en el índice del grupo de actividad de Lupus de las Islas Británicas (BILAG) en al menos un nivel B o C de actividad de la enfermedad a las 6 semanas, y todos los pacientes lograron mejora en al menos un sistema corporal de BILAG a las 10 semanas. Epratuzumab era bien tolerado y tenía un tiempo de infusión mediano de 32 min. Los niveles de linfocitos B en la sangre disminuyeron en una media de 35% a las 6 semanas y permanecieron reducidos 6 meses después de la terapia. No se detectaron señales de seguridad adversas. Los niveles de linfocitos T disminuyeron después de tratamiento en aproximadamente 40%, lo cual es mucho menos que lo experimentado con los mA b anti-CD20. Los niveles de linfocitos T después de tratamiento, las inmunoglobulinas y otros ensayos de laboratorio de seguridad de referencia permanecían sin cambiar desde el valor inicial. No se encontró evidencia de HAAA en estos pacientes. No se vieron cambios consistentes en autoanticuerpos y otros ensayos de laboratorio relacionados con la enfermedad.

Esto llevó a dos estudios de fase III conocidos como ALLEVIATE I y II (SL0003/SL0004; ClinicalTrials.gov registro: NCT00111306 y NCT00383214) que estaban dirigidos a ser ensayos controlados con placebo, con doble ocultación, aleatorizados, de 48 semanas, seguido de un estudio de seguridad a largo plazo, sin ocultación para pacientes en EE.UU. (SL0006). El protocolo incluía pacientes a los que se administró infusión de epratuzumab de 360 o 720 mg/m² (además del tratamiento base, que incluía corticosteroides e inmunosupresores) a lo largo de cuatro ciclos consecutivos de 12 semanas: en el primer ciclo, se dieron cuatro infusiones las semanas 0, 1, 2 y 3; para los tres ciclos de retratamiento posteriores, se dieron dos infusiones las semanas 0 y 1. El criterio de valoración principal era un análisis de pacientes que responden de BILAG la semana 12, puesto que demasiados pocos pacientes completaron la evaluación de variable de valoración de 24 pacientes prevista originalmente. Los pacientes que respondían tenían una reducción de BILAG A o BILAG B de un nivel, sin BILAG A nuevo o menos de dos nuevos B,

e introducción de inmunosupresión o aumento de dosis de esteroides durante el periodo de tratamiento. Iniciado en 2005, el estudio se interrumpió prematuramente en 2006 debido a la interrupción de suministro del fármaco. En ese punto, solo se habían estudiado suficiente tiempo 90 pacientes para el análisis y se juntaron los dos grupos.

5 A un total de 29 pacientes de EE.UU. se les dio terapia de seguimiento sin ocultación en SL0006. Los sujetos en general tenían lupus grave: la puntuación de BILAG media era 13,2 y 43% tenía al menos un BILAG A. En total, 63% tomaban agentes inmunosupresores y 43% tomaban 25 mg o más de prednisona diaria. Un total de 91% recibieron cuatro infusiones y 69% alcanzaron la semana 24. Usando un análisis de población por intención de tratar, se logró una respuesta BILAG la semana 12 en 44,1, 20 y 30,3% de los grupos de 360 mg/m², 720 mg/m² y placebo, respectivamente, con respuestas vistas en el plazo de 6 semanas. Epratuzumab demostró propiedades de reducción de esteroides significativas y se correlacionaba con mejoras en la calidad de vida relacionada con la salud. Las mejoras se mantuvieron en los que permanecieron en el seguimiento sin ocultación. No se encontraron diferencias entre grupos significativas en sucesos adversos o sucesos adversos graves. La reducción de linfocitos B era aproximadamente 20-40% entre los pacientes tratados.

15 EMBLEM era un estudio con doble ocultación, de 12 semanas, de fase IIb, de seis pautas posológicas diferentes para pacientes con al menos un BILAG A y/o dos BILAG B (ClinicalTrials.gov registro: NCT00624351). Este estudio incluía 227 pacientes con LES con una puntuación en BILAG total de 15,2 y un índice de actividad de la enfermedad LES media de 14,8, que tomaban como media 14 mg diarios de prednisona, y la mayoría también estaba tomando agentes inmunosupresores. Por lo tanto, los participantes del estudio tenían más actividad de enfermedad multisistémica que la que se había visto en otro ensayo clínico de lupus publicado. Se dieron cuatro infusiones semanales, dos infusiones cada dos semanas, o placebo, frente a la base de prednisona y, para la mayoría, terapia inmunosupresora. Los que recibieron una dosis combinada de 2400 mg tuvieron mejoras importantes y estadísticamente significativas, logrando el 37,9% una "mejora en BILAG mayor", de modo que se anotaron al menos dos niveles (p. ej., de A a C, de B a D) de mejora. De nuevo no había señales de seguridad o inmunosupresión significativa. Solo cuatro de 187 (2,1%) pacientes desarrollaron HAA.

25 EMBODY, un estudio fundamental de 48 semanas consistía en dos cohortes grandes con un total de casi 2000 pacientes, se inició en diciembre de 2010 (ClinicalTrials.gov registro: NCT01262365).

30 Experiencia clínica con veltuzumab - Se estudió veltuzumab en alrededor de 80 pacientes con NHL refractario/de recaída de terapias previas, que incluían rituximab, y se ha encontrado que tiene aproximadamente un 43% de respuesta objetiva y un 27% de tasa de respuesta completa en pacientes FL en todas las dosis sumadas, que parecía ser duradero (15-25 meses) (Morchhauser et al., 2009, *J Clin Oncol* 27:3346-3353). Se vio actividad incluso con dosis de 80 mg/m². Es importante que el perfil de infusión parecía mejor que el de rituximab, sin reacciones adversas de grado 3-4 y tiempos de infusión de ≤2 h (comparado con 4-8 h para rituximab). Veltuzumab también se ha examinado en una formulación subcutánea (SC) en linfoma de linfocitos B (Negrea et al., 2011, *Haematologica* 96:567-573).

35 Veltuzumab también se ha estudiado en pacientes con trombocitopenia inmune (ITP) (ClinicalTrials.gov registro: NCT00547066), y se ha mostrado que es activo en esta enfermedad, incluso cuando se han administrado dosis bajas (dos veces, las semanas 1 y 3) por vía intravenosa y subcutánea (no se muestran los datos). Cuarenta y un pacientes recibieron 2 dosis de veltuzumab con 2 semanas de separación. Veltuzumab era bien tolerado (reacciones transitorias de grado 1-2 limitadas, excepto una reacción a la infusión de grado 3), sin otros problemas de seguridad. 40 De los 38 pacientes evaluables, 9 con enfermedad recién diagnosticada o persistente (ITP ≤1 año) previamente tratados solo con esteroides y/o inmunoglobulinas, tenían 7 (78%) respuestas que incluían 3 (33%) CR y 4 (44%) PR, mientras que 29 con enfermedad crónica de hasta 31 años y terapias previas adicionales tenían 20 (69%) respuestas, que incluían 4 (13%) CR y 10 (35%) PR. Para los 27 pacientes que respondían, el tiempo mediano para la recaída aumentó con la categoría de la respuesta (MR: 2,4, PR: 5,5, CR: 14,4 meses) con 10 (37%) pacientes que respondían > 1 año (3 en curso a los 3,0-3,8 años). Ocho pacientes que respondían se volvieron a tratar, 3 dando de nuevo PR, que incluía uno vuelto a tratar 4 veces. Tanto la vía IV como la SC disminuían los linfocitos B después de la primera inyección en todas las dosis. Ocho pacientes desarrollaron títulos de HAA bajos de significación clínica dudosa. Por lo tanto, veltuzumab es un producto terapéutico prometedor por sí mismo, tanto en el NHL como en una enfermedad autoinmunitaria.

50 bsAb hexavalentes hechos por DNL™ - El diseño molecular, producción, purificación y caracterización bioquímica/biológica de 22-(20)-(20) y 20-(22)-(22) se ha descrito (Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). Un análisis detallado del mecanismo de acción y la señalización celular inducida por 22-(20)-(20) y 20-(22)-(22) también se ha publicado (Gupta et al., 2010, *Blood* 116:3258-3267). Los hallazgos clave son los siguientes.

55 Tanto 22-(20)-(20) como 20-(22)-(22) retenían las propiedades de unión de sus Fab/IgG originales con los 6 Fab capaces de unirse simultáneamente. El análisis de ELISA competitivo mostraba que cada construcción tiene valencia funcional como se indica, y que cada Fab se une con una afinidad similar a la del mAb original. La citometría de flujo demuestra unión biespecífica a células de NHL vivas con tiempos de retención mayores que los mAb originales. En la velocidad de internalización de los bsAb influye en gran medida tanto la valencia como la naturaleza de la internalización de los anticuerpos constitutivos. Específicamente, 22-(20)-(20) con cuatro Fab de veltuzumab que se internaliza lentamente y dos Fab de epratuzumab que se internaliza rápidamente, se comporta

60

de forma similar a veltuzumab, mostrando una velocidad de internalización lenta. A la inversa, 20-(22)-(22) con cuatro Fab de epratuzumab que se internaliza rápidamente y dos Fab de veltuzumab que se internaliza lentamente, presenta internalización rápida similar a epratuzumab.

5 Los dos bsAb anti-CD20/CD22 inducían apoptosis dependiente de caspasa de forma más potente que veltuzumab o epratuzumab, sea solo o en combinación. A pesar de la incorporación de veltuzumab, que solo presenta una CDC potente, ninguno de los bsAb es capaz de inducir CDC. Ambos bsAb presentan ADCC, siendo 20-(22)-(22) más potente que 22-(20)-(20), supuestamente debido a la mayor densidad de CD20 que de CD22 en linfocitos B normales y NHL así como por el hecho de que veltuzumab media la ADCC de forma más eficaz que epratuzumab.

10 Los bsAb inhiben células del linfoma sin inmovilización (requerida para epratuzumab) o hiperentrecruzamiento con un anticuerpo secundario (requerida para veltuzumab). Dicha citotoxicidad directa es aproximadamente 50 veces más potente en células Daudi de linfoma de Burkitt que la combinación de ambos mAb originales en ausencia de inmovilización o hiperentrecruzamiento. En células de Raji y, 22-(20)-(20) es de 8 a 10 veces más potente que 20-(22)-(22), que a su vez es de 8 a 10 veces más potente que la combinación de ambos mAb originales. Por lo tanto, 22-(20)-(20) puede ser 100 veces más potente que los mAb originales dados en combinación in vitro en ausencia de
15 otros factores, tales como células efectoras.

Ambos bsAb inducen translocación extensiva de CD22 (así como CD20) en balsas lipídicas. Ambos bsAb inducen una fuerte adhesión homotípica en células de linfoma, mientras que en las mismas condiciones los mAb originales eran ineficaces, indicando que el entrecruzamiento de CD20 y CD22 conduce a adhesión homotípica, lo cual puede contribuir a la citotoxicidad in vitro potenciada.

20 Los análisis Pk muestran que la semivida en la circulación de los bsAb en ratones es 2-3 veces más corta que la de los mAb originales. Los estudios de biodistribución en ratones muestran que ambos bsAb tienen absorciones tisulares similares a veltuzumab y epratuzumab, indicando que los bsAb no son eliminados más rápidamente que sus mAb originales debido a la mayor absorción en tejidos normales.

25 Los estudios in vivo en xenoinjertos de Daudi ponen de manifiesto que 20-(22)-(22), a pesar de tener una semivida en el suero más corta, tenía eficacia antitumoral comparable a veltuzumab equimolar. Aunque 22-(20)-(20) es menos potente que 20-(22)-(22), es todavía más eficaz que epratuzumab y los bsAb de control. La toxicidad dirigida muy potenciada de los bsAb se correlaciona con su capacidad para alterar la expresión basal de diferentes proteínas intracelulares implicadas en regular el crecimiento, supervivencia y apoptosis celular, con el resultado neto que conduce a la muerte celular. En un contexto ex vivo, tanto 22-(20)-(20) como 20-(22)-(22) reducen las células de
30 NHL así como los linfocitos B normales de la sangre entera de voluntarios sanos.

Debido a que los análisis PK pusieron de manifiesto que la semivida en la circulación de C_H3-HexAb en ratones es 2-3 veces más corta que la de los mAb originales, los autores de la invención han desarrollado el formato alternativo de C_k-HexAb, con el objetivo de mejorar la Pk. Los estudios en el ejemplo 1 anterior indican que la mayor velocidad de eliminación de la sangre observada para HexAb basados en C_H3 se debe a la localización de los grupos Fab adicionales en el extremo de Fc, que interfieren con la unión (y/o liberación) del receptor de Fc neonatal (FcRn), que es responsable de la recirculación de la IgG después de endocitosis, dando una Pk muy extendida. De hecho, 22*-(20)-(20) presentaba Pk notablemente superior comparado con 22-(20)-(20) (ejemplo 1). Después de inyección subcutánea en ratones normales, 22*-(20)-(20) alcanzó una C_{máx} dos veces mayor y una semivida en la circulación tres veces más larga, produciendo un área bajo la curva tres veces mayor, comparado con 22-(20)-(20).
35 Adicionalmente se encontró que 22*-(20)-(20) era muy estable in vivo a lo largo de todo el estudio Pk de 5 días. Esto era evidente porque los dos formatos de ELISA diferentes, uno de los cuales detecta cualquier forma de epratuzumab, y el otro que cuantifica solo 22*-(20)-(20) intacto, generaron curvas Pk que esencialmente se solapaban.

Uso en LES

45 La construcción de DNL™ 22*-(20)-(20) se selecciona para uso terapéutico en LES. 22*-(20)-(20) deriva de veltuzumab, el anticuerpo monoclonal (mAb) anti-CD20 humanizado y epratuzumab, el mAb anti-CD22 humanizado, para formar un conjugado covalente con cuatro fragmentos Fab de veltuzumab unidos a una IgG de epratuzumab (véase el ejemplo 1). Tanto epratuzumab como veltuzumab han mostrado actividad clínica en enfermedad autoinmunitaria y la terapia de combinación con ambos mAb será más eficaz que como monoterapias. Se lleva a
50 cabo una terapia más potente, usando dos mecanismos diferentes de acción (reducción drástica de linfocitos T por mAb anti-CD20 y modulación de linfocitos B por mAb anti-CD22), usando un anticuerpo biespecifico capaz de dirigirse tanto a CD20 como a CD22, que es más conveniente y económico que la administración de dos mAb diferentes de forma secuencial, que actualmente requiere la administración de infusión en los pacientes durante muchas horas en cada sesión de tratamiento.

55 El uso de 22*-(20)-(20) como un agente terapéutico para el LES se evalúa en un modelo de ratón SCID, en el que se injertan en los animales linfocitos de sangre periférica (PBL) de los pacientes de LES (Mauermann et al., 2004, *Clin Exp Immunol* 137:513-520). La eficacia de los bsAb se compara con epratuzumab y veltuzumab independientemente y en combinación, vigilando el nivel en el suero de anticuerpo anti-dsADN, una característica del LES.

Se recogen muestras de sangre de pacientes con LES. Para el injerto, 3×10^7 PBL obtenidos de pacientes con LES individuales, se inyectan por vía intraperitoneal (i.p.) a un ratón SCID hembra, de 8-10 semanas de edad. Por lo tanto, cada animal representa un paciente individual de lupus. En aproximadamente dos tercios de los ratones el injerto es satisfactorio, con evidencia de producción de anticuerpos humanos en concentraciones $\geq 100 \mu\text{g/ml}$ en 2 semanas, con una producción máxima en 4 semanas. Los ratones que tienen evidencia de injerto se usan para el tratamiento. Para vigilar el efecto del tratamiento, se extrae sangre de los ratones los días 24, 34, 44 y 54 y se ensaya en los sueros por ELISA o HPLC-proteína A, la presencia de hIgG total, anti-dsADN (medición del estado de enfermedad del lupus) y anticuerpos anti-toxoide tetánico (para demostrar el sistema inmunitario humoral humano funcional).

Los anticuerpos anti-dsADN humano en los sueros de los receptores, como un indicador del LES, se determinan usando placas de microvaloración de 96 pocillos Maxisorb recubiertos con poli-L-lisina (5 mg/ml, Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.), seguido de recubrimiento con dsADN de fago lambda (5 mg/pocillo, Boehringer Mannheim, Alemania). Las placas se bloquean con suero de ternero fetal al 10% (FCS) en PBS, y se incuban con suero de ratón (diluido 1:5-1:40) durante 2 h. El anticuerpo anti-dsADN unido se detecta por el anticuerpo de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante (Jackson).

Se examinó el efecto de usar 22^{*}-(20)-(20) DNL™ en ratones con LES. Estudios previos con el bsAb 22-(20)-(20) in vitro encontraron que era eficaz para matar líneas celulares de linfoma de linfocitos B humanos en concentraciones de $\sim 1 \text{ nM}$ ($\sim 350 \mu\text{g/ml}$), e in vivo, tres dosis de $10 \mu\text{g}$ de 22-(20)-(20) en 1 semana controlaban el crecimiento de la línea de células Daudi de linfoma de linfocitos B implantada por vía IV en ratones SCID (Rossi et al., 2009, *Blood* 113:6161-6171). Sin embargo, los bsAb eran menos eficaces para matar los linfocitos B normales ex vivo (FIG. 10). Basándose en estos resultados, los ratones SCID con LES injertado se trataron inicialmente con $400 \mu\text{g}$ de 22^{*}-(20)-(20) vía i.p. dos veces por semana durante 2 semanas (empezando el día 14). Si vuelven a aparecer títulos, se inicia un segundo ciclo de tratamiento, continuando hasta la terminación del estudio el día 60. Si el control de la enfermedad con $400 \mu\text{g}$ no es suficiente después de 2 semanas de tratamiento, el tratamiento en grupos posteriores de animales a los que se daba $400 \mu\text{g}$ se interrumpe durante 4 semanas secuenciales. Si el control de la enfermedad mejora significativamente después de 2 semanas con $400 \mu\text{g}$, a una dosis menor de $40 \mu\text{g}$ usando la misma pauta de dos veces por semana durante 2 semanas le sigue un periodo de observación. Números iguales de animales reciben solo la dosis de excipiente (tampón) de modo que se establece un valor base para el avance de la enfermedad. El objetivo de los autores de la invención es establecer un protocolo de tratamiento usando una dosis mínima que disminuya significativamente la producción de anticuerpos, proteinuria y evidencia de daño renal. Además del control con tampón, se determinaron los efectos de los mAb originales de 22^{*}-(20)-(20), epratuzumab, veltuzumab y una combinación de IgG de epratuzumab y veltuzumab, así como veltuzumab-DDD2 (Fab bivalente), cada uno dado en cantidades equimolares y siguiendo la misma pauta posológica que el grupo de ensayo de 22^{*}-(20)-(20).

El comparador principal entre los grupos de tratamiento es el cambio en la titulación en el suero de anticuerpo anti-dsADN. Basándose en los resultados de Maurermann et al. usando este sistema modelo, los títulos de anticuerpos anti-dsADN en ratones de control tienen máximos a los 30-40 días, antes de disminuir lentamente. Dichos resultados satisfactorios de la terapia dan una $C_{\text{máx}}$ mucho menor y una disminución más rápida de los títulos anti-dsADN a niveles por debajo de los del inicio de la terapia. Se miden para cada animal la $C_{\text{máx}}$ y el cambio de título de anticuerpos anti-dsADN desde el día 14 al día 70 ($\Delta C_{70/14}$). Al final del estudio de la terapia se evalúa en los animales la proteinuria y la glomerulonefritis inflamatoria como mediciones adicionales del avance o control de la enfermedad.

Se observa que los ratones con LES tratados con una dosis de $400 \mu\text{g}$ de 22^{*}-(20)-(20) dos veces por semana durante cuatro semanas, muestran una disminución significativa en los títulos de anticuerpos anti-dsADN, con niveles menores de proteinuria y glomerulonefritis inflamatoria, comparado con el control de tampón, o bien epratuzumab o veltuzumab administrados solos, o la combinación de epratuzumab y veltuzumab, cuando se administran con las mismas dosis molares y pautas que 22^{*}-(20)-(20).

