



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 319 426**

51 Int. Cl.:
C07K 14/31 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **04749087 .5**
96 Fecha de presentación : **30.06.2004**
97 Número de publicación de la solicitud: **1641818**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **05.04.2006**

54 Título: **Polipéptidos que presentan afinidad de unión por HER-2.**

30 Prioridad: **04.07.2003 SE 2003101987**
09.02.2004 SE 2004100275

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
07.05.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
07.05.2009

73 Titular/es: **Affibody AB.**
Box 20137
161 02 Bromma, SE

72 Inventor/es: **Carlsson, Jörgen;**
Ståhl, Stefan;
Eriksson, Tove;
Gunneriusson, Elin y
Nilsson, Fredrik

74 Agente: **Martín Santos, Victoria Sofía**

ES 2 319 426 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

Polipéptidos que presentan afinidad de unión por HER-2.

5 **Campo técnico de la invención**

La presente invención se refiere a un nuevo polipéptido, que se une al Receptor del Factor de Crecimiento Epidérmico Humano 2 (en adelante referido como HER-2). El polipéptido está relacionado con un dominio de la proteína A del estafilococo (SPA) en que la secuencia del polipéptido se corresponde con la secuencia del dominio de la SPA teniendo por lo menos una mutación por sustitución. La presente invención también se refiere al uso como medicamento de un polipéptido de unión a HER-2, y más en concreto al uso del mismo para la preparación de un medicamento para el tratamiento de formas de cáncer caracterizadas por la sobre-expresión de HER-2.

Antecedentes

15 *Moléculas Affibody*[®]

Las moléculas relacionadas con la proteína Z, derivadas del dominio B de la proteína A del estafilococo (SPA) (Nilsson B *et al.* (1987) Protein Engineering 1, 107-133), han sido seleccionadas de una biblioteca de tales moléculas aleatorias utilizando diferentes puntos de interacción (ver, por ejemplo, WO95/19374; WO00/63243; Nord K *et al.* (1995) Prot Eng 8:601-608; Nord K *et al.* (1997) Nature Biotechnology 15, 772-777). Se utilizaron diferentes moléculas diana para seleccionar tales derivados de la proteína Z, por ejemplo, como las descritas en Nord K *et al.* (1997, *supra*). Los experimentos descritos en esta referencia resumen principios de la tecnología general para seleccionar derivados de la proteína Z contra determinadas dianas, en vez de ser un estudio con el objetivo expreso de obtener una molécula con una afinidad suficientemente alta para su uso específico en una aplicación biotecnológica o terapéutica. El documento WO 02/08263 muestra a virus modificados que comprende de un polipéptido basado en el dominio Z de la proteína A del estafilococo y enseña que las posiciones 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 24, 25, 27, 28, 32 y 35 del dominio Z se pueden variar.

30 *HER-2 y su papel en las enfermedades cancerosas*

El proto-oncogén HER-2 codifica para la producción de una proteína receptora de superficie celular de 185 kD conocida como proteína o receptor HER-2 (Hynes NE *et al.* (1994) Biochim Biophys Acta 1198:165-184). Este gen es también a veces conocida como neu, HER-2/neu ó c-erbB-2. El gen neu fue descubierto por primera vez en ratas que habían sido tratadas con etilnitrosourea, y que exhibían una mutación de este gen (Shih C *et al.* (1981) Nature 290:261-264). El resultado de la versión mutada del neu es la producción de una forma constantemente activa del receptor, y constituye un potente oncogén que puede transformar las células a bajo número de copias (Hynes NE *et al.*, *supra*).

Las células normales expresan una cantidad pequeña de la proteína HER-2 en sus membranas plasmáticas en un patrón que es específico para cada tejido. Ningún ligando conocido de HER-2 ha sido esclarecido; sin embargo, se ha demostrado que HER-2 forma heterodímeros con HER1 (el receptor del factor de crecimiento epidérmico, EGFR), HER3 y HER4 en complejo con los ligandos para estos receptores. Dicha formación de heterodímeros lleva a señales del receptor HER-2 activado de transmisión para el crecimiento de HER-2 desde el exterior de la célula al núcleo, controlando así aspectos normales de crecimiento y división de la célula (Sundaresan S *et al.* (1999) Curr Oncol Rep 1:16-22).

En células tumorales, errores en el sistema de reproducción del ADN pueden resultar en la existencia de múltiples copias de un gen en un único cromosoma, un fenómeno conocido como amplificación genética. La amplificación del gen HER-2 lleva a una transcripción incrementada de este gen. Esto eleva los niveles de ARNm de HER-2 e incrementa la síntesis concomitante de la proteína HER-2, que tiene como resultado una sobre-expresión de la proteína HER-2 en la superficie de estas células tumorales. Esta sobre-expresión puede tener como resultado unos niveles de proteína HER-2 que son de 10 a 100 veces mayores que los encontrados en las células normales adyacentes. Esto, a su vez, tiene como resultado una división celular incrementada y una tasa simultáneamente elevada del crecimiento celular. La amplificación del gen HER 2 está implicada en la transformación de células normales a un fenotipo canceroso (Hynes NE *et al.*, *supra*; Sundaresan S *et al.*, *supra*).

Se cree que la sobre-expresión de la proteína HER-2 tiene como resultado la formación de homodímeros de HER-2, que a su vez tiene resulta en un receptor constantemente activo (Sliwkowski MX *et al.* (1999) Semin Oncol 26 (4 Suppl 12):60-70). En estas condiciones, las señales que promueven el crecimiento se podrían estar transmitiendo constantemente al interior de las células en ausencia de ligandos. Como consecuencia, se activan muchas vías intracelulares de transducción de señales, teniendo como resultado un crecimiento no regulado de las células y, en algunas ocasiones, una transformación oncogénica (Hynes NE *et al.*, *supra*). De esta manera, los mecanismos de transducción de señales mediados por receptores de factores de crecimiento son dianas importantes para la inhibición de la reproducción celular y el crecimiento tumoral.

65 El cáncer de mama es el tumor más común entre las mujeres en Estados Unidos, con un pronóstico de 192,200 nuevos casos previstos para el 2001 (Greenlee R *et al.* (2001) CA Cancer J Clin 51:15-36). En aproximadamente un 25% de todas las pacientes de cáncer de mama, se da una sobre-expresión del gen HER-2 debida a una amplificación

del mismo (Slamon DJ *et al.* (1989) Science 244:707-712). Esta sobre-expresión de la proteína HER-2 se asocia con varias variables con un pronóstico negativos, incluyendo el estado negativo del receptor de estrógeno, fracción alta de la fase S, el estado positivo de nódulos, el p53 mutada, y el elevado grado nuclear (Sjogren S *et al.* (1998) J Clin Oncol 16(2):462-469). Según Slamon *et al.* (*supra*), la amplificación del gen HER-2 se vio fuertemente asociada con una supervivencia más breve sin una enfermedad y una supervivencia general acortada en pacientes con nódulos linfáticos positivos.

Por estas razones, ha sido, y todavía es, un objetivo importante continuar con las investigaciones sobre el papel de HER-2 en la patogénesis y tratamiento del cáncer de mama. La identificación de moléculas que interactúan con HER-2 forma parte de este esfuerzo.

Estudios preclínicos *in vitro* han examinado si la inhibición de la actividad de HER-2 podría afectar al crecimiento de las células tumorales. El tratamiento de las células de cáncer de mama SK-BR-3 que sobre-expresan la proteína HER-2 con 4D5HER-2, uno de los varios anticuerpos monoclonales anti-HER-2 murinos, efectivamente inhibía la proliferación de las células tumorales, comparado con el tratamiento con un anticuerpo monoclonal como control. La administración de 4D5 a ratones padeciendo cánceres de mama y ovarios humanos (como xenoinjertos) que sobre-expresan HER-2, prolongaba su tiempo de supervivencia libres de tumores. Estudios similares en ratones demostraron una inhibición de crecimiento mediante anticuerpos monoclonales antiHER-2 en xenoinjertos de cáncer gástrico humano (Pietras RJ *et al.* (1994) Oncogene 9:1829-1838).