Ejemplo 3. Técnicas generales para DOCK-AND-LOCK™

Se usaron las técnicas generales descritas a continuación para generar complejos de DNL™ con motivos de AD o DDD unidos al extremo C-terminal de la cadena pesada del anticuerpo. Se construyeron motivos de AD unidos a la cadena ligera como se ha descrito antes en el ejemplo 1. Con la excepción de una Pk superior, estabilidad in vivo y eficacia mejorada, las construcciones de C_k DNL™ se encontró que funcionaban de forma similar a sus homólogas de C_H .

Vectores de expresión

Se ha usado el vector plásmido pHL2 para producir una serie de anticuerpos y construcciones basadas en anticuerpos. Gillies et al., *J Immunol Methods* (1989), 125:191-202; Losman et al., *Cancer* (Phila) (1997), 80:2660-6. El vector de expresión de mamífero di-cistrónico dirige la síntesis de cadenas pesadas y ligeras de IgG. Las secuencias de los vectores son idénticas en su mayor parte para muchas construcciones diferentes de IgG-pHL2, existiendo diferencias solo en las secuencias del dominio variable (V_H y V_L). Usando herramientas de biología molecular conocidas para los expertos en la técnica, estos vectores de expresión de IgG se pueden convertir en

vectores de expresión Fab-DDD o Fab-AD.

Para generar vectores de expresión Fab-DDD, las secuencias codificantes de los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la cadena pesada se sustituyeron por una secuencia que codifica los 4 primeros restos de la región bisagra, un conector de Gly-Ser de 14 restos y un motivo de DDD, tal como los primeros 44 restos de RII α humano (denominado DDD1, SEQ ID NO: 1). Para generar los vectores de expresión Fab-AD las secuencias para los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la IgG se sustituyeron por una secuencia que codifica los 4 primeros restos de la región bisagra, un conector de Gly-Ser de 15 restos y un motivo de DD, tal como un AD sintético de 17 restos llamado AKAP-IS (denominado AD1, SEQ ID NO: 3), que se generó usando bioinformática y tecnología de matrices de péptidos y muestra que se une a dímeros de RII α con una afinidad muy alta (0,4 nM). Véase Alto, et al. *Proc. Natl. Acad. Sci., U.S.A* (2003), 100:4445-50. Se diseñaron dos vectores lanzadera para facilitar la conversión de los vectores IgG-pdHL2 en vectores de expresión Fab-DDD1 o Fab-AD1, como se describe a continuación.

Preparación de CH1

El dominio CH1 se amplificó por PCR usando el vector plasmídico pdHL2 como un molde. El cebador izquierdo de la PCR consistía en el extremo corriente arriba (dirección 5') del dominio CH1 y un sitio de la endonucleasa de restricción SacII, que está en dirección 5' de la secuencia codificante de CH1. El cebador derecho consistía en la secuencia que codifica los 4 primeros restos de la región bisagra (PKSC, SEQ ID NO: 123) seguido de cuatro glicinas y una serina, con los dos codones finales (GS) que comprendían un sitio de restricción Bam HI. El amplificador de la PCR de 410 bp se clonó en el vector de clonación de PCR PGEMT® (PROMEGA®, Inc.) y se cribaron los clones con insertos en la orientación de T7 (5').

Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de DDD1 precedida de 11 restos del péptido conector, comprendiendo los primeros dos codones un sitio de restricción BamHI. Se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI en el extremo 3'. La secuencia de polipéptido codificada se muestra a continuación.

GSGGGGSGGGGSHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTRLREARA
(SEQ ID NO:124)

Se sintetizaron dos oligonucleótidos, designados RIIA1-44 superior y RIIA1-44 inferior, que se solapan en 30 pares de bases de sus extremos 3', y se combinaron para comprender los 154 pares de bases centrales de la secuencia de DDD1 de 174 pb. Los oligonucleótidos se reasociaron y se sometieron a una primera reacción de extensión con una polimerasa Taq. Después de la primera extensión de cebador, el dúplex se amplificó por PCR. El amplificador se clonó en PGEMT® y se cribaron los que tenían insertos en la orientación de T7 (5').

Se sintetizó un oligonucleótido dúplex para codificar la secuencia de aminoácidos de AD1 precedida de 11 restos del péptido conector con los dos primeros codones que comprendían un sitio de restricción BamHI. Se añaden un codón de parada y un sitio de restricción EagI en el extremo 3'. La secuencia de polipéptido codificada se muestra a continuación.

GSGGGGSGGGGSQIEYLAQIVDNAIQQA (SEQ ID NO:125)

Se sintetizaron dos oligonucleótidos que se solapaban de forma complementaria que codificaban la secuencia de péptido anterior, designados AKAP-IS superior y AKAP-IS inferior y se reasociaron. El dúplex se amplificó por PCR. El amplificador se clonó en el vector PGEMT® y se cribaron los que tenían insertos en la orientación de T7 (5').

Ligado de DDD1 con CH1

Un fragmento de 190 pb que codificaba la secuencia de DDD1 se escindió de PGEMT® con las enzimas de restricción BamHI y NotI y después se ligó en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector lanzadera CH1-DDD1-PGEMT®.

Ligado de AD1 con CH1

Un fragmento de 110 pb que codificaba la secuencia de AD1 se escindió de PGEMT® con las enzimas de restricción BamHI y NotI y después se ligó en los mismos sitios en CH1-PGEMT® para generar el vector lanzadera CH1-AD1-PGEMT®.

Con este diseño modular bien CH1-DDD1 o CH1-AD1 se pueden incorporar en cualquier construcción de IgG en el vector pdHL2. El dominio constante de la cadena pesada entero se sustituye con una de las construcciones anteriores eliminando el fragmento de restricción de SacIII/EagI (CH1-CH3) de pdHL2 y sustituyéndolo por el fragmento SacIII/EagI de CH1-DDD1 o CH1-AD1, que se escinde del respectivo vector lanzadera PGEMT®.

50

C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2

C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de C-DDD2-Fab-hMN-14, que tiene una secuencia de dominio de dimerización y anclaje de DDD2 (SEQ ID NO: 2) unida al extremo carboxilo del Fd de hMN-14 por un conector peptídico de Gly/Ser de 14 restos de aminoácidos. La proteína de fusión secretada está compuesta de dos copias idénticas de hMN-14 Fab mantenidas juntas por interacción no covalente de los dominios DDD2.

El vector de expresión se modificó genéticamente como sigue. Se hicieron sintéticamente dos oligonucleótidos que se solapaban complementariamente, que comprendían la secuencia codificante para parte del péptido conector y los restos 1-13 de DDD2. Los oligonucleótidos se reasociaron y fosforilaron con PNK T4, produciendo extremos salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para el ligado con el ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y PstI, respectivamente.

El ADN dúplex se ligó con el vector lanzadera CH1-DDD1-PGEMT®, que se preparó por digestión con BamHI y PstI, para generar el vector lanzadera CH1-DDD2-PGEMT®. Se escindió un fragmento de 507 pb de CH1-DDD2-PGEMT® con SacII y EagI y se ligó con el vector de expresión de IgG hMN-14(I)-pdHL2, que se preparó por digestión con SacII y EagI. La construcción de expresión final se designó C-DDD2-Fd-hMN-14-pdHL2. Se han usado técnicas similares para generar proteínas de fusión de DDD2 de los fragmentos Fab de una serie de diferentes anticuerpos humanizados.

h679-Fd-AD2-pdHL2

h679-Fab-AD2, se diseñó para emparejar con C-DDD2-Fab-hMN-14. h679-Fd-AD2-pdHL2 es un vector de expresión para la producción de h679-Fab-AD2, que tiene una secuencia de dominio de anclaje de AD2 (SEQ ID NO: 4) unida al extremo carboxilo terminal del dominio CH1 por un conector peptídico de Gly/Ser de 14 restos de aminoácidos. AD2 tiene un resto de cisteína que le precede y otro después de la secuencia del dominio de anclaje de AD1.

El vector de expresión se modificó genéticamente como sigue. Se hicieron sintéticamente dos oligonucleótidos que se solapaban complementariamente, (AD2 superior y AD2 inferior), que comprenden la secuencia codificante de AD2 y parte de la secuencia de conector. Los oligonucleótidos se reasociaron y fosforilaron con PNK T4, produciendo extremos salientes en los extremos 5' y 3' que son compatibles para el ligado con el ADN digerido con las endonucleasas de restricción BamHI y SpeI, respectivamente.

El ADN dúplex se ligó con el vector lanzadera CH1-AD1-PGEMT® que se preparó por digestión con BamHI y SpeI, para generar el vector lanzadera CH1-AD2-PGEMT®. Se escindió un fragmento de 429 que contenía las secuencias codificantes de CH1 y AD2 del vector lanzadera con las enzimas de restricción SacII y EagI y se ligó al vector h679-pdHL2 que se preparó por digestión con esas mismas enzimas. El vector de expresión final es h679-Fd-AD2-pdHL2.

Generación de la construcción TF2 DNL™

Una construcción de DNL™ trimérica designada TF2 se obtuvo haciendo reaccionar C-DDD2-Fab-hMN-14 con h679-Fab-AD2. Se generó un lote piloto de TF2 con >90% de rendimiento como sigue. La proteína L-purificada C-DDD2-Fab-hMN-14 (200 mg) se mezcló con h679-Fab-AD2 (60 mg) en una relación molar 1,4:1. La concentración de proteína total era 1,5 mg/ml en PBS que contenía EDTA 1 mM. Las etapas posteriores implicaban reducción con TCEP, cromatografía de HIC, oxidación con DMSO y cromatografía de afinidad con IMP 291. Antes de la adición de TCEP, el análisis por SE-HPLC no mostraba ninguna evidencia de formación de a_2b . La adición de TCEP 5 mM produjo rápidamente la formación del complejo a_2b de acuerdo con una proteína de 157 kDa esperada para la estructura binaria. TF2 se purificó hasta casi homogeneidad por cromatografía de afinidad de IMP 291 (no se muestra). IMP 291 es un péptido sintético que contiene el hapteno HSG al que se une el 679 Fab (Rossi et al., 2005, *Clin Cancer Res* 11:7122s-29s). El análisis de SE-HPLC de la fracción no unida a IMP 291 demostró la eliminación de a_4 , a_2 y sin cadenas kappa del producto (no se muestra).

La funcionalidad de TF2 se determinó por ensayo de BIACORE®. TF2, C-DDD1-hMN-14+h679-AD1 (usado como una muestra de control de complejo a_2b no covalente), o C-DDD2-hMN-14+h679-AD2 (usado como una muestra de control de los componentes a_2 y b no reducidos) se diluyeron a 1 .mu.g/ml (proteína total) y se pasaron sobre un chip de detección inmovilizado con HSG. La respuesta para TF2 era aproximadamente el doble que la de las dos muestras de control, indicando que solo el componente h679-Fab-AD en las muestras de control se uniría y permanecería en el chip de detección. Inyecciones posteriores de IgG WI2, un anticuerpo antiidiotipo para hMN-14, demostraron que solo TF2 tenía un componente DDD-Fab-hMN-14 que estaba estrechamente asociado con h679-Fab-AD como indicaba una respuesta de señal adicional. El aumento adicional de las unidades de respuesta que resultaban de la unión de WI2 a TF2 inmovilizado en el chip de detección corresponden a dos sitios de unión completamente funcionales, que contribuía cada uno con una subunidad de C-DDD2-Fab-hMN-14. Esto se confirmó por la capacidad de TF2 a unirse a dos fragmentos Fab de WI2 (no se muestra).

Producción de la construcción de DNL™ TF10

Se usó un protocolo similar para generar una construcción trimérica de DNL™ TF10, que comprendía dos copias de

un C-DDD2-Fab-hPAM4 y una copia de C-AD2-Fab-679. El anticuerpo TF10 biespecífico ([hPAM4]₂ x h679) se produjo usando el método descrito para la producción del bsAb (anti-CEA)₂ x anti-HSG TF2, como se ha descrito antes. La construcción TF10 lleva dos Fab PAM4 humanizados y un 679 Fab humanizado.

5 Las dos proteínas de fusión (hPAM4-DDD2 y h679-AD2) se expresaron independientemente en células de mieloma transfectadas establemente. Los líquidos sobrenadantes del cultivo tisular se combinaron, produciendo un exceso molar de dos veces de hPAM4-DDD2. La mezcla de reacción se incubó a temperatura ambiente durante 24 horas en condiciones de reducción suaves usando glutatión reducido 1 mM. Después de la reducción, la reacción se completó por oxidación suave usando glutatión oxidado 2 mM. Se aisló TF10 por cromatografía de afinidad usando la resina IMP291-affigel, que se une con especificidad alta al Fab h679.

10 Ejemplo 4. Producción de Fab unido a AD y DDD y proteínas de fusión de IgG de múltiples anticuerpos

Usando las técnicas descritas en los ejemplos precedentes, se construyeron las proteínas de fusión de IgG y Fab mostradas en la tabla 10 y se incorporaron en construcciones de DNL™. Las proteínas de fusión retenían las características de unión al antígeno de los anticuerpos originales y las construcciones de DNL™ presentaban las actividades de unión al antígeno de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos incorporados.

15 Tabla 10. Proteínas de fusión que comprenden IgG o Fab

Proteína de fusión	Especificidad de unión
C-AD1-Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h679	HSG
C-(AD) ₂ -Fab-h679	HSG
C-AD2-Fab-h734	Indio-DTPA
C-AD2-Fab-hA20	CD20
C-AD2-Fab-hA20L	CD20
C-AD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-AD2-Fab-hLL2	CD22
N-AD2-Fab-hLL2	CD22
C-AD2-IgG-hMN-14	CEACAM5
C-AD2-IgG-hRI	IGF-1R
C-AD2-IgG-hRS7	EGP-1
C-AD2-IgG-hPAM4	MUC
C-AD2-IgG-hLLI	CD74
C-DDD1-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5
C-DDD2-Fab-h679	HSG
C-DDD2-Fab-hA19	CD19
C-DDD2-Fab-hA20	CD20
C-DDD2-Fab-hAFP	AFP
C-DDD2-Fab-hL243	HLA-DR
C-DDD2-Fab-hLL1	CD74
C-DDD2-Fab-hLL2	CD22

C-DDD2-Fab-hMN-3	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hMN-15	CEACAM6
C-DDD2-Fab-hPAM4	MUC
C-DDD2-Fab-hR1	IGF-1R
C-DDD2-Fab-hRS7	EGP-1
N-DDD2-Fab-hMN-14	CEACAM5

Ejemplo 5. Complejo de DNL™ de anticuerpo-dendrímico para ARNiP

Polímeros catiónicos, tales como dendrímeros basados en polilisina, polietilenimina o poliamidoamina (PMAM), forman complejos con ácidos nucleicos. Sin embargo, sus potenciales aplicaciones como vectores no víricos para el suministro de genes terapéuticos o ARNiP sigue siendo un reto. Un procedimiento para mejorar la selectividad y la potencia de una nanopartícula dendrímica se puede lograr por conjugación con un anticuerpo que se internaliza tras la unión a las células objetivo.

Los autores de la invención sintetizaron y caracterizaron un nuevo inmunoconjugado, designado E1-G5/2, que se hizo por el método de DNL™ para comprender la mitad de una generación 5 (G5) de dendrímico PAMAM (G5/2) unido específicamente al sitio a un dímero estabilizado de Fab derivado de hRS7, un anticuerpo humanizado que es internalizado rápidamente tras la unión al antígeno Trop-2 expresado en diferentes cánceres sólidos.

Métodos

E1-G5/2 se preparó combinando dos módulos de autoensamblaje, AD2-G5/2 y hRS7-Fab-DDD2, en condiciones de oxidorreducción suaves, seguido de purificación en una columna de proteína L. Para hacer AD2-G5/2, se derivatizó el péptido AD2 con un grupo maleimida para que reaccionara con el único tiol generado de la reducción de un G5 PAMAM con un núcleo de cistamina y se usó HPLC de fase inversa para aislar AD2-G5/2. Se produjo hRS7-Fab-DDD2 como una proteína de fusión en células de mieloma, como se ha descrito en los ejemplos anteriormente.

El tamaño molecular, pureza y composición de E1-G5/2 se analizaron por HPLC de exclusión por tamaño molecular, SDS-PAGE y transferencia Western. Las funciones biológicas de E1-G5/2 se evaluaron por unión a un anticuerpo antiidiotipo contra hRS7, un ensayo de retardo en gel y un ensayo de protección de DNasa I.

Resultados

Se mostró por HPLC de exclusión por tamaño molecular que E1-G5/2 consistía en un pico principal (>90%) flanqueado de varios picos minoritarios (no se muestra). Los tres constituyentes de E1-G5/2 (Fd-DDD2, la cadena ligera y AD2-G5/2) se detectaron por SDS-PAGE reductora y se confirmaron por transferencia Western (no se muestra). El análisis de unión antiidiotipo puso de manifiesto que E1-G5/2 contenía una población de conjugados de anticuerpo-dendrímico de diferentes tamaños, todos los cuales eran capaces de reconocer el anticuerpo antiidiotipo, sugiriendo, por lo tanto, la variabilidad en el tamaño del dendrímico G5 adquirido (no se muestra). Los ensayos de retardo en gel mostraron que E1-G5/2 era capaz de condensar de forma máxima el ADN plasmídico con una relación de carga de 6:1 (+/-) con los dendriplexos resultantes que protegían completamente el ADN en complejo de la degradación por DNasa I (no se muestra).

Conclusión

La técnica de DNL™ se puede usar para construir nanopartículas basadas en dendrímeros a las que se pueden dirigir anticuerpos. Dichos agentes tienen propiedades mejoradas como vehículos de fármacos, plásmidos o ARNiP para aplicaciones in vitro e in vivo. En realizaciones preferidas, se pueden usar anticuerpos anti-linfocitos B, tales como anti-CD20 y/o anti-CD22, para suministrar especies de ARNiP citotóxicas o citostáticas a linfocitos B que son objetivo para la terapia de linfoma, leucemia, enfermedades y afecciones autoinmunitarias y otras.

Ejemplo 6. Suministro dirigido de ARNiP usando anticuerpos unidos a protamina

Resumen

Se ha mostrado que el ARN de interferencia (ARNi) regula por disminución la expresión de diferentes proteínas tales como HER2, VEGF, Raf-1, bcl-2, EGFR y muchas otras en estudios preclínicos. A pesar del potencial del ARNi para silenciar genes específicos, el potencial terapéutico completo del ARNi todavía está por descubrir debido a la falta de un sistema de suministro eficaz a células objetivo in vivo.

Para abordar esta necesidad crítica, los autores de la invención desarrollaron nuevas construcciones de DNL™ que

5 tienen múltiples copias de protamina humana ligadas a un anticuerpo hRS7 (anti-Trop-2) de internalización, que se dirige al tumor, para el suministro dirigido de ARNip in vivo. Se produjo un módulo de DDD2-L-thP1 en el que las secuencias de DDD2 y thP1 se fusionaron respectivamente a los extremos N y C-terminales de una cadena ligera de anticuerpo humanizado (no se muestra). La secuencia de hP1 truncado (thP1) se muestra a continuación. La reacción de DDD2-L-thP1 con el anticuerpo hRS7-IgG-AD2 en condiciones de oxidorreducción suaves, como se describe en los ejemplos anteriores, produce la formación de un complejo de E1-L-thP1 (no se muestra) que comprende cuatro copias de thP1 unidas al extremo carboxilo de las cadenas pesadas de hRS7.

thP1

RSQSRSRYYRQRQSRRRRRRS (SEQ ID NO:126)

10 La pureza e integridad molecular de E1-L-thP1 después de purificación con proteína A se determinaron por HPLC de exclusión por tamaño molecular y SDS-PAGE (no se muestra). Además, la capacidad de E1-L-thP1 para unirse a ADN plasmídico o ARNip se demostró por ensayo de desplazamiento en gel (no se muestra). E1-L-thP1 era eficaz en la unión a oligonucleótidos bicatenarios cortos (no se muestra) y en la protección del ADN unido frente a la digestión por nucleasas añadidas a la muestra o presentes en el suero (no se muestra).

15 La capacidad de la construcción E1-L-thP1 para internalizar los ARNip en células de cáncer que expresan Trop-2 se confirmó por microscopía de fluorescencia usando ARNip conjugado con FITC y la línea de células de cáncer de pulmón Calu-3 humano (no se muestra).