Entre los métodos de inhibir la proteína HER-2 abundantemente presente en las superficies de las células tumorales utilizando un anticuerpo, se ha puesto una terapia comercialmente disponible desde hace pocos años. De esta manera, el anticuerpo monoclonal 4D5, ó trastuzumab, está comercializada por F Hoffman-La Roche y Genentech con este propósito bajo el nombre comercial de Herceptin®.

A pesar de las obvias ventajas mostradas por la terapia con anticuerpos contra cánceres caracterizados por una sobre-expresión de la proteína HER-2, se mantiene el hecho de que una variedad de factores tienen el potencial de reducir la eficacia de los anticuerpos (ver, por ejemplo, Reilly RM *et al.* (1995) Clin Pharmacokinet 28:126-142). Éstos incluyen lo siguiente: (1) penetración limitada del anticuerpo en un tumor sólido de gran tamaño o en regiones vitales como el cerebro; (2) reducida extravasación de los anticuerpos hacia los sitios de interés debido a una permeabilidad vascular reducida; (3) una reactividad cruzada y unión inespecífica del anticuerpo a tejidos normales, reduciendo el efecto diana; (4) captación tumoral heterogénea que tiene como resultado zonas no tratadas; (5) incrementado metabolismo de los anticuerpos inyectados, que reduce los efectos terapéuticos; y (6) rápida formación de HAMA (anticuerpos humanos anti-ratón) y anticuerpos humanos anti-humanos, que inactivan el anticuerpo terapéutico.

Además, efectos tóxicos han sido el obstáculo principal en el desarrollo de anticuerpos terapéuticos para el cáncer (Carter P (2001) Nat Rev Cancer 1:118-129; Goldenberg DM (2002) J Nucl Med 43:693-713; Reichert JM (2002) Curr Opin Mol Ther 4:110-118). La reactividad cruzada con tejidos sanos puede causar considerables efectos secundarios para anticuerpos no conjugados (desnudos), cuyos efectos secundarios pueden ser potenciados al conjugar los anticuerpos con toxinas o radioisótopos. Las complicaciones mediadas por las reacciones inmunológicas incluyen disnea por efectos tóxicos a nivel pulmonar, complicaciones ocasionales del sistema nervioso central y periférico, y funciones renal y hepática disminuidas.

Ocasionalmente, se dan complicaciones tóxicas inesperadas, como los efectos cardiotoxicos asociados con trastuzumab (Herceptin®), el anticuerpo específico para HER-2 (Schneider JW *et al.* (2002) Semin Oncol 29 (3 suppl 11):22-28). La radio-inmunoterapia con anticuerpos conjugados con isótopos también puede causar supresión de la médula ósea.

A pesar del reciente éxito clínico y comercial de los anticuerpos anti-cancerígenos utilizados en la actualidad, quedan todavía un número considerable de cuestiones importantes referente al futuro de esta estrategia terapéutica. Como consecuencia, el continuo disposición de agentes con una afinidad comparable para HER-2 sigue siendo una cuestión de considerable interés dentro del campo, así como la disposición de usos de tales moléculas en el tratamiento de la enfermedad.

55 Descripción de la invención

Es un objetivo de la presente invención de satisfacer este interés mediante la disposición de un polipéptido que se caracteriza por una unión específica a HER-2.

60 Un objetivo relacionado a la invención es un polipéptido de unión a HER-2 que muestra una baja o nula unión inespecífica.

Es otro objetivo de la invención proporcionar un polipéptido de unión a HER-2 que pueda ser fácilmente utilizado como fracción en un polipéptido de fusión.

65 Otro objetivo es la disposición de un polipéptido de unión a HER-2, que resuelva uno o más de los conocidos problemas experimentados con reactivos para anticuerpos existentes.