Métodos

20 Se usó la técnica de DNL™ para generar E1-L-thP1. El módulo de hRS7 IgG-AD, construido como se ha descrito en los ejemplos antes, se expresó en células de mieloma y se purificó de líquido sobrenadante del cultivo usando cromatografía de afinidad con proteína A. El módulo de DDD2-L-thP1 se expresó como una proteína de fusión en células de mieloma y se purificó por cromatografía de afinidad con proteína L. Puesto que el módulo CH3-AD2-IgG tiene dos péptidos AD2 y cada uno se une a un dímero de DDD2, con cada monómero DDD2 unido a un motivo de protamina, el conjugado E1-L-thP1 resultante comprende cuatro grupos protamina. E1-L-thp1 se formó con rendimiento casi cuantitativo a partir de módulos constituyentes y se purificó hasta casi homogeneidad (no se muestra) con proteína A.

25 DDD2-L-thP1 se purificó por cromatografía de afinidad con proteína L y se evaluó por análisis de HPLC de exclusión por tamaño molecular y SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (no se muestra). Se observó un pico principal a 9,6 min (no se muestra). La SDS-PAGE mostró una banda principal entre 30 y 40 kDa en el gel reductor y una banda principal a aproximadamente 60 kDa (que indicaba una forma dímera de DDD2-L-thP1) en gel no reductor (no se muestra). Los resultados de la transferencia Western confirmaron la presencia de DDD2-L-tP1 monomérico y DDD2-L-tP1 dimérico en la detección con anticuerpos anti-DDD (no se muestra).

35 Para preparar E1-L-thP1, se combinaron hRS7-IgG-AD2 y DDD2-L-thP1 en cantidades aproximadamente iguales y se añadió glutatión reducido (concentración final 1 mM). Después de incubación durante la noche a temperatura ambiente, se añadió glutatión oxidado (concentración final 1 mM) y la incubación se continuó durante otras 24 h. Se purificó E1-L-thP1 de la mezcla de reacción por cromatografía en columna de proteína A y se eluyó con tampón de citrato sódico 0,1 M (pH 3,5). El pico del producto (no se muestra) se neutralizó, se concentró, se dializó con PBS, se filtró y se almacenó en PBS que contenía glicerol al 5% de 2 a 8°C. La composición de E1-L-thP1 se confirmó por SDS-PAGE reductora (no se muestra), que mostraba la presencia de los tres constituyentes (cadena pesada con AD2 agregado, DDD2-L-thP1, y cadena ligera).

40 La capacidad de DDD2-L-thP1 y E1-L-thP1 para unirse al ADN se evaluó por ensayo de desplazamiento en gel. DDD2-L-thP1 retardaba la movilidad de 500 ng de una forma lineal de un fragmento de ADN de 3 kb en agarosa al 1% en una relación molar de 6 o mayor (no se muestra). E1-L-thP1 retardaba la movilidad de 250 ng de un ADN dúplex de 200 pb lineal en agarosa al 2% en una relación molar de 4 o mayor (no se muestra), mientras que dicho efecto no se observaba para hRS7-IgG-AD2 solo (no se muestra). La capacidad de E1-L-thP1 para proteger al ADN unido frente a la degradación por DNasa exógena y nucleasas del suero también se demostró (no se muestra).

45 La capacidad de E1-L-thP1 para promover la internalización del ARNip unido se examinó en la línea de células de cuello de uterino ME-180 que expresan Trop-2 (no se muestra). La internalización del complejo E1-L-thP1 se vigiló usando anticuerpos de cabra anti-IgG humana conjugados con FITC. Las células solas no mostraban fluorescencia (no se muestra). La adición de ARNip marcado con FITC solo produjo internalización mínima del ARNip (no se muestra). La internalización de E1-L-thP1 solo se observó en 60 minutos a 37°C (no se muestra). E1-L-thP1 podía ser eficaz para promover la internación del ARNip conjugado con FITC unido (no se muestra). Se mezcló E1-L-thP1 (10 µg) con FITC-ARNip (300 nM) y se dejó que se formaran complejos de E1-L-thP1-ARNip que después se añadieron a células Calu-3 que expresaban Trop-2. Después de incubación durante 4 h a 37°C, se comprobó la internación en las células del ARNip por microscopía de fluorescencia (no se muestra).

Se examinó la capacidad de E1-L-thP1 para inducir la apoptosis por internalización del ARNip. Se mezcló E1-L-thP1 (10 µg) con diferentes cantidades de ARNip (AllStars Cell Death siRNA, Qiagen, Valencia, CA). El complejo de E1-L-thP1-ARNip se añadió a células ME-180. Después de 72 h de incubación, las células se tripsinizaron y se llevó a cabo la tinción con anexina V para evaluar la apoptosis (no se muestra). La adición de cantidades crecientes de E1-L-thP1-ARNip produjo un aumento dependiente de la dosis de la apoptosis (no se muestra). Estos resultados muestran que E1-L-thP1 podría suministrar eficazmente moléculas de ARNip en las células e inducir la apoptosis de las células objetivo.

Conclusiones

La tecnología de DNL™ proporciona un procedimiento modular para ligar eficazmente múltiple moléculas de protamina al anticuerpo anti-Trop-2 hRS7 produciendo la nueva molécula E1-L-thP1. La SDS-PAGE demostró la homogeneidad y pureza de E1-L-thP1. La protección frente a DNasa y ensayos de desplazamiento en gel mostraban la actividad de unión al ADN de E1-L-thP1. E1-L-thP1 se internalizaba en las células como el anticuerpo hRS7 original y era capaz de internalizar eficazmente moléculas de ARNip en células que expresaban Trop-2, tales como ME-180 y Calu-3.

El experto en la técnica comprenderá que la técnica de DNL™ no está limitada a cualquier anticuerpo específico o especie de ARNip. Más bien, se pueden usar los mismos métodos y composiciones demostrados en la presente memoria para hacer complejos de suministro dirigidos que comprenden cualquier anticuerpo (p. ej., anti-CD20 o anti-CD-22), cualquier vehículo de ARNip y cualquier especie de ARNip. El uso de una IgG bivalente en complejos de suministro dirigidos produciría una semivida en la circulación prolongada y mayor avidéz de unión a células diana, dando como resultado mayor absorción y eficacia mejorada.

Ejemplo 7. Inmunotoxinas de DNL™ basadas en ribonucleasa que comprenden ranpirnasa (Rap) cuádruple conjugada con anticuerpos que se dirigen a linfocitos B

Los autores de la invención aplicaron el método de DNL™ para generar una nueva clase de inmunotoxinas, cada una de las cuales comprendía cuatro copias de Rap unidas específicamente al sitio a una IgG bivalente. Combinaron un módulo de Rap-DDD recombinante, producido en *E. coli*, con módulos de IgG-AD humanizados, recombinantes, que se produjeron en células de mieloma y linfomas de linfocitos B dirigidos y leucemias por unión a CD20 (hA20, veltuzumab), CD22 (hLL2, epratuzumab) o HLA-DR (hL243, IMMU-114), para generar 20-Rap, 22-Rap y C2-Rap, respectivamente. Para cada construcción, un dímero de Rap se ligó covalentemente al extremo C de cada cadena pesada de la respectiva IgG. Se hizo de forma similar una construcción de control, 14-Rap, usando labetuzumab (hMN-14), que se une a un antígeno (CEACAM5) no expresado en linfomas de linfocitos B/leucemias.

Rap-DDD2

pQDWLTFQKKHITNTRDVCNIMSTNLFHCKDKNTFIYSRPEPVKAICKGIIASKNV
LTTSEFYLSDCNVTSRPFCKYKLLKSTNKFCVTCENQAPVHFVGVGSCGGGGSLECG
HIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQPPDLVEFAVEYFTRLREARAVEHHHHHHH (SEQ
ID NO:127)

La secuencia de aminoácidos deducida de Rap-DDD2 secretado se muestra arriba (SEQ ID NO: 127). Rap, subrayado; conector, cursiva; DDD2, negrita; pQ, glutamina amino terminal convertida en piroglutamato. Rap-DDD2 se produjo en *E. coli* como cuerpos de inclusión que se purificaron por IMAC en condiciones desnaturizantes, se volvió a plegar y después se dializó en PBS antes de purificación por cromatografía de intercambio aniónico con Q-Sepharose. La SDS-PAGE en condiciones reductoras dio una banda de proteína con un Mr adecuado para Rap-DDD2 (18,6 kDa) (no se muestra). El rendimiento final de Rap-DDD2 purificado era 10 mg/l de cultivo.

El método de DNL™ se usó para genera rápidamente un panel de conjugados de IgG-Rap. Los módulos de IgG-AD se expresaron en células de mieloma y se purificaron del líquido sobrenadante del cultivo usando cromatografía de afinidad con proteína A. Se produjo el módulo de Rap-DDD2 y se mezcló con IgG-AD2 para formar un complejo de DNL™. Puesto que los módulos CH3-AD2-IgG tienen dos péptidos AD2 y cada uno puede ligar un dímero de Rap, la construcción de IgG-Rap DNL™ resultante comprende cuatro grupos Rap y una IgG. IgG-Rap se forma casi cuantitativamente a partir de los módulos constituyentes y se purifica hasta casi homogeneidad con proteína A.

Antes de la reacción de DNL™, CH3-AD2-IgG existe tanto como un monómero como también como un dímero unido por disulfuro (no se muestra). En las condiciones no reductoras, IgG-Rap se obtiene como una agrupación de bandas de peso molecular alto del tamaño esperado entre estos CH3-AD2-IgG monoméricos y diméricos (no se muestra). Las condiciones reductoras, que reducen los conjugados a sus polipéptidos constituyentes, muestran la pureza de IgG-Rap y la consistencia del método de DNL™, puesto que solo se visualizaban bandas que representan cadena pesada-AD2 (HC-AD2), cadena ligera kappa y Rap-DDD2 (no se muestra).

El análisis por HPLC de fase inversa de 22-Rap (no se muestra) daba un solo pico de proteína a 9,10 min que eluía entre los dos picos de CH3-AD2-IgG-hLL2, que representan las formas monómera (7,55 min) y la dímera (8,00 min). El módulo Rap-DDD2 se aisló como una mezcla de dímero y tetrámero (reducido a dímero durante el método DNL™), que eluyeron a 9,30 y 9,55 min, respectivamente (no se muestra).

- 5 El análisis de LC/MS de 22-Rap se llevó a cabo por acoplamiento de HPLC de fase inversa usando una columna C8 con espectrometría de masas ESI-TOF (no se muestra). El espectro de 22-Rap sin modificar identifica dos especies mayoritarias, que tienen bien dos glucanos N-ligados G0F (G0F/G0F) o un G0F más un G1F (G0F/G1F), además de algunas glucoformas minoritarias (no se muestra). La desglucosilación enzimática produjo una sola masa desconvolucionada de acuerdo con la masa calculada de 22-Rap (no se muestra). El espectro resultante después de
10 reducción con TCEP identificaba el polipéptido de cadena pesada-AD2 modificado con un glucano N-ligado de la estructura G0F o G1F así como formas minoritarias adicionales (no se muestra). Cada uno de los tres polipéptidos subunidades que comprenden 22-Rap se identificaron en el espectro desconvolucionado de la muestra reducida y desglucosilada (no se muestra). Los resultados confirman que los polipéptidos tanto Rap-DDD2 como HC-AD2
15 tienen una glutamina amino terminal que se convierte en piroglutamato (pQ); por lo tanto, 22-Rap tiene 6 de sus 8 polipéptidos constituyentes modificados por pQ.

Se evaluó la citotoxicidad in vitro en tres líneas celulares de NHL. Cada una de las líneas celulares expresa CD20 con una densidad superficial considerablemente alta comparada con CD22; sin embargo, la velocidad de internalización para hLL2 (anti-CD22) es mucho más rápida que para hA20 (anti-CD20). 14-Rap comparte la misma
20 estructura que 22-Rap y 20-Rap, pero su antígeno (CEACAM5) no es expresado por las células NHL. Las células se trataron continuamente con IgG-Rap como agentes individuales o con combinaciones de MAb originales más rRap. Tanto 20-Rap como 22-Rap mataban cada una de las líneas celulares en concentraciones superiores a 1 mM, indicando que su acción es citotóxica en oposición a simplemente citostática (no se muestra). 20-Rap era la IgG-Rap más potente, sugiriendo que la densidad del antígeno puede ser más importante que la velocidad de internalización. Se obtuvieron resultados similares para células Daudi y Ramos, donde 20-Rap (CE50 ~0,1 nM) era 3-6 veces más
25 potente que 22-Rap (no se muestra). La línea de linfoma de células del manto resistente a rituximab, Jeko-1, presenta CD20 aumentado pero CD22 disminuido, comparado con células Daudi y Ramos. Es importante que 20-Rap presentaba citotoxicidad muy potente (EC₅₀ ~20 pM) en Jeko-1, que era 25 veces más potente que 22-Rap (no se muestra).

El método de DNL™ proporciona un procedimiento modular para ligar eficazmente múltiples citotoxinas en un anticuerpo dirigido, produciendo nuevas inmunotoxinas que se espera que muestran mayor potencia in vivo debido a la farmacocinética mejorada y especificidad en el direccionamiento. LC/MS, RP-HPLC y SDS-PAGE demostraron la
30 homogeneidad y pureza de IgG-Rap. El direccionamiento de Rap con un MAb a un antígeno de la superficie celular potenciaba su citotoxicidad específica de tumor. La densidad de antígeno y la velocidad de internalización son ambos factores críticos para la potencia observada in vitro de IgG-Rap. Los resultados in vitro muestra que IgG-Rap dirigido a CD20, CD22 o HLA-DR tiene una potente actividad biológica para la terapia de linfomas de linfocitos B y leucemias.

Ejemplo 8. Producción y uso de una construcción de DNL™ que comprende dos motivos de anticuerpo diferentes y una citoquina

En algunas realizaciones, las construcciones de DNL™ triméricas pueden comprender tres motivos efectores diferentes, por ejemplo dos motivos de anticuerpos diferentes y un motivo de citoquina. Se describe aquí la
40 generación y caracterización del primer MAb-IFN α , denominado 20-C2-2b, que comprende dos copias de IFN- α 2b y un F(ab)₂ estabilizado de hL243 (anti-HLA-DR humanizado; IMMUN-114) conectado específicamente al sitio a veltuzumab (anti-CD20 humanizado). In vitro, 20-C2-2b inhibía cada una de las cuatro líneas de células de linfoma y ocho de mieloma, y era más eficaz que MAb-IFN α dirigido a CD20 monoespecífico, o una mezcla que comprendía los anticuerpos originales e IFN α en todas salvo una línea de mieloma (HLA-DR⁺/CD20⁻) (no se muestra), sugiriendo que 20-C2-2b podría ser útil en el tratamiento de diferentes trastornos hematopoyéticos. 20-C2-2b presentaba mayor
45 citotoxicidad contra KMS12-BM (mieloma CD20⁺/HLA-DR⁺) que el MAb-IFN α monoespecífico que se dirige solo a HLA-DR o CD20 (no se muestra), indicando que los tres componentes en 20-C2-2b pueden contribuir a la toxicidad. Los descubrimientos de los autores de la invención indican que una sensibilidad dada de la célula a frente a MAb-IFN α depende de su sensibilidad frente a IFN α y los anticuerpos específicos, así como de la expresión y densidad de los antígenos a los que se dirigen.

Puesto que 20-C2-2b tiene citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC), pero no CDC, y puede dirigirse tanto a CD20 como a HLA-DR, es útil para la terapia de una amplia variedad de trastornos hematopoyéticos que expresan cualquiera de los antígenos o ambos.

55 Anticuerpos

Las abreviaturas usadas en la siguiente descripción son: 20 (C_H3-AD2-IgG-v-mab, módulo de IgG anti-CD20 DNL™); C2 (C_H1-DDD2-Fab-hL243, módulo de Fab2 anti-HLA-DR DNL™); 2b (módulo dimérico de IFN α 2B-DDD2 DNL™); 734 (módulo de IgG anti-in-DTPA DNL™ usando como control no dirigido). Los siguientes MAb fueron proporcionados por Immunomedics, Inc.: veltuzumab o v-mab (IgG₁ anti-CD20), hL243y4p (Immu-114, IgG₄ anti-

HLA-DR), un MAb anti-IFN α murino, y MAb de rata antiidiotipo frente a v-mab (WR2) y hL243 (WT).

Construcciones de DNL™

5 El MAb-IFN α mono-específico (20-2b-2b, 734-2b-2b y C2-2b-2b) y el HexAb biespecífico (20-C2-C2) se generaron por combinación de un módulo de IgG-AD2 con módulos de DDD2 usando el método de DNL™, como se describe en los ejemplos precedentes. El 734-2b-2b, que comprende IFN α 2b tetrámero y MAb h734 [IgG₁ anti-Indio-DTPA], se usó como un MAb-IFN α de control no dirigido.

10 La construcción del vector de expresión de mamífero así como la generación posterior de los clones de producción y purificación de C_H3-AD2-IgG-v-mab se describen en los ejemplos precedentes. La proteína de fusión recombinante expresada tenía el péptido conectado al extremo carboxilo del dominio C_H3 de v-mab por un péptido conector flexible de 15 aminoácidos de longitud. La coexpresión de los polipéptidos de cadena pesada-AD2 y cadena ligera da como resultado la formación de una estructura de IgG equipada con dos péptidos AD2. El vector de expresión se transfirió en células Sp/ESF (una línea celular genéticamente modificada de Sp2/0) por electroporación. El vector pdHL2 contiene el gen de la dihidrofolato reductasa, permitiendo así la selección clonal, así como la amplificación de genes con metotrexato (MTX). Se aislaron clones estables de placas de 96 pocillos seleccionados con medio que contenía MTX 0,2 μ M. Los clones se cribaron por la productividad de C_H3-AD2-IgG-v-mab mediante un análisis ELISA de tipo sándwich. El módulo se produjo en un cultivo en botella giratoria con medio exento de suero.

20 El módulo DDD, IFN α 2b-DDD2, se generó como se ha descrito antes por fusión recombinante del péptido DDD2 con el extremo carboxilo de IFN α 2b humano con un péptido conector flexible de 18 aminoácidos de longitud. Como es el caso para todos los módulos de DDD, la proteína de fusión expresada forma espontáneamente un homodímero estable.

25 El vector de expresión C_H1-DDD2-Fab-hL243 se generó a partir del vector hL243-IgG-pdHL2 por escisión de la secuencia para los dominios C_H1-bisagra-C_H2-C_H3 con las enzimas de restricción SacII y EagI y sustituyéndolos por una secuencia de 507 pb que codifica C_H1-DDD2, que se escindió del vector de expresión C-DDD2-hMN-14-pdHL2 con las mismas enzimas. Después de transfección de C_H1-DDD2-Fab-hL243-pdHL2 en células Sp/ESF por electroporación, se cribaron los clones resistentes a MTX, estables, según la productividad por un análisis de ELISA tipo sándwich usando placas de microvaloración de 96 pocillos recubiertas con la cadena kappa de ratón anti-IgG humana para capturar la proteína de fusión, que se detectó con Fab de cabra anti-IgG humana conjugado con peroxidasa de rábano picante. El módulo se produjo en un cultivo en botella giratoria.

30 Los cultivos en botella giratoria en medio H-SFM exento de suero y producción en un bioreactor de alimentación discontinua, daban resultados comparables a otros módulos de IgG-AD2 y módulos de citoquina-DDD2 generados hasta la fecha. C_H3-AD2-IgG-v-mab e IFN α 2b-DDD2 se purificaron de los caldos de cultivo por cromatografía de afinidad usando MABSELECT™ (GE Healthcare) y gel de afinidad de níquel HIS-SELECT® HF (Sigma), respectivamente, como se ha descrito previamente (Rossi et al., *Blood* 2009, 114:3864-71). El caldo de cultivo que contenía el módulo C_H1-DDD2-Fab-hL243 se aplicó directamente al gel de afinidad KAPPASELECT® (GE-Healthcare), que se lavó hasta el valor base con PBS y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,5.