ES 2 319 426 T3

Un objetivo adicional es la disposición de un polipéptido de unión a HER-2, que es susceptible de ser utilizado para aplicaciones terapéuticas.

5 Un objetivo relacionado es encontrar nuevas formas para el tratamiento, inhibición y/o enfoque en el ámbito clínico de las enfermedades cancerosas caracterizadas por una sobre-expresión de la proteína HER-2.

También es un objetivo proporcionar una molécula que pueda ser utilizada como reactivo para la detección de concentraciones bajas de HER-2.

10 Estos y otros objetivos son satisfechos por los diferentes aspectos de la invención como se reivindica en las reivindicaciones adjuntas. De esta manera, en un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido, que tiene una afinidad de unión para HER-2 de manera que el valor K_D de la interacción es como máximo de 1×10^{-6} M y que está relacionado con el dominio de la proteína A del estafilococo (SPA), en el que la secuencia del polipéptido corresponde con la secuencia Z de la proteína SPA, según se establece en la SEC ID NO:1, constando entre 3 y 20 mutaciones por
15 sustitución, y que el polipéptido consta de por lo menos tres de las siguientes mutaciones por sustitución:

(a) de fenilalanina a tirosina en la posición 13,

20 (b) de tirosina a triptófano en la posición 14,

(c) de glutamina a arginina en la posición 32 y

(d) de lisina a tirosina en la posición 35.

25 En otra realización, el polipéptido según la invención se une específicamente al dominio extracelular, ECD, de la proteína HER-2.

De acuerdo con lo presentado aquí, los presentes inventores han descubierto que es posible obtener un polipéptido con una unión de alta afinidad para HER-2 mediante mutagénesis por sustitución de un dominio de la SPA, y que tal polipéptido es capaz de interactuar con HER-2. Se encuentran varias aplicaciones para el polipéptido de la invención como una alternativa a los anticuerpos contra el HER-2. A modo de ejemplos no limitativos, será útil en el tratamiento de cánceres caracterizados por una sobre-expresión de HER-2, en la inhibición de la señalización celular mediante la unión a HER-2 en la superficie celular, en el diagnóstico de cáncer tanto *in vivo* como *in vitro*, en la dirección de agentes hacia células que sobre-expresan HER-2, en métodos histoquímicos para la detección de HER-2, en métodos de separación y en otras aplicaciones. El polipéptido según la invención puede resultar útil en cualquier método que dependa de la afinidad de un reactivo para HER-2. De esta manera, el polipéptido podría ser utilizado como un reactivo de detección, como un reactivo de captación o como un reactivo de separación en dichos métodos, pero también como un agente terapéutico por su propio derecho o como medio de dirigir otros agentes terapéuticos hacia la proteína HER-2. Los métodos que emplean el polipéptido según la invención *in vitro* pueden ser llevados a cabo en diferentes formatos, como en placas de microtitulación, en matrices proteicas, sobre superficies de biosensores, sobre secciones de tejido, etcétera. Pueden llevarse a cabo diferentes modificaciones del, y/o adiciones al, polipéptido según la invención, para obtener un polipéptido a medida para el uso específico que se desea, sin irse del alcance de la presente invención. Tales modificaciones y adiciones se describen más detalladamente a continuación, y pueden constar de aminoácidos adicionales contenidos en la misma cadena polipeptídica, o marcadores y/o agentes terapéuticos que son químicamente conjugados o bien unidos al polipéptido según la invención. Además, la invención también abarca
45 segmento específicos del polipéptido que conservan la capacidad de unión a HER-2.