Generación de 20-C2-2b por DNL™

35 Se combinaron tres módulos de DNL™ (C_H3-AD2-IgG-v-mab, C_H1-DDD2-Fab-hL243, e IFN α 2b-DDD2) en cantidades equimolares para generar el bsMAb-IFN α , 20-C2-2b. Después de una etapa de acoplamiento durante la noche en condiciones reductoras suaves (glutatión reducido 1 mM) a temperatura ambiente, se añadió glutatión oxidado (2 mM) para facilitar la formación de enlace disulfuro (bloqueo). El 20-C2-2b se purificó hasta casi homogeneidad usando tres etapas de cromatografía de afinidad secuenciales. Inicialmente, la mezcla de DNL™ se purificó con proteína A (MABSELECT™), que une el grupo C_H3-AD2-IgG-v-MAb y elimina el IFN α 2b-DDD2 o C_H1-DDD2-Fab-hL243 que no han reaccionado. El material unido a proteína A se purificó más por IMAC usando gel de afinidad de níquel HIS-SELECT® HF Gel, que une específicamente el motivo IFN α 2b-DDD2 y elimina cualesquiera construcciones que carezcan de este grupo. La etapa de procesamiento final, usando gel de afinidad de hL243-anti-idiotipo eliminaba cualquier molécula que careciera de C_H1-DDD2-Fab-hL243.

50 El experto en la técnica comprenderá que la cromatografía de afinidad se puede usar para purificar complejos de DNL™ que comprenden cualquier combinación de motivos efectores, con la condición de que los ligandos para cada uno de los tres motivos efectores se puedan obtener y unir al material de la columna. La construcción de DNL™ seleccionada es la que se une a cada una de las tres columnas que contienen el ligando para cada uno de los tres motivos efectores y se puede eluir después de lavado para eliminar los complejos no unidos.

55 El siguiente ejemplo es representativo de varias preparaciones similares de 20-C2-2b. Se combinaron cantidades equimolares de C_H3-AD2-IgG-v-mab (15 mg), C_H1-DDD2-Fab-hL243 (12 mg), e IFN α 2b-DDD2 (5 mg) en 30 ml de volumen de reacción a la solución y se añadió glutatión reducido 1 mM a la solución. Después de 16 h a temperatura ambiente, se añadió glutatión oxidado a la mezcla, que se mantuvo a temperatura ambiente durante 6 h adicionales. La mezcla de reacción se aplicó a una columna de afinidad de proteína A de 5 ml, que se lavó hasta el valor base con PBS y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,5. El eluido, que contenía ~20 mg de proteína, se neutralizó con Tris-HCl 3 M, pH 8,6, y se dializó en tampón de unión HIS-SELECT® (imidazol 10 mM, NaCl 300 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, pH

8,0) antes de aplicarlo a una columna de 5 ml HIS-SELECT® IMAC. La columna se lavó hasta el valor base con tampón de unión y se eluyó con imidazol 250 mM, NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0.

5 El eluato de IMAC, que contenía ~11,5 mg de proteína, se aplicó directamente a una columna de afinidad WP (anti-hL243), que se lavó hasta el valor base con PBS y se eluyó con glicina 0,1 M, pH 2,5. El procedimiento dio como resultado 7 mg de 20-C2-2b altamente purificado. Esto era aproximadamente 44% del rendimiento teórico de 20-C2-2b, que es 50% del material de partida total (16 mg en este ejemplo) con 25% de cada uno de 20-2b-2b y 20-C2-C2 producidos como productos secundarios.

Generación y caracterización de 20-C2-2b

10 El MAb-IFN α se generó combinando el módulo IgG-AD2, C_H3-AD2-IgG-v-mab, con dos módulos DDD diméricos diferentes, C_H1-DDD2-Fab-hL243 e IFN α 2b-DDD2. Debido a la asociación aleatoria de cualquiera de los módulos DDD con dos grupos AD2, se espera que se formen dos productos secundarios, 20-C2-C2 y 20-2b-2b, además de 20-C2-2b.

15 La SDS-PAGE no reductora (no se muestra) resolvió 20-C2-2b (~305 kDa) como una agrupación de bandas situada entre 20-C2-C2 (~365 kDa) y 20-2b-2b (255 kDa). La SDS-PAGE reductora resolvió cinco polipéptidos (v-mab HC-AD2, hL243 Fd-DDD2, IFN α 2b-DDD2 y v-mab y cadenas ligeras kappa hL243 que migraban) que comprendían 20-C2-2b (no se muestra). IFN α 2b-DDD2 y hL243 Fd-DDD2 están ausentes en 20-C2-C2 y 20-2b-2b. MABSELECT™ se une a las tres especies principales producidas en la reacción de DNL™, pero elimina cualquier exceso de IFN α 2b-DDD2 y C_H1-DDD2-Fab-hL243. La fracción no unida de HIS-SELECT® contenía principalmente 20-C2-C2 (no se muestra). La fracción no unida de la cromatografía de afinidad de WT comprendía 20-2b-2b (no se muestra).
20 Cada una de las muestras se sometió a SE-HPLC y análisis de inmunorreactividad, que corroboraba los resultados y conclusiones de los análisis de SDS-PAGE.

Después de la reducción de 20-C2-2b, sus cinco polipéptidos componentes se resolvieron por RP-HPLC y se generaron los espectros de masas con deconvolución ESI-TOF individuales para cada pico (no se muestra). El IFN α 2 natural, pero no el recombinante expresado de forma bacteriana, es O-glucosilado en Thr-106 (Adolf et al.,
25 *Biochem J* 1991;276 (Pt 2):511-8). Se determinó que ~15% de los polipéptidos que comprendían el módulo IFN α 2b-DDD2 eran O-glucosilados y se pueden resolver de los polipéptidos no glucosilados por RP-HPLC y SDS-PAGE (no se muestra). El análisis por LC/MS de 20-C2-2b identificaba las especies tanto O-glucosiladas como no glucosiladas de IFN α 2b-DDD2 con precisiones de masas de 15 ppm y 2 ppm, respectivamente (no se muestra). La masa observada de la forma O-glucosilada indica un glucano unido por O que tiene la estructura NeuGc-NeuGc-Gal-GalNAc, que también se predijo (<1 ppm) para 20-2b-2b (no se muestra). El análisis por LC/MS identificaba tanto v-mab como las cadenas kappa hL243 así como hL243-Fd-DDD2 (no se muestra) como especies individuales no modificadas, con masas observadas que se corresponden con las calculadas (<35 ppm). Se identificaron dos
30 glucoformas principales de v-mab HC-AD2 que tenían masas de 53.714,73 (70%) y 53.877,33 (30%), indicando N-glicanos G0F y G1F, respectivamente, que típicamente están asociados con IgG (no se muestra). El análisis también confirmaba que el extremo amino del HC-AD2 es modificado por piroglutamato, como se predijo para los polipéptidos que tenían una glutamina amino terminal.

El análisis por SE-HPLC de 20-C2-2b dio un pico de proteína predominante con un tiempo de retención (6,7 min) de acuerdo con su masa calculada y entre los de 20-C2-C2 (6,6 min) más grande y 20-2b-2b (6,85 min) más pequeño, así como algunos picos de peso molecular mayor que probablemente representan dímeros no covalentes formados
40 por autoasociación de IFN α 2b (no se muestra).

Ensayos de inmunorreactividad demostraron la homogeneidad de 20-C2-2b con cada molécula que contenía tres grupos funcionales (no se muestra). La incubación de 20-C2-2b con un exceso de anticuerpos contra cualquiera de los tres módulos constituyentes daba como resultado la formación cuantitativa de inmunocomplejos de peso molecular alto y la desaparición del pico de 20-C2-2b (no se muestra). Las fracciones no unidas de HIS-SELECT® y
45 WT de afinidad no eran inmunorreactivas con WT y anti-IFN α , respectivamente (no se muestra). El MAb-IFN α mostró similar avidéz de unión que sus MAb originales (no se muestra).

Actividad biológica de IFN α

Se midieron las actividades específicas de varios MAb-IFN α usando un ensayo de gen indicador basado en células y se compararon con el peg-interferón alfa-2B (no se muestra). Como se esperaba, la actividad específica de 20-C2-
50 2b (2454 UI/pmol), que tenía dos grupos IFN α 2b, era significativamente menor que la de 20-2b-2b (4447 UI/pmol) o 734-2b-2b (3764 UI/pmol), aunque mayor que la del peg-interferón alfa-2b (P<0,001) (no se muestra). La diferencia entre 20-2b-2b y 734-2b-2b no era significativa. La actividad específica entre todos los agentes varía mínimamente cuando se normaliza respecto a las UI/pmol de IFN α total. Basándose en estos datos, la actividad específica de cada grupo IFN α 2b del MAb-IFN α es aproximadamente 30% del IFN α 2b recombinante (~4000 UI/pmol).

55 En el contexto ex vivo, la construcción de DNL™ 20-C2-2b reducía drásticamente las células de linfoma de forma más eficaz que los linfocitos B normales y no tenía efecto en los linfocitos T normales (no se muestra). Sin embargo, eliminaba eficazmente monocitos (no se muestra). Cuando v-mab no tenía efecto en monocitos, se observó reducción drástica después de tratamiento con hL243a4p y MAb-IFN α , presentando 20-2b-2b y 734-2b-2b toxicidad

similar (no se muestra). Por lo tanto, la potencia predeciblemente más alta de 20-C2-2b se atribuye a las acciones combinadas de anti-HLA-DR e IFN α , que se puede aumentar dirigiendo a HLA-DR. Estos datos sugieren que la reducción drástica de monocitos puede ser un efecto farmacodinámico asociado con la terapia con anticuerpos anti-HLA-DR así como IFN α ; sin embargo, este efecto sería probablemente transitorio debido a que la población de monocitos se repoblaría a partir de citoblastos hematopoyéticos.

El experto en la técnica comprenderá que el procedimiento descrito aquí para producir y usar inmunocitoquina biespecífica, u otras construcciones de DNLTM que comprenden tres restos efectores diferentes, se puede usar con cualquier combinación de anticuerpos, fragmentos de anticuerpos, citoquinas u otros efectores que se pueden incorporar en una construcción de DNLTM, por ejemplo, la combinación de anticuerpo anti-CD20 y anti-CD22 con IFN α 2b.

Ejemplo 9. Complejo de DNLTM anti-VIH

Entre los diferentes anticuerpos que neutralizan el VIH-1, el anticuerpo murino anti-gp120, P4/D10, se distingue por su capacidad para inducir citotoxicidad celular dependiente de anticuerpo (ADCC) para eliminar linfocitos T infectados que expresan el epítipo de gp120 antigénico unido por P4/D10 (Broiden et al., 1990, *J Virol* 64:936-40). La mayor potencia también se mostró para P4/D10 conjugado con doxorubicina para neutralizar e inhibir la propagación intracelular de la infección por el VIH in vitro, así como para proteger contra la infección por VIH-1/MuLV in vivo (Johansson et al., 2006, *AIDS* 20:1911-15).

Se preparan complejos de DNLTM que comprenden IgG P4/D10, u otros anticuerpos anti-VIH o fragmentos de los mismos, junto con uno o más agentes anti-VIH. En una realización preferida ilustrada en la presente memoria, el agente anti-VIH es el inhibidor de fusión T20 HIV (enfuvirtida, FUZEON®) (Asboe, 2004, *HIV Clin Trials* 5:1-6).

En una realización preferida, se prepara una nueva clase de agentes anti-VIH que comprende múltiples copias de enfuvirtida (T20) unida a un anticuerpo quimérico, humano o humanizado con especificidad por VIH-1, tal como P4/D10, como complejos de DNLTM. Dichos conjugados permiten una administración menos frecuente que con T20 no conjugado para bloquear la entrada del VIH-1 en los linfocitos T, neutralizar el VIH-1 libre y eliminar las células infectadas por el VIH. En una construcción de DNLTM de ejemplo, el extremo C-terminal de cada cadena ligera de un anticuerpo IgG se une por un conector corto a un resto de AD2 (SEQ ID NO: 4) y también se expresa como una proteína de fusión como se describe en los ejemplos anteriores. El inhibidor de fusión T20 HIV se une a un motivo de DDD2 (SEQ ID NO: 2) y también se expresa como una proteína de fusión. Dos copias del motivo de DDD2 forman espontáneamente un dímero que se une al motivo de AD2, formando un complejo de DNLTM que comprende un anticuerpo IgG y cuatro copias de T20.

La secuencia de aminoácidos de DDD2-T20 se muestra en la SEQ ID NO: 128. La secuencia de DDD2 está subrayada. A esta le sigue un conector corto y región bisagra y un marcador de polihistidina para la purificación de afinidad. La secuencia de T20 en el extremo C-terminal está en negrita. DDD2-T20 se ha producido y usado para hacer complejos de DNLTM, como se describe a continuación.

DDD2-T20

MCGHIQIPPGLTELLQGYTVEVLRQOPDLVEFAVEYFTRLREARAEFPKPSTPPGSSG
HHHHHHGSYTSLIHSLIEESQNQQEKNEQELLELDK^{WASLWNWF} (SEQ ID
NO:128)

P4/D10 es un anticuerpo murino que puede inducir anticuerpos humanos anti-IgG de ratón (HAMA) cuando se administra a sujetos humanos. Las formas quiméricas o humanizadas de P4/D10 serían más adecuadas para uso terapéutico en seres humanos. Se construyó un P4/D10 quimérico (cP4/D10) sustituyendo secuencias de la región constante murina de P4/D10 por secuencias de la región constante del anticuerpo humano. Se preparó cP4/D10 y su afinidad de unión por gp160 (que comprende tanto gp120 como gp41) se comparó con el P4/D10 murino y un anticuerpo T4-2 (anti-CD4) no dirigido de control. La afinidad (no se muestra) y la actividad in vitro (no se muestra) de cP4/D10 se determinó que eran aproximadamente dos veces menores que la de P4/D10 original, lo cual es aceptable y se puede mejorar más por subclonación e humanización adicionales. El anticuerpo no dirigido de control no se unía a gp160.

La población de pacientes de VIH objetivo principal son individuos que fracasan en la terapia HAART, donde varias dosis de conjugados de DNLTM pueden reducir eficazmente el número de células infectadas y viriones en la circulación. Una población de pacientes secundaria son individuos con tratamiento HAART eficaz, con el objetivo de alcanzar y eliminar las pocas células productoras de virus persistentes.

El DDD2-T20 se combina con cP4/D10-AD2 para producir una construcción de DNLTM que es específica para el VIH. Cuando se comparan los resultados en una concentración molar base para T20, la construcción de T20-DDD2 es más eficaz que T20 no conjugado y la construcción de DNLTM n *cP4/D10-T20 es más eficaz en más de un orden de magnitud que T20 no conjugado. La construcción de DNLTM también presentaba una semivida significativamente

mayor in vivo, de aproximadamente 24 horas comparado con 2,8 horas para T20. Los resultados muestran que un complejo de DNL™ que comprende T20 presenta una semivida sustancialmente más larga en la circulación y una eficacia sustancialmente mayor que T20 no conjugado.

5 Ejemplo 10. Generación de un complejo de DNL que comprende cuatro motivos IFN- α 2b-DDD2 conectados a C_H3-AD2-IgG

Se hace como sigue un complejo de DNL que comprende cuatro motivos IFN- α 2b-DDD2 conectados a C_k-AD2-IgG. Brevemente, se combina un C_k-AD2-IgG seleccionado con aproximadamente dos equivalentes molares de IFN- α 2b-DDD2 y la mezcla se reduce en condiciones suaves durante la noche a temperatura ambiente después de añadir EDTA 1 mM y glutatión reducido 2 mM (GSH). Se añade glutatión oxidado hasta 2 mM y la mezcla se mantiene a temperatura ambiente durante 12-24 horas adicionales. El conjugado de DNL se purifica en una columna de afinidad de proteína A. Se prepara un conjugado de DNL designado *20-2b, que comprende cuatro copias de IFN- α 2b ancladas en C_k-AD2-IgG- hA20 (con especificidad por CD20). El análisis de SE-HPLC de *20-2b generado a partir de IFN- α 2b-DDD2 producido por mamífero (m) o *E. coli* (e), muestra cada uno un pico principal que tiene un tiempo de retención de acuerdo con un complejo covalente compuesto de una IgG y 4 IFN- α 2b. Se observan perfiles de SE-HPLC similares para los otros tres conjugados de IFN-IgG.

La actividad biológica de IFN α in vitro *20-2b se compara con la de agentes IFN- α 2b PEGilados comerciales, PEGASYS® y PEG-INTRON®, usando ensayos de indicador basado en células, protección vírica y proliferación de linfoma. Las actividades específicas se determinan usando un kit basado en células que usa una línea celular de promonocitos humanos transgénicos que llevan un gen indicador fusionado con un elemento de respuesta simulado de interferón. La actividad específica de *20-2b es mayor que tanto para PEGASYS® como para PEG-INTRON®. El tener cuatro grupos IFN- α 2b contribuye a la mayor potencia del MAb-IFN α . Cuando se normalizaba respecto a los equivalentes de IFN α , la actividad específica/IFN α es aproximadamente 10 veces mayor que para PEGASYS® y solo aproximadamente 2 veces menos que PEG-INTRON®.

La comparación de *20-2b, PEGASYS® y PEG-INTRON® en un ensayo de protección vírica in vitro demuestra que *20-2b retiene la actividad antivírica de IFN- α 2b con actividades específicas similares a PEG-INTRON® y 10 veces mayores que PEGASYS®.

El IFN- α 2b puede tener un efecto antiproliferativo o citotóxico directo en algunas líneas tumorales. La actividad de *20-2b se mide en un ensayo de proliferación in vitro con una línea celular de linfoma de Burkitt (Daudi) que es muy sensible al IFN α . Cada uno de los agentes IFN- α 2b inhibe eficazmente (>90%) Daudi in vitro con una potencia alta. Sin embargo, *20-2b es aproximadamente 30 veces más potente que las construcciones de MAb-IFN α no dirigidas.

Las propiedades farmacocinéticas (PK) de *20-2b se evalúan en ratones macho Swiss-Webster y se comparan con las de PEGASYS®, PEG-INTRON y α 2b-413 (IFN pegilado hecho por DNL™). Las concentraciones de IFN- α en las muestras de suero en diferentes tiempos se determinan por ELISA siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, las muestras de suero se diluyen adecuadamente de acuerdo con la preferencia de IFN- α humano proporcionada en el kit. Un anticuerpo unido a los pocillos de la placa de microvaloración captura el interferón. Después se usa un segundo anticuerpo para revelar el interferón unido, que se cuantifica mediante anticuerpo anti-anticuerpo secundario conjugado con peroxidasa de rábano picante (HRP) después de adición de tetrametilbencidina (TMB). Las placas se leen a 450 nm. Los resultados del análisis PK mostraban eliminación significativamente más lenta y tiempos de permanencia en el suero más largos de *20-2b comparado con los otros agentes.

Ejemplo 11. Generación de módulo de DDD basado en xenoantígeno CD20

La secuencia de cADN para CD20 murino se amplifica por PCR, produciendo una secuencia en la que el xenoantígeno CD20 se fusiona por su extremo C a un polipéptido que consiste en la SEQ ID NO: 129.

**KSHHHHHHGGSGGGGSGGGCGHIIQIPPLTELLQGYTVEVLRQQPPDLVEFAVEYFTR
LREARA (SEQ ID NO:129)**

45 La amplificación por PCR se lleva a cabo usando un clon de cADN de CD20 murino de longitud completa como molde y cebadores de PCR seleccionados. La amplificación de PCR se clona en el vector (PROMEGA®). Se prepara un vector de expresión de mamífero DDD2-pdHL2 para ligado con CD20 por digestión con las endonucleasas de restricción XbaI y Bam HI. La amplificación de CD20 se escinde de PGEMT® con XbaI y Bam HI y se liga en el vector DDD2-pdHL2 para generar el vector de expresión CD20-DDD2-pdHL2.

50 CD20-DDD2-pdHL2 se lineariza por digestión con la enzima Sall y se transfecta establemente en células de mieloma Sp/EEE por electroporación (véase, p. ej., patente de EE.UU. 7.537.930, la sección de ejemplos). Se encuentran dos clones que tienen niveles detectables de CD20 por ELISA. Uno de los dos clones se adapta al crecimiento en medio exento de suero sin disminución sustancial en la productividad. El clon posteriormente se amplifica con concentraciones crecientes de metotrexato (MTX) de 0,1 a 0,8 μ M a lo largo de cinco semanas. En

esta etapa, se subclona limitando la dilución y se expande el subclón con la mayor producción.

5 El clon se expande en 34 botellas giratorias que contienen un total de 20 litros de SFM hibridoma exento de suero con MTX 0,8 μ M y se deja que alcance el cultivo terminal. El líquido sobrenadante se clarifica por centrifugación y se filtra (0,2 μ M). El filtrado se diafiltra en 1X tampón de unión (imidazol 10 mM, NaCl 0,5 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,5) y se concentra a 310 ml en la preparación para la purificación por cromatografía de afinidad de metal inmovilizado (IMAC). El concentrado se carga en una columna Ni-NTA de 30 ml, que se lava con 500 ml de Tween 20 al 0,02% en 1X tampón de unión y después 290 ml de imidazol 30 mM, Tween 20 al 0,02%, NaCl 0,5 M, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,5. El producto se eluye con 110 ml de imidazol 250 mM, Tween 20 al 0,02%, NaCl 150 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,5. Se purifican aproximadamente 6 mg de CD20-DDD2. La pureza de CD20-DDD2 se evalúa por SDS-PAGE en 10 condiciones reductoras. CD20-DDD2 es la banda teñida más intensamente y explica aproximadamente 50% de la proteína total.

Ejemplo 12. Generación de hLL1 Fab-(CD20)₂ por DNL

15 Se produce un motivo C_k-AD2-IgG-hLL1 (anti-CD74) como se describe en el ejemplo 1. Se produce un motivo DDD2-mCD20 como se describe en el ejemplo 11. Se lleva a cabo una reacción de DNL por la adición de hLL1 IgG-AD2 reducido y liofilizado a CD20-DDD2 en imidazol 250 mM, Tween 20 al 0,02%, NaCl 150 mM, EDTA 1 mM, NaH₂PO₄ 50 mM, pH 7,5. Después de 6 h a temperatura ambiente en la oscuridad, la mezcla de reacción se dializa contra tampón de carga CM (NaCl 150 mM, NaAc 20 mM, pH 4,5) a 4°C en la oscuridad. La solución se carga en una columna CM-FF Hi-Trap de 1 ml (AMERSHAM®), la cual se preequilibra con tampón de carga CM. Después de 20 cargar la muestra, la columna se lava con tampón de carga CM hasta el valor base, seguido de lavado con 15 ml de NaCl 0,25 M, NaAc 20 mM, pH 4,5. El producto se eluye con 12,5 ml de NaCl 0,5 M, NaAc 20 mM, pH 4,5. La reacción de DNL produce la conjugación específica de sitio y covalente de hLL1 IgG con un dímero de mCD20. Los motivos tanto de IgG como CD20 retienen sus respectivas actividades fisiológicas en la construcción de DNL por ensayo de cultivo celular.

25 La construcción de DNL hLL1-mCD20 se administra a sujetos con mieloma múltiple (MM) y se encuentra que induce una respuesta inmunitaria contra citoblastos de MM putativos CD138^{neg}CD20⁺. La respuesta inmunitaria es eficaz para reducir o eliminar las células de enfermedad MM en los sujetos.

Listado de secuencias

<110> IBC PHARMACEUTICALS, INC.

30 <120> COMPLEJOS MULTIMÉRICOS CON ESTABILIDAD IN VIVO, FARMACOCINÉTICA Y EFICACIA MEJORADAS

<130> IBC137WO1

<140>

<141>

35 <150> 61/694,072

<151> 28.08.2012

<150> 61/693,042

<151> 24.08.2012

<150> 61/682,531

<151> 13.08. 2012

40 <150> 61/673,553

<151> 19.07. 2012

<150> 61/662,086

<151> 20.06.2012

<150> 61/654,310

45 <151> 01.06.2012

<160> 130

<170> patentIn version 3.5

<210> 1

<211> 44

50 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 5 <210> 2
- <211> 45
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 2

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
1 5 10 15

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
20 25 30

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40 45

- 15 <210> 3
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 20 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

- 25 <210> 4
- <211> 21
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 4

Cys Gly Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile
1 5 10 15

- 30 Gln Gln Ala Gly Cys
20

- <210> 5
- <211> 50
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

- 35 <220>
- <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

ES 2 672 974 T3

<400> 5
 Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala
 1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu Arg
 20 25 30

Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg Leu Glu Lys Glu Glu
 35 40 45

Ala Lys
 50

5 <210> 6
 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 6
 Met Ser Cys Gly Gly Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys
 1 5 10 15

His Asn Ile Gln Ala Leu Leu Lys Asp Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr
 20 25 30

Ala Arg Pro Glu Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Arg
 35 40 45

Leu Glu Lys Glu Glu Ala Lys
 50 55

15 <210> 7
 <211> 23
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 7
 Cys Gly Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser
 1 5 10 15

20 Asp Val Phe Gln Gln Gly Cys
 20

<210> 8
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25 <400> 8

ES 2 672 974 T3

Ser Leu Arg Glu Cys Glu Leu Tyr Val Gln Lys His Asn Ile Gln Ala
1 5 10 15

Leu Leu Lys Asp Val Ser Ile Val Gln Leu Cys Thr Ala Arg Pro Glu
20 25 30

Arg Pro Met Ala Phe Leu Arg Glu Tyr Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu
35 40 45

Glu Ala Lys
50

<210> 9

<211> 54

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 9

Ser Leu Lys Gly Cys Glu Leu Tyr Val Gln Leu His Gly Ile Gln Gln
1 5 10 15

Val Leu Lys Asp Cys Ile Val His Leu Cys Ile Ser Lys Pro Glu Arg
20 25 30

Pro Met Lys Phe Leu Arg Glu His Phe Glu Lys Leu Glu Lys Glu Glu
35 40 45

Asn Arg Gln Ile Leu Ala
50

<210> 10

<211> 44

10 <212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Gly Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala Val
20 25 30

Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Arg Gln
35 40

<210> 11

15 <211> 44

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 11

Ser Ile Glu Ile Pro Ala Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Phe Thr
1 5 10 15

Val Glu Val Leu Arg His Gln Pro Ala Asp Leu Leu Glu Phe Ala Leu
20 25 30

Gln His Phe Thr Arg Leu Gln Gln Glu Asn Glu Arg
35 40

20 <210> 12

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 672 974 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 12

Thr His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 5 <210> 13
- <211> 44
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 13

Ser Lys Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 15 <210> 14
- <211> 44
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 14

Ser Arg Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 20 <210> 15
- <211> 44
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

- 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 15

Ser His Ile Asn Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

ES 2 672 974 T3

<210> 16
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 16
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Ala Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15
Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30
Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

10 <210> 17
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

15 <400> 17
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Ser Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15
Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30
Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

20 <210> 18
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

25 <400> 18
Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Asp Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15
Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30
Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

30 <210> 19
<211> 44
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético
<400> 19

ES 2 672 974 T3

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Asn Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 20

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 20

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Ala Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

10 <210> 21

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 21

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Ser Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

20 <210> 22

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 22

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Asp Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 23

<211> 44

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 23

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Lys Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

5 Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 24

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 24

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Asn Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

15 Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 25

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

20 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 25

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Asn Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

25 <210> 26

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

30 <400> 26

ES 2 672 974 T3

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Glu Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 27

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 27

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Asp Phe Ala
20 25 30

10

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

<210> 28

<211> 44

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 28

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Leu
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

20

<210> 29

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 29

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ile
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

30

<210> 30

<211> 44

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

ES 2 672 974 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 30

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Val
20 25 30

Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 5 <210> 31
- <211> 44
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 31

Ser His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
1 5 10 15

Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
20 25 30

Val Asp Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
35 40

- 15 <210> 32
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 32

Asn Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

- 20 Ala
- <210> 33
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 33

Gln Leu Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

- 30 <210> 34
- <211> 17
- <212> PRT
- <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

ES 2 672 974 T3

<400> 34
Gln Val Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 35
<211> 17
5 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 35
Gln Ile Asp Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

10 Ala
<210> 36
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

15 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 36
Gln Ile Glu Phe Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

20 <210> 37
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

25 <400> 37
Gln Ile Glu Thr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

30 <210> 38
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 38
Gln Ile Glu Ser Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

35 <210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

ES 2 672 974 T3

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 39

Gln Ile Glu Tyr Ile Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

5 <210> 40
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

10 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 40

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

15 <210> 41
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 41

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

Ala

20 <210> 42
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 42

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Asn Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

30 <210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 43

35 Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Glu Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 44
<211> 17

ES 2 672 974 T3

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 44
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Gln Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 45
<211> 17
<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 45
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Asn Gln
1 5 10 15

15 Ala

<210> 46
<211> 17
<212> PRT

20 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 46
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Asn
1 5 10 15

Ala

25 <210> 47
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

30 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 47
Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
1 5 10 15

Leu

35 <210> 48
<211> 17
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 48

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
 1 5 10 15

Ile

<210> 49
 <211> 17
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 49

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln
 1 5 10 15

Val

10 <210> 50
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

15 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 50

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp Tyr Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

Ala

20 <210> 51
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 51

Gln Ile Glu Tyr Lys Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

25 Ala

<210> 52
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 52

Gln Ile Glu Tyr His Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
 1 5 10 15

Ala

35 <210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 672 974 T3

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 53

Gln Ile Glu Tyr Val Ala Lys Gln Ile Val Asp His Ala Ile His Gln
1 5 10 15

Ala

<210> 54

5 <211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

10 <400> 54

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

Ala Ile

<210> 55

<211> 18

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 55

Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn Ala Ile Gln Leu
1 5 10 15

Ser Ile

20 <210> 56

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 56

Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu Gln
1 5 10 15

Val Lys

<210> 57

<211> 18

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 57

Ala Leu Tyr Gln Phe Ala Asp Arg Phe Ser Glu Leu Val Ile Ser Glu
1 5 10 15

35 Ala Leu

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 58

Leu Glu Gln Val Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala
1 5 10 15

5 Thr

<210> 59

<211> 17

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 59

Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val
1 5 10 15

Phe

15 <210> 60

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

20 <400> 60

Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn Ala Val Leu Lys
1 5 10 15

Ala Val

<210> 61

<211> 18

<212> PRT

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 61

Thr Ala Glu Glu Val Ser Ala Arg Ile Val Gln Val Val Thr Ala Glu
1 5 10 15

Ala Val

30 <210> 62

<211> 18

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

35 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 62

Gln Ile Lys Gln Ala Ala Phe Gln Leu Ile Ser Gln Val Ile Leu Glu
1 5 10 15

Ala Thr

ES 2 672 974 T3

- <210> 63
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 5 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 63
 Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Val Ser Asp Val Met Gln Gln
 1 5 10 15
- 10 <210> 64
 <211> 24
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 15 <400> 64
 Asp Leu Ile Glu Glu Ala Ala Ser Arg Ile Val Asp Ala Val Ile Glu
 1 5 10 15
- Gln Val Lys Ala Ala Gly Ala Tyr
 20
- <210> 65
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- 20 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 65
 Leu Glu Gln Tyr Ala Asn Gln Leu Ala Asp Gln Ile Ile Lys Glu Ala
 1 5 10 15
- Thr Glu
- 25 <210> 66
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- 30 <400> 66
 Phe Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met Ile Trp Ser Asp Val
 1 5 10 15
- Phe Gln Gln Cys
 20
- 35 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético
- <400> 67

ES 2 672 974 T3

Gln Ile Glu Tyr Leu Ala Lys Gln Ile Pro Asp Asn Ala Ile Gln Gln
 1 5 10 15

Ala

<210> 68

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 68

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

10

Val Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly
 20 25

<210> 69

<211> 25

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 69

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

Pro Ile Glu Gln Val Lys Ala Ala Gly
 20 25

20

<210> 70

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 70

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

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

30

<210> 71

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 71

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

35

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
 20 25

<210> 72

<211> 25

<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

5 <400> 72
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Asp Val Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 73
<211> 25
<212> PRT

10 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 73
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15

Ala Val Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

15 <210> 74
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

20 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 74
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Pro Glu Asn
1 5 10 15

Ala Pro Leu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

25 <210> 75
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 75
Pro Glu Asp Ala Glu Leu Val Arg Leu Ser Lys Arg Leu Val Glu Asn
1 5 10 15

30 Ala Val Glu Lys Ala Val Gln Gln Tyr
20 25

<210> 76
<211> 25
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

35 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 76

ES 2 672 974 T3

Glu Glu Gly Leu Asp Arg Asn Glu Glu Ile Lys Arg Ala Ala Phe Gln
 1 5 10 15

Ile Ile Ser Gln Val Ile Ser Glu Ala
 20 25

<210> 77

<211> 25

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 77

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

Ala Ile Gln Gln Ala Ile Ala Glu Gln
 20 25

10 <210> 78

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 78

Gln Tyr Glu Thr Leu Leu Ile Glu Thr Ala Ser Ser Leu Val Lys Asn
 1 5 10 15

Ala Ile Gln Leu Ser Ile Glu Gln Leu
 20 25

<210> 79

<211> 25

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 79

Leu Glu Lys Gln Tyr Gln Glu Gln Leu Glu Glu Glu Val Ala Lys Val
 1 5 10 15

25 Ile Val Ser Met Ser Ile Ala Phe Ala
 20 25

<210> 80

<211> 25

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

30 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 80

Asn Thr Asp Glu Ala Gln Glu Glu Leu Ala Trp Lys Ile Ala Lys Met
 1 5 10 15

Ile Val Ser Asp Ile Met Gln Gln Ala
 20 25

<210> 81

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

<220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 81
 Val Asn Leu Asp Lys Lys Ala Val Leu Ala Glu Lys Ile Val Ala Glu
 1 5 10 15

Ala Ile Glu Lys Ala Glu Arg Glu Leu
 20 25

<210> 82
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 82
 Asn Gly Ile Leu Glu Leu Glu Thr Lys Ser Ser Lys Leu Val Gln Asn
 1 5 10 15

15 Ile Ile Gln Thr Ala Val Asp Gln Phe
 20 25

<210> 83
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 83
 Thr Gln Asp Lys Asn Tyr Glu Asp Glu Leu Thr Gln Val Ala Leu Ala
 1 5 10 15

25 Leu Val Glu Asp Val Ile Asn Tyr Ala
 20 25

<210> 84
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 84
 Glu Thr Ser Ala Lys Asp Asn Ile Asn Ile Glu Glu Ala Ala Arg Phe
 1 5 10 15

Leu Val Glu Lys Ile Leu Val Asn His
 20 25

<210> 85
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 85

ES 2 672 974 T3

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Lys Ala Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

ES 2 672 974 T3

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu
225 230 235 240

Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 86

<211> 330

<212> PRT

5 <213> Homo sapiens

<400> 86

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

ES 2 672 974 T3

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 87

<211> 44

<212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<220>

<221> MOD_RES

10 <222> (1)..(1)

<223> Ser o Thr

<220>

<221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> His, Lys o Arg

 <220>
 5 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Gln o Asn

 <220>
 10 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Gly o Ala

 <220>
 15 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)
 <223> Thr o Ser

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Glu o Asp
 20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (14)..(14)
 <223> Gln o Asn

 <220>
 25 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(15)
 <223> Gly o Ala

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Thr o Ser
 30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (19)..(19)
 <223> Glu o Asp
 35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (22)..(22)
 <223> Arg o Lys
 40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(24)
 <223> Gln o Asn

 <220>
 45 <221> MOD_RES
 <222> (27)..(27)
 <223> Asp o Glu

 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (30)..(30)
 <223> Glu o Asp
 50 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (32)..(32)
 <223> Ala, Leu, Ile o val
 55

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Glu o Asp

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (37)..(37)
 <223> Thr o ser

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38)..(38)
 <223> Arg o Lys

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40)..(40)
 <223> Arg o Lys

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (41)..(41)
 <223> Glu o Asp

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42)..(42)
 <223> Ala, Leu, Ile o val

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (43)..(43)
 <223> Arg o Lys

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Ala, Leu, Ile o val

<400> 87
 Xaa Xaa Ile Xaa Ile Pro Pro Xaa Leu Xaa Xaa Leu Leu Xaa Xaa Tyr
 1 5 10 15

Xaa Val Xaa Val Leu Xaa Xaa Xaa Pro Pro Xaa Leu Val Xaa Phe Xaa
 20 25 30

Val Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
 35 40

35

<210> 88
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

40

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Gln o Asn

45

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (2)..(2)
 <223> Ile, Leu o val

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (3)..(3)
 <223> Glu o Asp

5

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)
 <223> Tyr, Phe, Thr o ser

10

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (5)..(5)
 <223> Leu, Ile o val

15

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (7)..(7)
 <223> Lys o Arg

20

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (8)..(8)
 <223> Gln o Asn

25

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (11)..(11)
 <223> Asp o Glu

30

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (12)..(12)
 <223> Asn o Gln

35

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (15)..(16)
 <223> Gln o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (17)..(17)
 <223> Ala, Leu, Ile o val

<400> 88
 Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Ala Xaa Xaa Ile Val Xaa Xaa Ala Ile Xaa Xaa
 1 5 10 15

40

Xaa
 <210> 89
 <211> 44
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

45

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

50

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (1)..(1)
 <223> Ser o Thr

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (4)..(4)

<223> Gln o Asn

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (10)..(10)

5 <223> Thr o Ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (18)..(18)
 <223> Val, Ile, Leu o Ala

10 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (23)..(23)
 <223> Gln o Asn

15 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (33)..(33)
 <223> Val, Ile, Leu o Ala

20 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (34)..(34)
 <223> Glu o Asp

25 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (37)..(37)
 <223> Thr o ser

<220>
 <221> MOD_RES
 <222> (38)..(38)
 <223> Arg o Lys

30 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (40)..(40)
 <223> Arg o Lys

35 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (42)..(42)
 <223> Ala, Leu, Ile o val

40 <220>
 <221> MOD_RES
 <222> (44)..(44)
 <223> Ala, Leu, Ile o val

<400> 89
 Xaa His Ile Xaa Ile Pro Pro Gly Leu Xaa Glu Leu Leu Gln Gly Tyr
 1 5 10 15

Thr Xaa Glu Val Leu Arg Xaa Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala
 20 25 30

Xaa Xaa Tyr Phe Xaa Xaa Leu Xaa Glu Xaa Arg Xaa
 35 40

45 <210> 90
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 90
aatgctgaggcgg tggtagacagt a 21

5 <210> 91
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

10 <400> 91
aagctcagca cacagaaaga c 21

<210> 92
<211> 21
<212> ADN

15 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético

20 <400> 92
uaaaauucuuc cugcccacct t 21

<210> 93
<211> 21
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

30 <400> 93
ggaagcuguu ggcugaaaat t 21

<210> 94
<211> 21
<212> RNA

35 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 94
aagaccagcc ucuuugccca g 21

40 <210> 95
<211> 19
<212> RNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

45 <400> 95
ggaccaggca gaaaacgag 19

<210> 96
<211> 17
<212> RNA

50

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 96

5 cuaucaggau gacgcgg 17

<210> 97

<211> 21

<212> RNA

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 97

ugacacaggc aggcugacu u 21

<210> 98

<211> 19

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

15 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<400> 98

20 ggtgaagaag ggcgtcca 19

<210> 99

<211> 60

<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 99

gatccgtgg agctgtggc gtagtcaag agactcgcca acagctcca ctttggaaa 60

30 <210> 100

<211> 20

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

35 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 100

agtggtgtt aacagcagag 20

<210> 101

<211> 21

40 <212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 101

45 aagtgtagc aagcgtgga g 21

<210> 102

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

50 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<400> 102
aaggagtga aggccgacaa a 21

5 <210> 103
<211> 21
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

10 <220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

<400> 103
uauggagcug cagaggau t 21

15 <210> 104
<211> 49
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

20 <400> 104
tttgaatc tgtgctgaga acacagtct cagcacagat attctttt 49

<210> 105
<211> 29
<212> ADN

25 <213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 105
aatgagaaaa gcaaaaggtg cctgtctc 29

30 <210> 106
<211> 21
<212> RNA
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<400> 106
aaucauc aagaaagggc a 21

<210> 107
<211> 21

40 <212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<220>
<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

<400> 107
augacuguca ggauguugct t 21

<210> 108
<211> 21

50 <212> RNA

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 108

5 gaacgaaucc ugaagacauc u 21

<210> 109

<211> 29

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

10 <220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 109

aagcctggct acagcaatat gcctgtctc 29

<210> 110

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

20 <220>

<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

<400> 110

ugaccaucac cgaguuuaut t 21

<210> 111

<211> 21

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

30 <400> 111

aagtcggacg caacagagaa a 21

<210> 112

<211> 21

<212> ADN

35 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<220>

<223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

40 <400> 112

cuaccuuucu acggacgugt t 21

<210> 113

<211> 21

<212> ADN

45 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 113

ctgcctaagg cggattgaa t 21

50 <210> 114

- <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 5 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- <400> 114
 ttauuccuuc uucggaagu c 21
- 10 <210> 115
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 15 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 115
 aacctctgg aaccgcca c 21
- <210> 116
 <211> 19
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <400> 116
 25 gagcatctc gagcaaga 19
- <210> 117
 <211> 19
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- 30 <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético
- <400> 117
 catgtggcac cgttgcct 19
- <210> 118
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- 40 <400> 118
 aactaccaga aaggtatacc t 21
- <210> 119
 <211> 21
 <212> ADN
 45 <213> Secuencia Artificial
- <220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético
- <220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: Oligonucleótido sintético
- 50 <400> 119