La "afinidad de unión por HER-2" se refiere a la propiedad de un polipéptido que puede ser sometido a ensayos, por ejemplo, mediante el uso de la tecnología de resonancia de plasmón superficial, como en un instrumento Biacore®. La afinidad de unión para HER-2 puede ser sometida a ensayo en un experimento en el que se inmoviliza HER-2 sobre un chip sensorial del instrumento, y se pasa una muestra que contiene el polipéptido por el chip para someterlo al ensayo. De manera alternativa, el polipéptido a someter al ensayo se inmoviliza sobre un chip sensorial del instrumento, y se pasa una muestra que contiene HER-2 por el chip. Entonces, los sensores obtenidos se pueden ser interpretados por una persona experta p y por lo menos establecer una medida cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido para HER-2. Si se busca una medida cuantitativa, por ejemplo con el propósito de establecer un cierto valor de K_D para la interacción, es nuevamente posible utilizar métodos de resonancia de plasmón superficial. Los valores de unión pueden, por ejemplo, ser definidos en un instrumento Biacore® 2000 (Biacore AB). Se inmoviliza HER-2 sobre un chip sensorial del instrumento, se preparan las muestras de polipéptido cuya afinidad va a ser determinada con una dilución seriada y se inyectan en orden aleatorio. Luego se pueden calcular a partir de los resultados los valores de K_D ,
60 utilizando por ejemplo el modelo de Langmuir de una 1:1 interacción del software BIAevaluation 3.2 proporcionado por el fabricante del instrumento.

Como es indicado anteriormente, la secuencia del polipéptido según la presente invención está relacionada con la secuencia del dominio de la SPA en que han sido sustituidos de 1 a 20 residuos aminoácidos de dicho dominio de la SPA por otros residuos aminoácidos. Sin embargo, las mutaciones por sustitución introducidas no deberían afectar a la estructura básica del polipéptido. Es decir, el plegamiento general del esqueleto C_α del polipéptido de la invención será esencialmente el mismo que el del dominio de la SPA con el que está relacionado, por ejemplo teniendo los mismos elementos de estructura secundaria en el mismo orden, etc. De esta manera, los polipéptidos se

clasifican como aquellos que tienen el mismo plegamiento que el dominio de la SPA si se comparten las propiedades estructurales básicas, dando como resultando de esas propiedades, por ejemplo, en espectros de CD similares. La persona experta es consciente de otros parámetros que son relevantes. Este requisito de esencialmente conservar la estructura básica del dominio de la SPA, tras la mutación del mismo, establece restricciones sobre qué posiciones del dominio pueden ser sometidas a sustitución. Cuando se empieza a partir de la estructura conocida de la proteína Z, por ejemplo, es preferible que sean sustituidos los residuos aminoácidos situados en la superficie de la proteína Z, mientras que los residuos aminoácidos enterrados en el núcleo del “haz de triple hélice” de la proteína Z deberían mantenerse constantes para preservar las propiedades estructurales de la molécula. El mismo razonamiento es aplicable a otros dominios de la SPA, y segmentos específicos de los mismos.

La invención también abarca polipéptidos en los que el polipéptido de unión a HER-2 descrito anteriormente está presente como un dominio de unión a HER-2, al que han sido añadido residuos aminoácidos adicionales en cualquier extremo terminal. Estos residuos aminoácidos adicionales pueden jugar un papel en la unión de HER-2 al polipéptido, pero igualmente pueden servir para otros propósitos, relacionados por ejemplo con uno o más de los siguientes: producción, purificación, estabilización, acoplamiento o detección del polipéptido. Dichos residuos aminoácidos adicionales pueden constar de uno o más residuos aminoácidos añadidos para fines de acoplamientos químicos. Un ejemplo de esto es la adición de un residuo de cisteína en la primera posición o en la última posición en la cadena polipeptídica, es decir, en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal. Dichos residuos aminoácidos adicionales pueden constar también de un “marcador” para la purificación o detección del polipéptido, como un marcador hexahistidil (His₆), o un marcador “myc” o un marcador “flag” para interactuar con anticuerpos específicos para el marcador. La persona experta es consciente de otras alternativas.

Los “residuos aminoácidos adicionales” analizados anteriormente pueden también constituir uno o más dominios del polipéptido con cualquier función deseada, como la misma función de unión que el primer dominio de unión a HER-2, u otra función de unión, o una función enzimática, o una función fluorescente, o mezclas de las mismas.