ES 2 672 974 T3

ucacaguguc cuuuauquat t 21

<210> 120
 <211> 21
 <212> ADN
 5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: oligonucleótido sintético

<220>
 <223> Descripción de Molécula de ADN/ARN combinada: oligonucleótido sintético

10 <400> 120
 gcaugaaccg gaggcccaut t 21

<210> 121
 <211> 19
 <212> ADN
 15 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Oligonucleótido sintético

<400> 121
 ccggacagtt ccatgtata 19

20 <210> 122
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 25 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 122
 Glu Phe Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly Gly Ala Pro
 1 5 10 15

<210> 123
 <211> 4
 30 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 123
 Pro Lys Ser Cys
 1

<210> 124
 35 <211> 55
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

40 <400> 124
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser His Ile Gln Ile
 1 5 10 15

Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu
 20 25 30

Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr
 35 40 45

Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
 50 55

ES 2 672 974 T3

<210> 125
<211> 29
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

<400> 125
Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Ile Glu Tyr
1 5 10 15

Leu Ala Lys Gln Ile Val Asp Asn Ala Ile Gln Gln Ala
20 25

10 <210> 126
<211> 22
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Péptido sintético

15 <400> 126
Arg Ser Gln Ser Arg Ser Arg Tyr Tyr Arg Gln Arg Gln Arg Ser Arg
1 5 10 15

Arg Arg Arg Arg Arg Ser
20

20 <210> 127
<211> 165
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 127

ES 2 672 974 T3

Pro Gln Asp Trp Leu Thr Phe Gln Lys Lys His Ile Thr Asn Thr Arg
 1 5 10 15

Asp Val Asp Cys Asp Asn Ile Met Ser Thr Asn Leu Phe His Cys Lys
 20 25 30

Asp Lys Asn Thr Phe Ile Tyr Ser Arg Pro Glu Pro Val Lys Ala Ile
 35 40 45

Cys Lys Gly Ile Ile Ala Ser Lys Asn Val Leu Thr Thr Ser Glu Phe
 50 55 60

Tyr Leu Ser Asp Cys Asn Val Thr Ser Arg Pro Cys Lys Tyr Lys Leu
 65 70 75 80

Lys Lys Ser Thr Asn Lys Phe Cys Val Thr Cys Glu Asn Gln Ala Pro
 85 90 95

Val His Phe Val Gly Val Gly Ser Cys Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu
 100 105 110

Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln Gly
 115 120 125

Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu Phe
 130 135 140

Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala Val Glu His
 145 150 155 160

His His His His His
 165

<210> 128
 <211> 103
 <212> PRT

5 <213> Secuencia Artificial

<220>
 <223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 128
 Met Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu Gln
 1 5 10 15

Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val Glu
 20 25 30

Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala Glu Phe
 35 40 45

Pro Lys Pro Ser Thr Pro Pro Gly Ser Ser Gly His His His His His
 50 55 60

His Gly Ser Tyr Thr Ser Leu Ile His Ser Leu Ile Glu Glu Ser Gln
 65 70 75 80

Asn Gln Gln Glu Lys Asn Glu Gln Glu Leu Leu Glu Leu Asp Lys Trp
 85 90 95

Ala Ser Leu Trp Asn Trp Phe
 100

ES 2 672 974 T3

<210> 129
<211> 63
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial

5 <220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polipéptido sintético

<400> 129
Lys Ser His His His His His Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Cys Gly His Ile Gln Ile Pro Pro Gly Leu Thr Glu Leu Leu
20 25 30

Gln Gly Tyr Thr Val Glu Val Leu Arg Gln Gln Pro Pro Asp Leu Val
35 40 45

Glu Phe Ala Val Glu Tyr Phe Thr Arg Leu Arg Glu Ala Arg Ala
50 55 60

10 <210> 130
<211> 2208
<212> ADN
<213> Secuencia Artificial

<220>
<223> Descripción de Secuencia Artificial: Polinucleótido sintético

15 <400> 130

ES 2 672 974 T3

ggatcccgca attctaaact ctgaggggggt cggatgacgt ggccattctt tgcctaaagc 60
 attgagttta ctgcaaggtc agaaaagcat gcaaagccct cagaatggct gcaaagagct 120
 ccaacaaaac aatttagaac tttattaagg aataggggga agctaggaag aaactcaaaa 180
 catcaagatt ttaaatacgc ttcttggctc ccttgctata attatctggg ataagcatgc 240
 tgttttctgt ctgtccctaa catgccctgt gattatccgc aaacaacaca cccaagggca 300
 gaactttgtt acttaaacac catcctgttt gcttctttcc tcaggaactg tggctgcacc 360
 atctgtcttc atcttcccgc catctgatga gcagttgaaa tctggaactg cctctgtttg 420
 gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta cagtggaagg tggataacgc 480
 cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag gacagcaagg acagcaccta 540
 cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac gagaaacaca aagtctacgc 600
 ctgcaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca aagagcttca acaggggaga 660
 gtgtgagttc cctaaacca gcactccacc cggatcttcc ggcggcgctc cctgtggcca 720
 gatcgagtac ctggccaagc agatcgtgga caacgccatc cagcaggccg ggtgctagag 780
 ggagaagtgc ccccactgc tcctcagttc cagcctgacc ccctcccatc ctttggcctc 840
 tgaccctttt tccacagggg acctaccctt attgcggtcc tccagctcat ctttcacctc 900
 acccccctcc tcctccttgg ctttaattat gctaagtgtg gaggagaatg aataaataaa 960
 gtgaatcttt gcacctgtgg tttctctctt tcctcattta ataattatta tctgttgttt 1020
 taccaactac tcaatttctc ttataaggga ctaaataatgt agtcaccta aggcgcataa 1080
 ccatttataa aaatcatcct tcatttctatt ttaccctatc atcctctgca agacagtcct 1140
 ccctcaaacc cacaagcctt ctgtcctcac agtcccctgg gccatggtag gagagacttg 1200
 cttccttgtt tccccctcct cagcaagccc tcatagtcct ttttaagggt gacaggtcct 1260
 acagtcatat atcctttgat tcaattccct gagaatcaac caaagcaaat ttttcaaag 1320
 aagaaacctg ctataaagag aatcattcat tgcaacatga tataaataa caacacaata 1380
 aaagcaatta aataaaciaa caatagggaa atgtttaagt tcatcatggt acttagactt 1440
 aatggaatgt catgccttat ttacattttt aacaggtac tgagggactc ctgtctgcca 1500
 agggcgtat tgagtacttt ccacaaccta atttaattca cactatactg tgagattaaa 1560
 aacattcatt aaaatgttgc aaaggttcta taaagctgag agacaaatat attctataac 1620
 tcagcaattc ccacttctag gggttcgact ggcaaggaagc aggtcatgtg gcaaggctat 1680
 ttggggaagg gaaaataaaa ccactaggtg aacttgtagc tgtggtttga agaagtgggt 1740
 ttgaaacact ctgtccagcc ccaccaaac gaaagtccag gctgagcaaa acaccacctg 1800
 ggtaatttgc atttctaaaa taagttgagg attcagccga aactggagag gtcctctttt 1860
 aacttattga gttcaacctt ttaattttag cttgagtagt tctagtttcc ccaaacttaa 1920
 gtttatcgac ttctaaaatg tatttagaat ttcgaccaat tctcatgttt gacagcttat 1980
 catcgctgca ctccgcccga aaagtgcgct cggctctgcc aaggacgcgg ggcgcgtgac 2040
 tatgcgtggg ctggagcaac cgcctgctgg gtgcaaacc tttgcgccc gactcgtcca 2100
 acgactataa agagggcagg ctgtcctcta agcgtcacca cgacttcaac gtcctgagta 2160
 ccttctctc acttactccg tagctccagc ttcaccagat ccctcgag 2208

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende:

a) un anticuerpo; y

b) un motivo de AD (dominio de anclaje) de una proteína AKAP unido al extremo C-terminal de cada cadena ligera del anticuerpo.

2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se une a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en AFP, integrina $\alpha 4$, B7, anhidrasa carbónica IX, factores del complemento C1q, C1r, C1s, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5a, C5aR, C5b, C5, C6, C7, C8, C9n, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD3R, CD4, CD5, CD8, CD11A, CD14, CD15, CD 16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD86, CD95, CD126, CD133, CD138, CD 147, CD154, CEACAM-5, CEACAM-6, CSAp, ED-B de fibronectina, EGFR, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ErbB2, Factor H, FHL-1, fibrina, Flt-3, receptor de folato, glucoproteína IIb/IIIa, gp41, gp120, GRO-p, HLA-DR, HM1.24, HM1.24, HMGB-1, factor de hipoxia (HIF), Ia, ICAM-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , IgE, IGF-1R, IL-1, IL-1Ra, IL-2, IL-4R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-13R, IL-15R, IL-15, IL-17, IL-17R, IL-18, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, factor de crecimiento similar a insulina-1 (ILGF-1), IP-10, Le(y), lipopolisacárido (LPS), MAGE, MCP-1, mCRP, MIF, MIP-1A, MIP-1B, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, NCA-90, NCA-95, NF- κ B, P1GF, PSMA, RANTES, T101, TAC, TAG-72, tenascina, antígenos de Thomson-Friedenreich, trombina, factor tisular, antígeno Tn, TNF- α , receptor TRAIL (R1 y R2), antígenos de necrosis tumoral, VEGF, VEGFR y un producto oncogénico.

3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en hR1 (anti-IGF-1R), hPAM4 (anti-mucina), KC4 (anti-mucina), hA20 (anti-CD20), hA19 (anti-CD19), hIMMU31 (anti-AFP), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), hMu-9 (anti-CSAp), hL243 (anti-HLA-DR), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN- 15 (anti-CEACAM6), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-3 (anti-CEACAM6), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX), infliximab (anti-TNF- α), certolizumab pegol (anti-TNF- α), adalimumab (anti-TNF- α), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetán (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), GA101 (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina $\alpha 4$) y omalizumab (anti-IgE).

4. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde una copia del motivo de AD se une a un dímero formado por dos copias de un motivo de dominio de dimerización y acoplamiento (DDD), en donde la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en los restos 1-44 de RII α , 1-44 de RII β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β .

5. La proteína de fusión de la reivindicación 4, en donde la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO: 20, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 22, SEQ ID NO: 23, SEQ ID NO: 24, SEQ ID NO: 25, SEQ ID NO: 26, SEQ ID NO: 27, SEQ ID NO: 28, SEQ ID NO: 29, SEQ ID NO: 30, SEQ ID NO: 31, SEQ ID NO: 87 y SEQ ID NO: 89.

6. Un complejo multimérico que comprende:

a) una primera proteína de fusión que comprende (i) un primer anticuerpo, y (ii) un motivo de AD (dominio de anclaje) de una proteína AKAP unido al extremo C terminal de cada cadena ligera del anticuerpo; y

b) una segunda proteína de fusión que comprende (iii) un motivo efector seleccionado del grupo que consiste en un segundo anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo, una citoquina, un interferón, una toxina, un antígeno, un xenoantígeno, un hapteno, una protamina, una hormona, una enzima, una proteína de unión a ligando, un agente proapoptótico y un agente antiangiogénico, y (iv) un motivo de DDD (dominio de dimerización y acoplamiento) de la subunidad reguladora de la proteína quinasa A (PKA) RI α , RI β , RII α o RII β ;

en donde dos copias del motivo de DDD forman un dímero que se une a una copia del motivo de AD para formar el complejo.

7. El complejo de la reivindicación 6, en donde el primer y segundo anticuerpos se unen a un antígeno seleccionado del grupo que consiste en AFP, integrina $\alpha 4$, B7, anhidrasa carbónica IX, factores de complemento C1q, C1r, C1s, C2a, C2b, C3, C3a, C3b, C4, C4a, C4b, C5a, C5aR, C5b, C5, C6, C7, C8, C9n, CCCL19, CCCL21, CD1, CD1a, CD2, CD3, CD3R, CD4, CD5, CD8, CD11 A, CD14, CD15, CD16, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD25, CD29, CD30, CD32b, CD33, CD37, CD38, CD40, CD40L, CD44, CD45, CD46, CD52, CD54, CD55, CD59, CD64, CD66a-e, CD67, CD70, CD74, CD79a, CD80, CD83, CD86, CD95, CD126, CD133, CD138, CD147, CD154, CEACAM-5, CEACAM-6, CSAp, ED-B de fibronectina, EGFR, EGP-1 (TROP-2), EGP-2, ErbB2, Factor H, FHL-1,

- 5 fibrina, Flt-3, receptor de folato, glucoproteína IIb/IIIa, gp41, gp120, GRO- β , HLA-DR, HM1.24, HM1.24, HMGB-1, factor inducible por hipoxia (HIF), Ia, ICAM-1, IFN- α , IFN- β , IFN- γ , IFN- λ , IgE, IGF-1R, IL-1, IL-1Ra, IL-2, IL-4R, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-13R, IL-15R, IL-15, IL-17, IL-17R, IL-18, IL-18R, IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-25, factor de crecimiento similar a insulina-1 (IGF-I), IP-10, Le(y), lipopolisacárido (LPS), MAGE, MCP-1, mCRP, MIF, MIP-1A, MIP-1B, MUC1, MUC2, MUC3, MUC4, MUC5ac, NCA-90, NCA-95, NF- κ B, P1GF, PSMA, RANTES, T101, TAC, TAG-72, tenascina, antígenos de Thomson-Friedenreich, trombina, factor tisular, antígeno Tn, TNF- α , receptor de TRAIL (R1 y R2), antígenos de necrosis tumoral, VEGF, VEGFR y un producto oncogénico.
8. El complejo de la reivindicación 6, en donde el primer y segundo anticuerpos se seleccionan del grupo que consiste en hR1 (anti-IGF-1R), hPAM4 (anti-mucina), KC4 (anti-mucina), hA20 (anti-CD20), hA19 (anti-CD19), hIMMU31 (anti-AFP), hLL1 (anti-CD74), hLL2 (anti-CD22), RFB4 (anti-CD22), hMu-9 (anti-CSAp), hL243 (anti-HLA-DR), hMN-14 (anti-CEACAM5), hMN-15 (anti-CEACAM6), hRS7 (anti-TROP-2), hMN-3 (anti-CEACAM6), CC49 (anti-TAG-72), J591 (anti-PSMA), D2/B (anti-PSMA), G250 (anti-anhidrasa carbónica IX), infliximab (anti-TNF- α), certolizumab pegol (anti-TNF- α), adalimumab (anti-TNF- α), alemtuzumab (anti-CD52), bevacizumab (anti-VEGF), cetuximab (anti-EGFR), gemtuzumab (anti-CD33), ibritumomab tiuxetán (anti-CD20), panitumumab (anti-EGFR), rituximab (anti-CD20), tositumomab (anti-CD20), GA101 (anti-CD20), trastuzumab (anti-ErbB2), tocilizumab (anti-receptor de IL-6), basiliximab (anti-CD25), daclizumab (anti-CD25), efalizumab (anti-CD11a), muromonab-CD3 (anti-receptor de CD3), natalizumab (anti-integrina α 4) y omalizumab (anti-IgE).
9. El complejo de la reivindicación 6, en donde el fragmento de anticuerpo de unión al antígeno se selecciona del grupo que consiste en un F(ab')₂, un F(ab)₂, un Fab', un Fab, un Fv, un sFv, un scFv y un dAb.
10. El complejo de la reivindicación 6, en donde la secuencia de aminoácidos del motivo de DDD se selecciona del grupo que consiste en los restos 1-44 de RI α , 1-44 de RI β , 12-61 de RI α y 13-66 de RI β .
11. El complejo de la reivindicación 6, en donde la secuencia de aminoácidos del motivo de AD se selecciona del grupo que consiste en el SEQ ID NO: 3, SEQ ID NO: 4, SEQ ID NO: 7, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34, SEQ ID NO: 35, SEQ ID NO: 36, SEQ ID NO: 37, SEQ ID NO: 38, SEQ ID NO: 39, SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 41, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 44, SEQ ID NO: 45, SEQ ID NO: 46, SEQ ID NO: 47, SEQ ID NO: 48, SEQ ID NO: 49, SEQ ID NO: 50, SEQ ID NO: 51, SEQ ID NO: 52, SEQ ID NO: 53, SEQ ID NO: 54, SEQ ID NO: 55, SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 57, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59, SEQ ID NO: 60, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63, SEQ ID NO: 64, SEQ ID NO: 65, SEQ ID NO: 66, SEQ ID NO: 67, SEQ ID NO: 68, SEQ ID NO: 69, SEQ ID NO: 70, SEQ ID NO: 71, SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO: 73, SEQ ID NO: 74, SEQ ID NO: 75, SEQ ID NO: 76, SEQ ID NO: 77, SEQ ID NO: 78, SEQ ID NO: 79, SEQ ID NO: 80, SEQ ID NO: 81, SEQ ID NO: 82, SEQ ID NO: 83, SEQ ID NO: 44 y SEQ ID NO: 88.
12. El complejo de la reivindicación 6, en donde la toxina se selecciona del grupo que consiste en una toxina bacteriana, una toxina vegetal, ricina, abrina, toxina alfa, saporina, ribonucleasa (RNasa), DNasa I, enterotoxina estafilocócica A, proteína antivírica de la hierba carmín, gelonina, toxina diftérica, exotoxina de pseudomonas, endotoxina de pseudomonas, ranpirnasa (Rap) y Rap (N69Q).
13. El complejo de la reivindicación 6, en donde la citoquina se selecciona del grupo que consiste en hormona de crecimiento humana, N-metionil-hormona de crecimiento humana, hormona de crecimiento bovina, hormona paratiroidea, tiroxina, insulina, proinsulina, relaxina, prorelaxina, hormona folículo-estimulante (FSH), hormona estimulante de la tiroides (TSH), hormona luteinizante (LH), factor de crecimiento hepático, prostaglandina, factor de crecimiento de fibroblastos, prolactina, lactógeno placentario, proteína OB, factor de necrosis tumoral- α , factor de necrosis tumoral- β , sustancia inhibidora de mullerian, péptido asociado a la gonadotropina de ratón, inhibina, activina, factor de crecimiento vascular endotelial, integrina, trombopoyetina (TPO), un factor de crecimiento nervioso (NGF), NGF- β , factor de crecimiento de plaquetas, un factor de crecimiento transformante (TGF), TGF- α , TGF- β , factor de crecimiento similar a insulina-I, factor de crecimiento similar a insulina-II, eritropoyetina (EPO), un factor osteoinductor, un interferón, interferón- α , interferón- β , interferón- γ , interferón- λ , factores estimuladores de colonias (CSF), CSF de macrófagos (M-CSF), CSF de granulocitos y macrófagos (GM-CSF), CSF de granulocitos (G-CSF), interleuquina-1 (IL-1), IL-1 α , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-14, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, ligando kit, FLT-3, angiostatina, trombospondina, endostatina, factor de necrosis tumoral y LT (linfotóxina).
14. El complejo de cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13, para usar en el tratamiento de una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en cáncer, una enfermedad autoinmunitaria, una disfunción del sistema inmunitario, una enfermedad infecciosa, una enfermedad metabólica, una enfermedad cardiovascular y una enfermedad neurológica.
15. El complejo para usar de la reivindicación 14, en donde el cáncer se selecciona del grupo que consiste en linfoma no Hodgkin, linfoma de linfocitos B, leucemia de linfocitos B, linfoma de linfocitos T, leucemia de linfocitos T, leucemia linfoide aguda, leucemia linfoide crónica, linfoma de Burkitt, linfoma de Hodgkin, leucemia de células pilosas, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica, mieloma múltiple, glioma, macroglobulinemia de Waldenstrom, carcinoma, melanoma, sarcoma, glioma, cáncer de piel, cáncer de cavidad oral, cáncer del tracto gastrointestinal, cáncer de colon, cáncer de estómago, cáncer del tracto pulmonar, cáncer de pulmón, cáncer de

mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, cáncer uterino, cáncer de endometrio, cáncer de cuello uterino, cáncer de vejiga urinaria, cáncer de páncreas, cáncer de huesos, cáncer de hígado, cáncer de vesícula biliar, cáncer de riñón y cáncer de testículo.

- 5 16. El complejo para usar de la reivindicación 14, en donde la enfermedad autoinmunitaria se selecciona del grupo que consiste en púrpura trombocitopénica idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática crónica, dermatomiositis, corea de Sydenham, miastenia gravis, lupus eritematoso sistémico, nefritis lúpica, fiebre reumática, síndromes poliglandulares, penfigoide bulloso, diabetes mellitus, púrpura de Henoch-Schonlein, nefritis posestreptocócica, eritema nudoso, arteritis de Takayasu, enfermedad de Addison, artritis reumatoide, esclerosis múltiple, sarcoidosis, colitis ulcerosa, eritema multiforme, nefropatía por IgA, poliarteritis nodosa, espondilitis anquilosante, síndrome de Goodpasture, tromboangeítis obliterante, síndrome de Sjögren, cirrosis biliar primaria, tiroiditis de Hashimoto, tirotoxicosis, esclerodermia, hepatitis crónica activa, polimiositis/dermatomiositis, policondritis, pénfigo vulgar, granulomatosis de Wegener, nefropatía membranosa, esclerosis lateral amiotrófica, tabes dorsal, arteritis de células gigantes/polimialgia, anemia perniciosa, glomerulonefritis rápidamente progresiva, psoriasis y alveolitis fibrosante.
- 10
- 15 17. Una composición que comprende una proteína de fusión según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5 o un complejo multimérico de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 6 a 13.

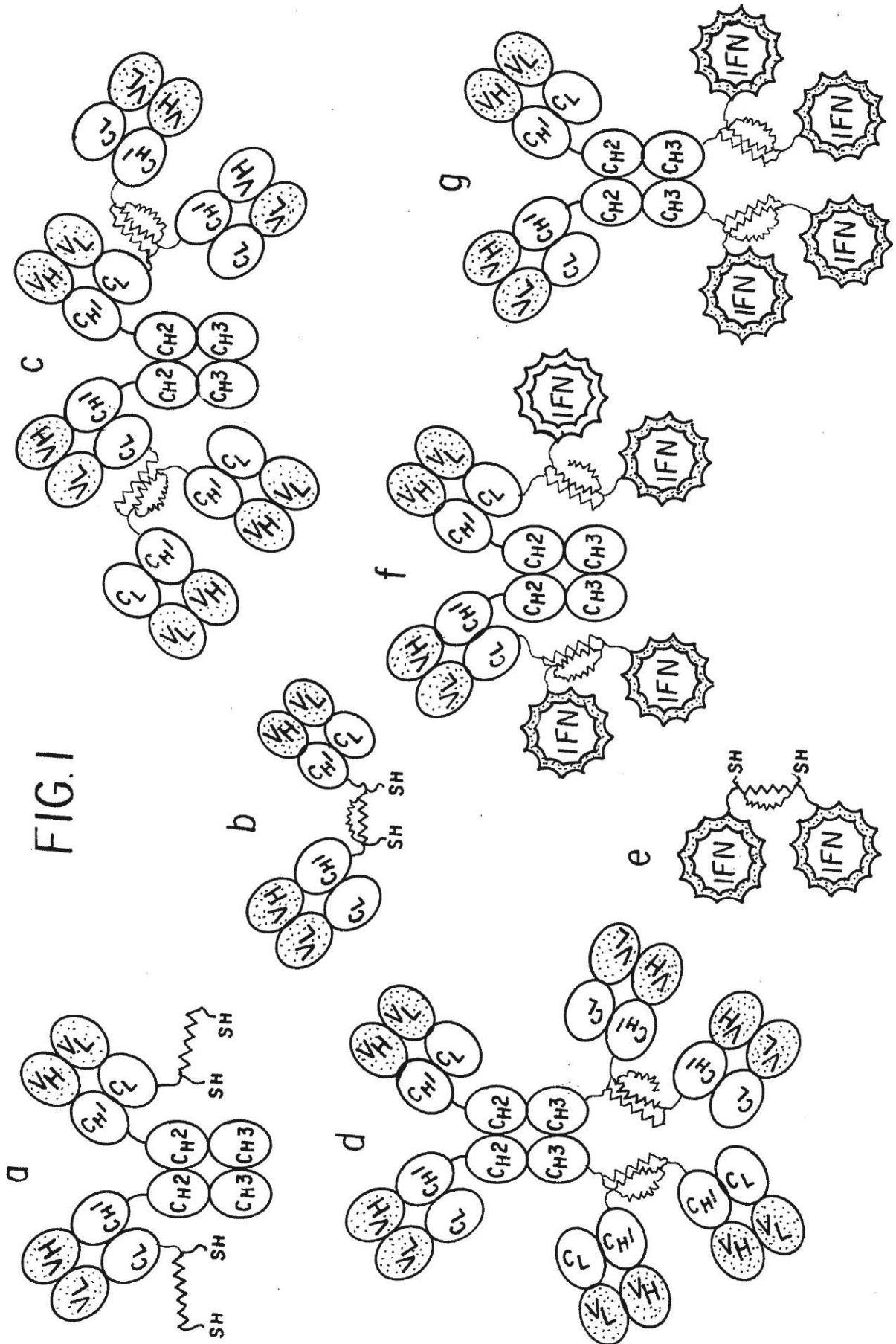


FIG. 2

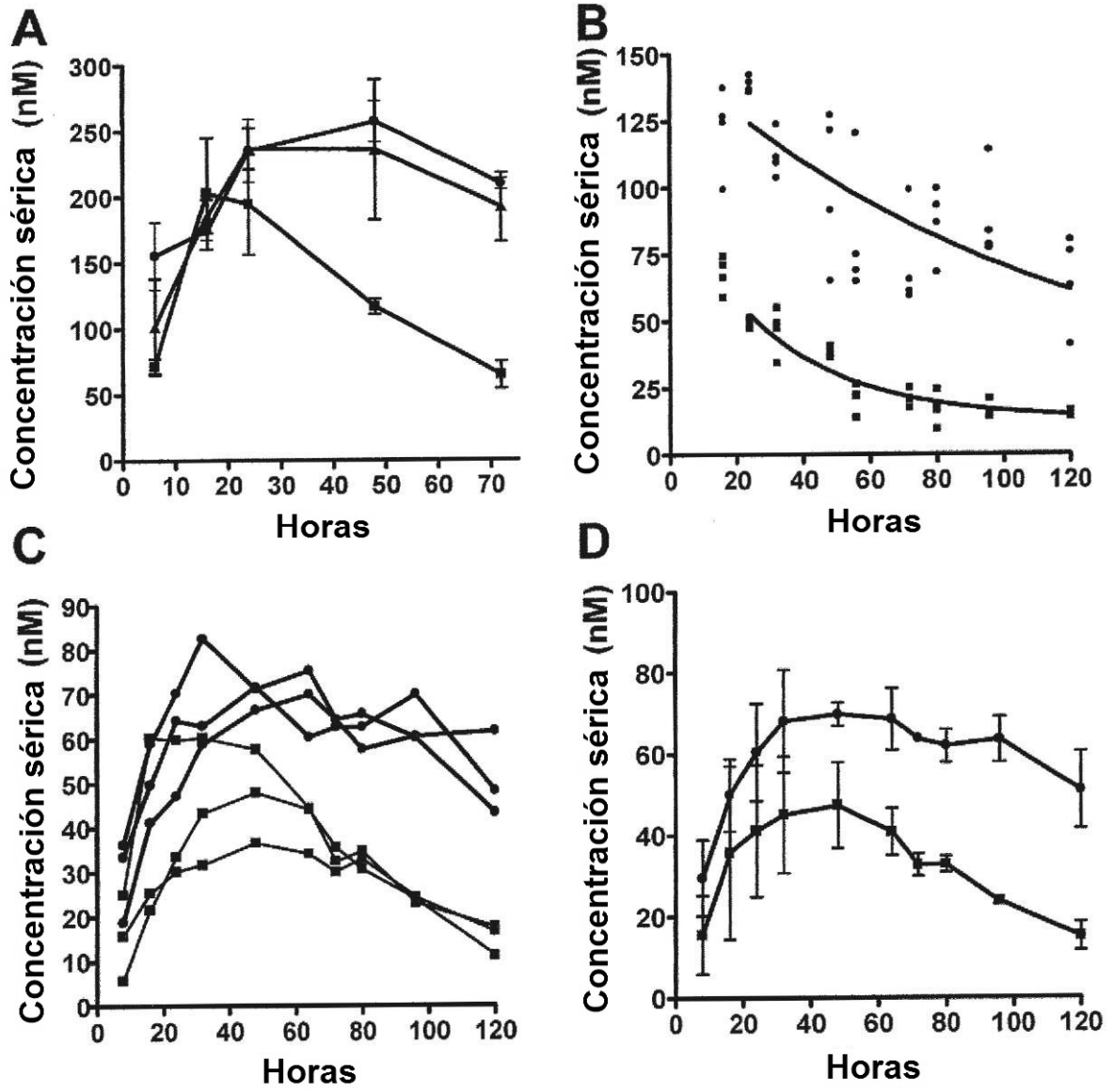


FIG. 3

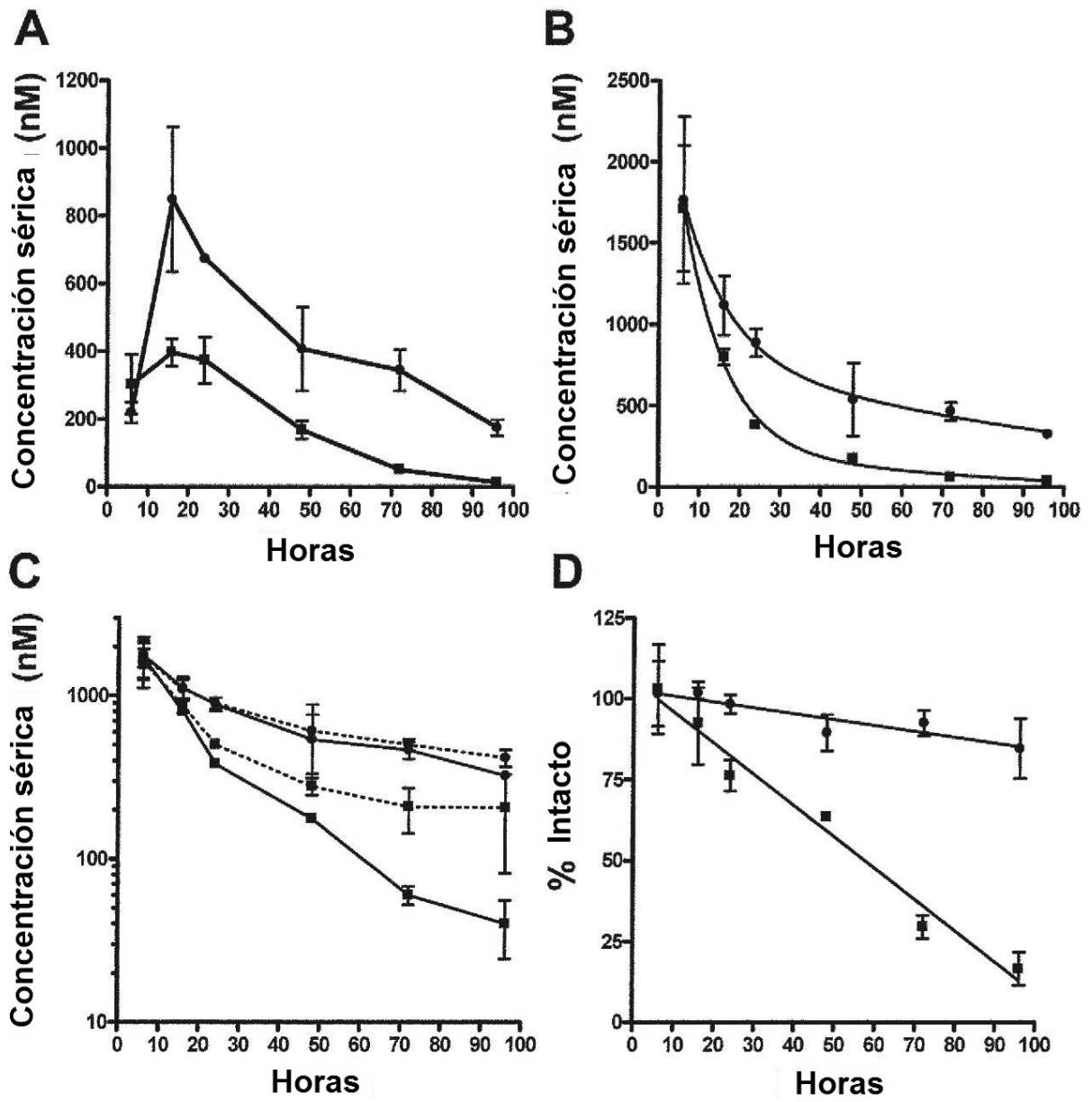


FIG. 4

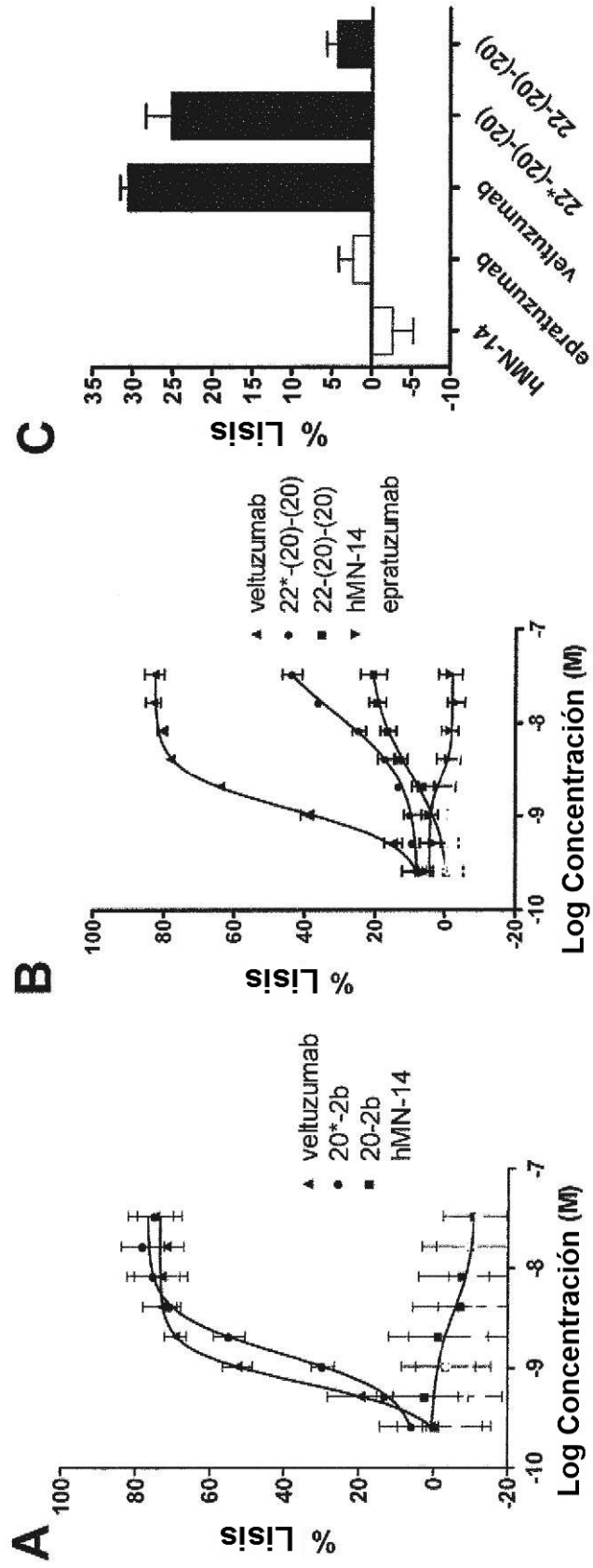


FIG. 5

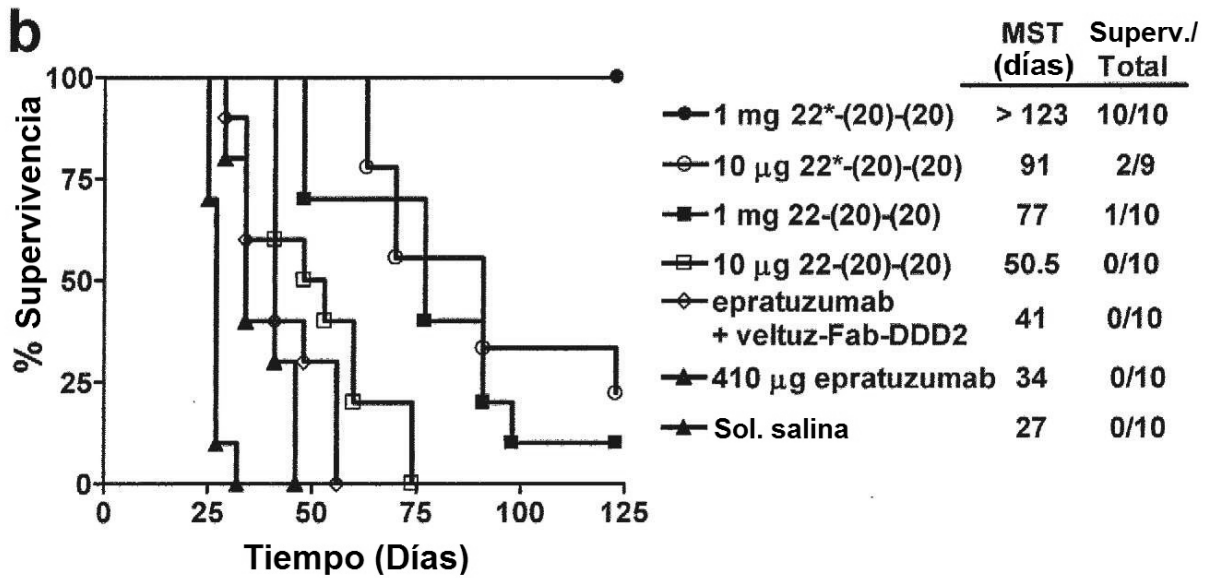
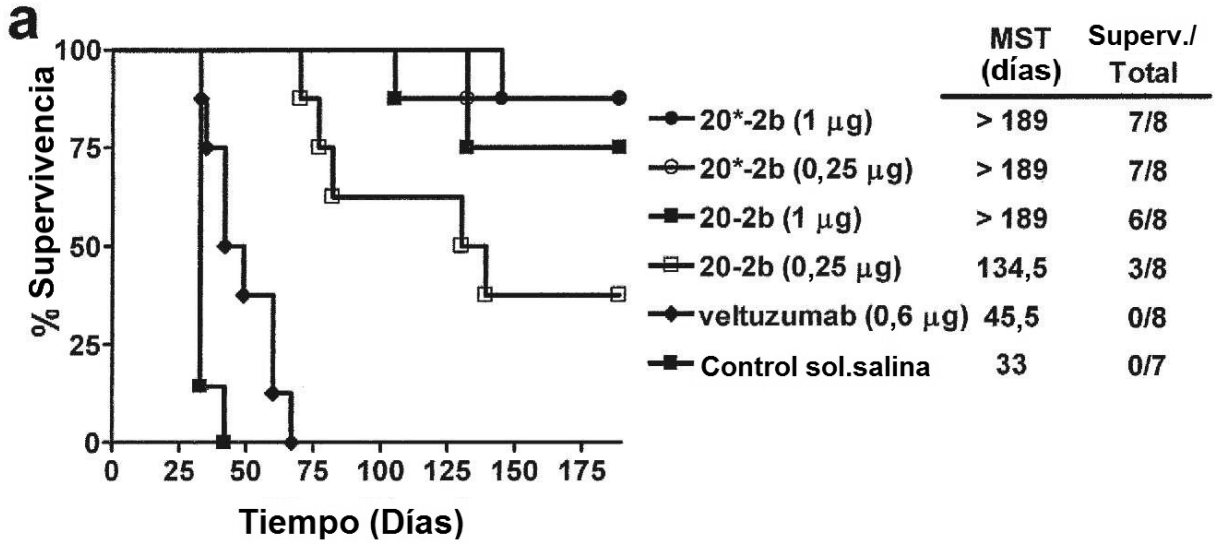


FIG. 6

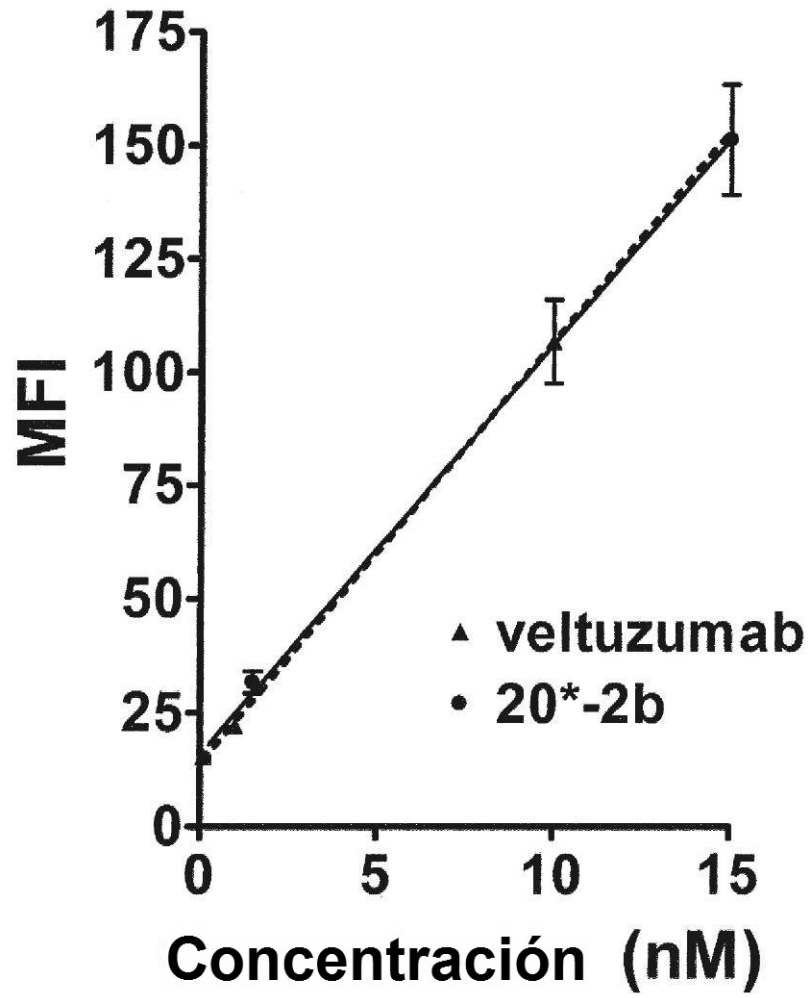


FIG. 7

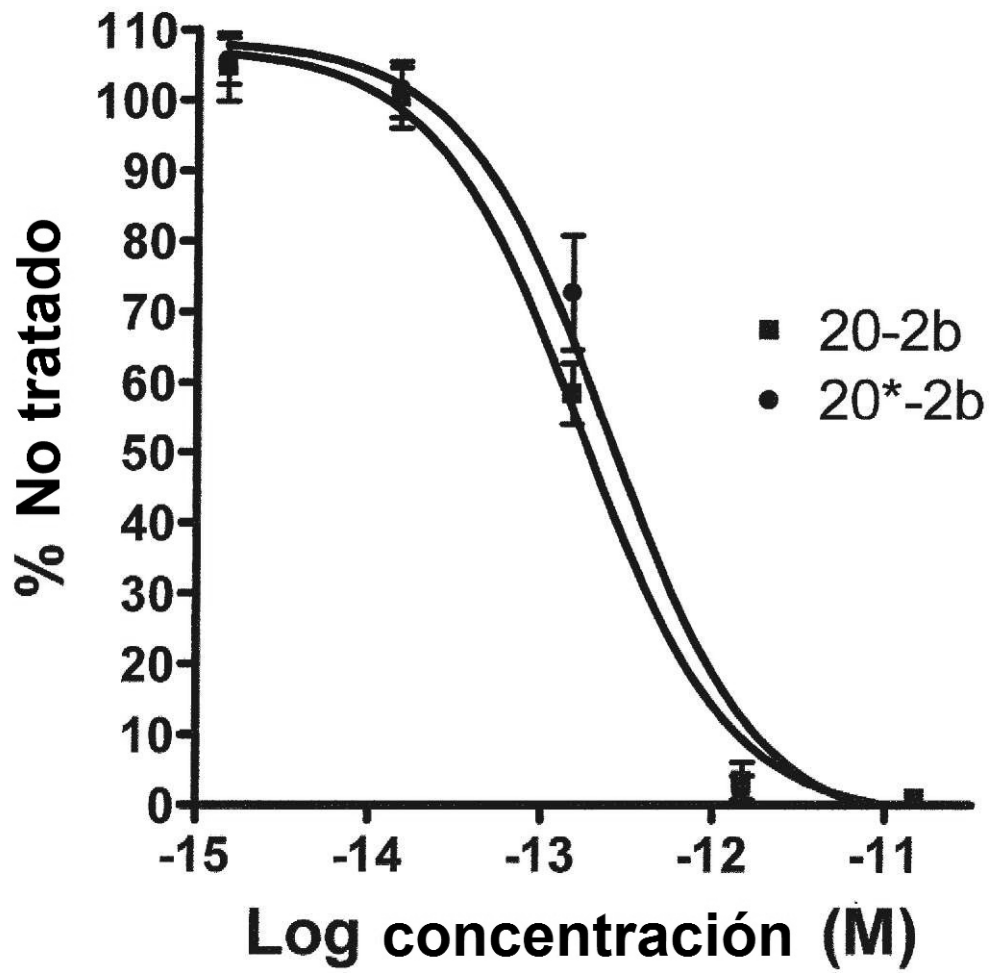


FIG. 8

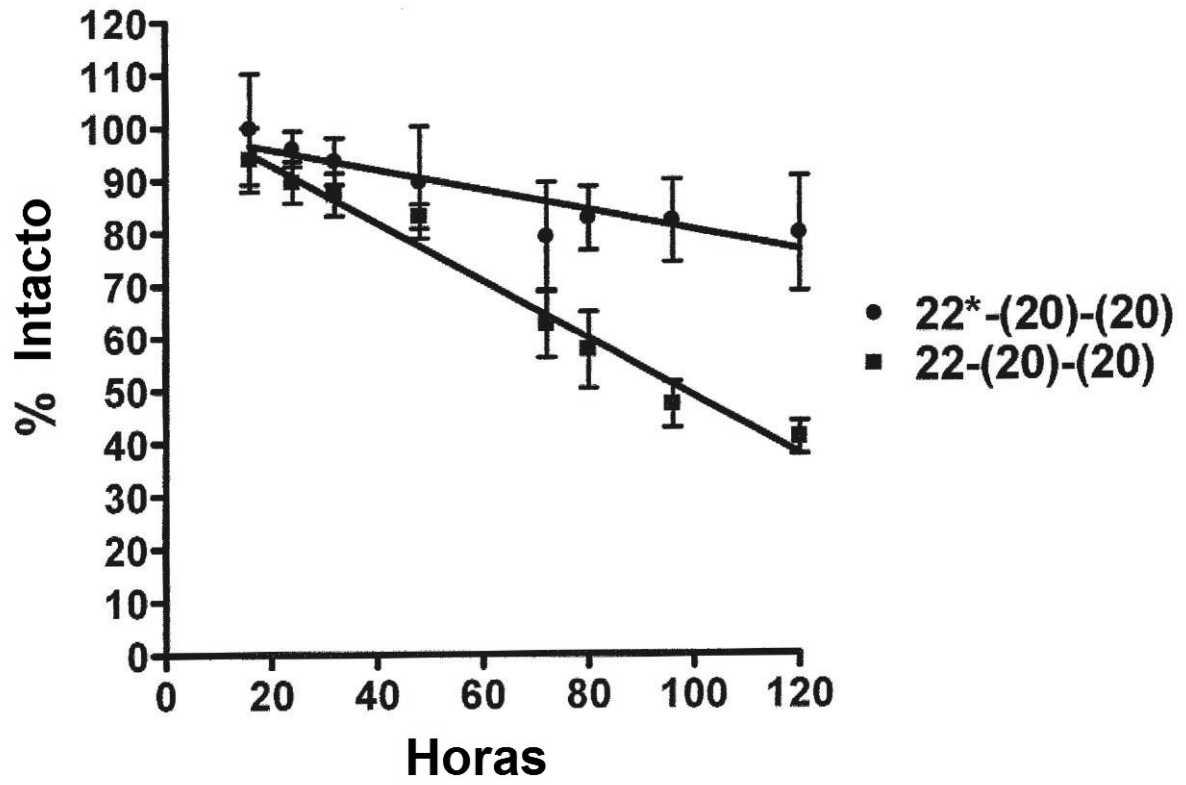


FIG. 9

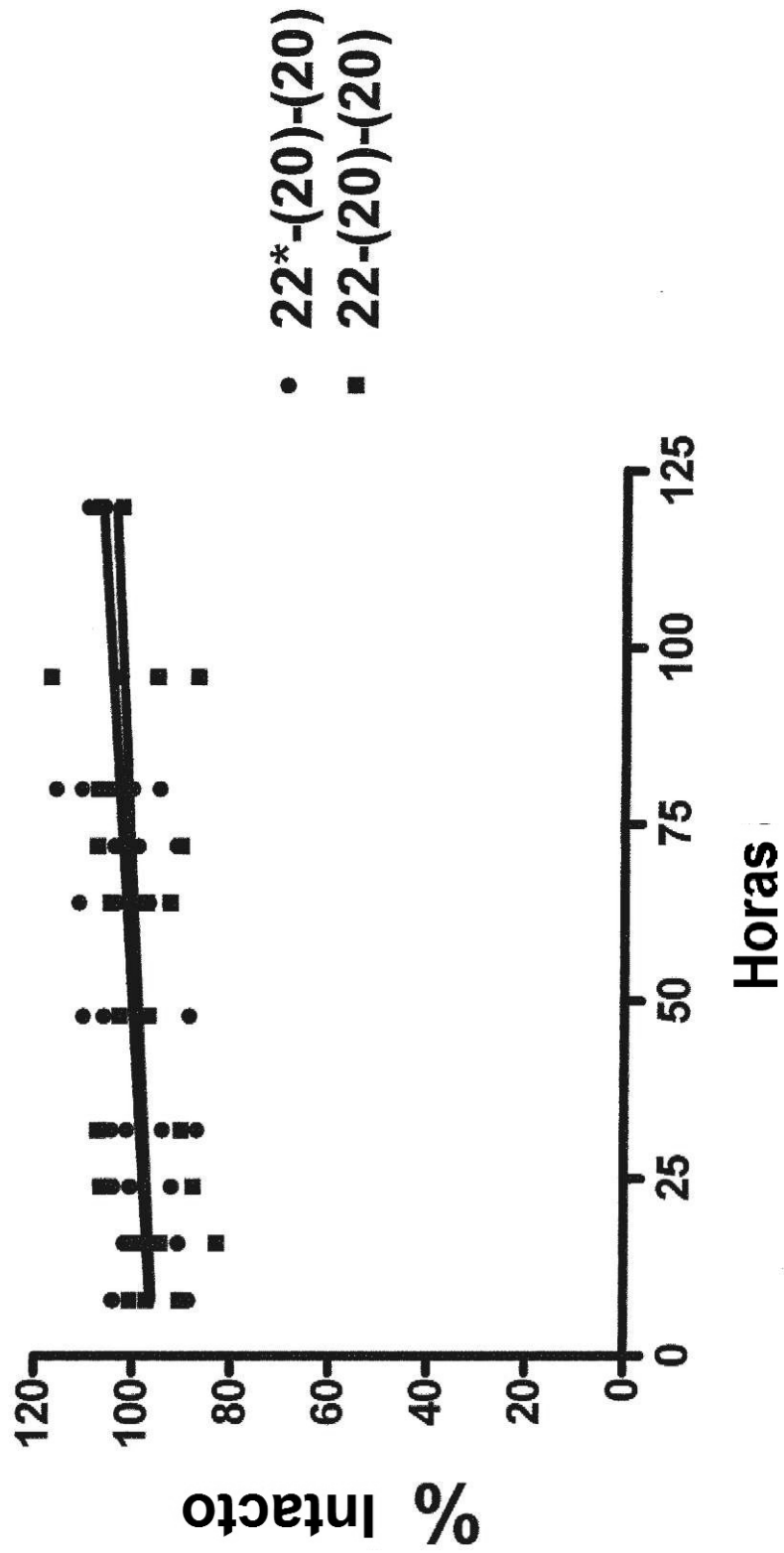


FIG. 10

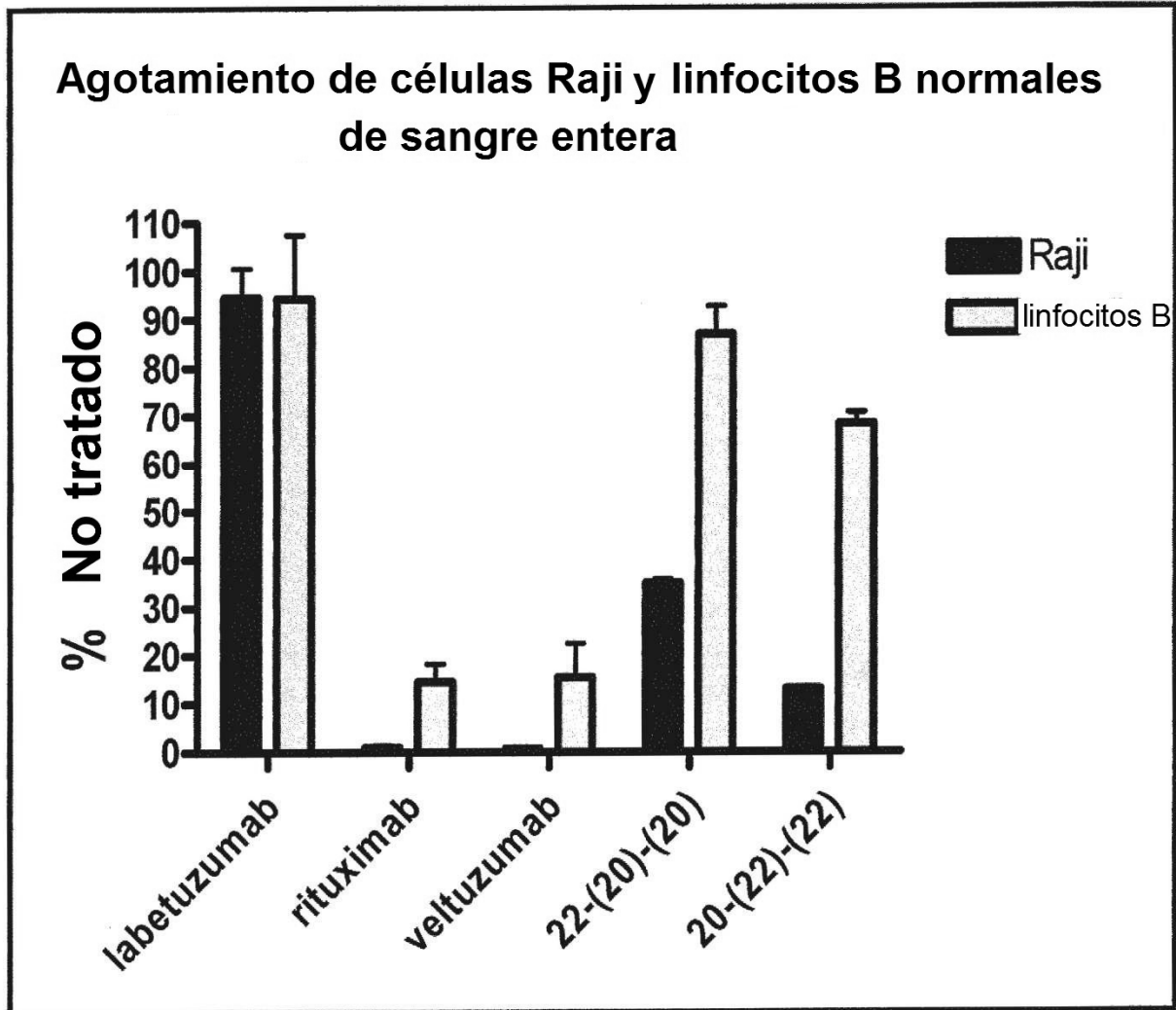


FIG. II

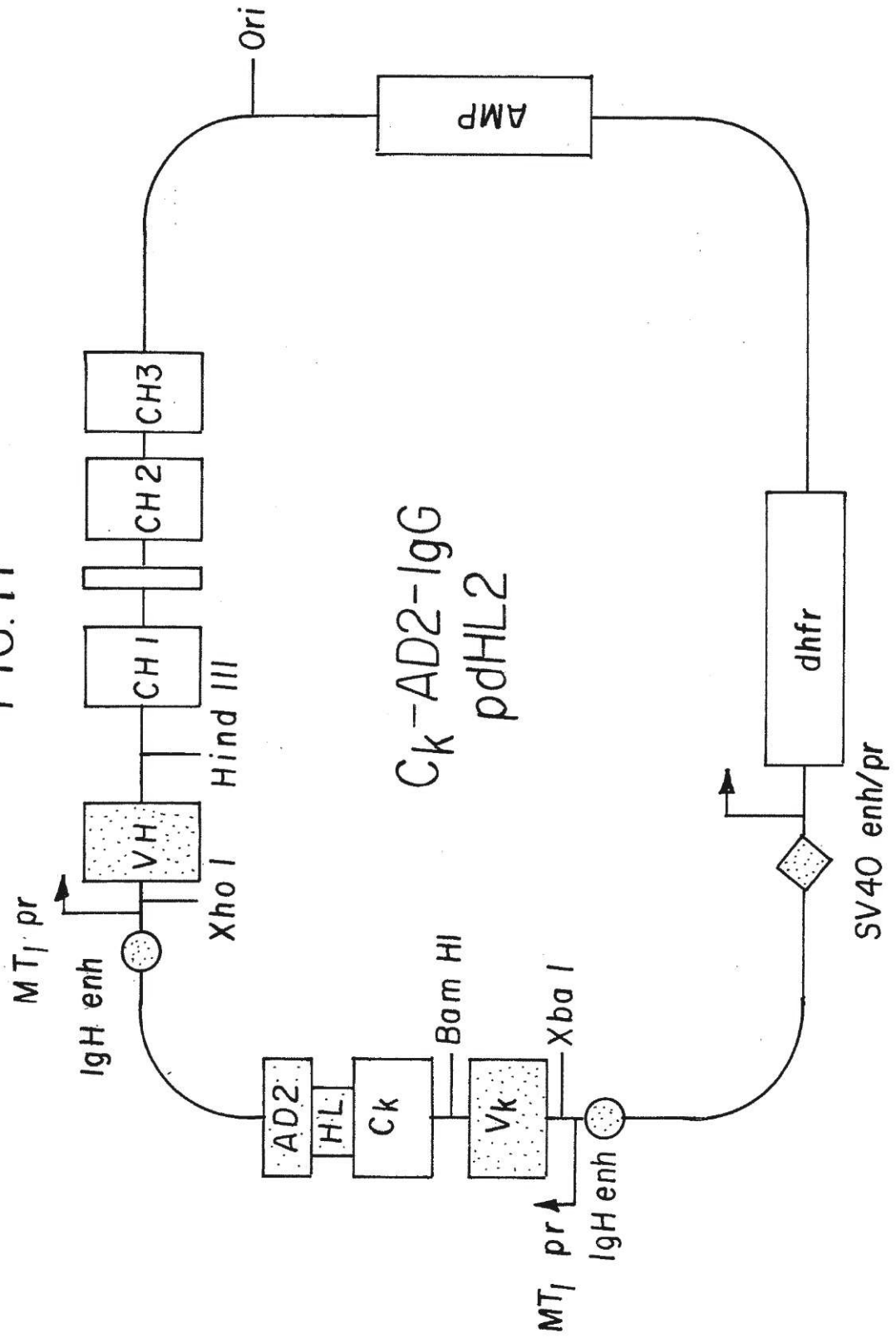


FIG. 12