De esta manera, la invención abarca multímeros de polipéptidos con afinidad para HER-2. Esto puede ser interesante, por ejemplo cuando se usa el polipéptido según la invención para el tratamiento de un cáncer o en un método de purificación de HER-2, para obtener una unión a HER-2 incluso más fuerte que la que es posible con un solo polipéptido como descrito en esta invención. En este caso, la disposición de un multímero, como un dímero, trímero o tetrámero, del polipéptido puede proporcionar los efectos de avidéz necesarios. El multímero puede consistir en un número adecuado de polipéptidos según la invención. Estos dominios del polipéptido según la invención, que forman los monómeros en tal multímero, pueden tener todos la misma secuencia de aminoácidos, pero es igualmente posible que tengan diferentes secuencias de aminoácidos. Las “unidades” del polipéptido ligadas al multímero según la invención pueden estar conectadas por una unión covalente utilizando métodos de química orgánica conocidos, o expresadas como uno o más polipéptidos de fusión en un sistema para la expresión recombinante de polipéptidos, o unidas de cualquier otra manera, bien directamente o mediante un agente ligante, por ejemplo un agente ligante aminoácido.

Adicionalmente, también son contemplados polipéptidos de fusión “heterogénicos”, en los que el polipéptido de unión a HER-2 constituye un primer dominio, o un primer segmento específico, y los segundos y otros segmentos específicos tienen otras funciones además de la de unirse a HER-2, y entran dentro del ámbito de la presente invención. El segundo y otro segmento(s) específico(s) del polipéptido de fusión pueden constar de un dominio de unión con afinidad para otra molécula diana diferente a HER-2. Dicho dominio de unión puede sin problema también estar relacionado con un dominio de la SPA que tenga mutaciones mediante la sustitución en las mismas posiciones de entre la 1 y aproximadamente la 20. El resultado es entonces un polipéptido de fusión que tiene por lo menos un dominio de unión a HER-2 y por lo menos un dominio con afinidad para dicha otra molécula diana, en el que ambos dominios están relacionados con un dominio de la SPA. Esto hace posible crear reactivos multispecíficos que pueden utilizarse en varias aplicaciones biotecnológicas, como cuando son utilizados como agentes terapéuticos o como reactivos de captura, detección o separación. La preparación de tales multímeros multi-específicos de polipéptidos relacionados con el dominio de la SPA, en los que por lo menos un dominio del polipéptido tiene afinidad para HER-2, puede llevarse a cabo como se ha descrito anteriormente para el multímero de varias “unidades” de unión a HER-2. En otras alternativas, el segundo u otro(s) segmento(s) específico(s) pueden constar de una proteína no relacionada, natural o recombinante (o un segmento específico de la misma que conserva la capacidad de unión de la proteína natural o recombinante) que tiene afinidad de unión por una diana. Un ejemplo de tal proteína de unión, que tiene afinidad para la albúmina humana y que puede ser utilizada como asociado para la fusión con el dominio de la SPA de unión a HER-2 derivado de la invención, es el dominio de unión a la albúmina de la proteína G del estreptococo (SPG) (Nygren P-Å *et al.* (1988) *Mol Recogn* 1:69-74). Por lo tanto un polipéptido de fusión entre el polipéptido relacionado con el dominio de la SPA de unión a HER-2 y el dominio de unión a la albúmina de SPG entra dentro del alcance de la presente invención. Cuando el polipéptido según la invención es administrado a un sujeto humano como agente terapéutico o como agente diana, la fusión del mismo con un segmento específico que se une a la albúmina, podría resultar beneficiosa, en que es probable que la vida media *in vivo* de tal proteína de fusión resulte extensa en comparación con la vida media del segmento específico de unión a HER-2 relacionada con el dominio de la SPA a solas (este principio ha sido descrito en, por ejemplo, WO91/01743).

También se ha contemplado otras posibilidades para la creación de polipéptidos de fusión. Como, por ejemplo, el polipéptido relacionado con el dominio de la SPA de unión a HER-2 según el primer aspecto de la invención se podría acoplar covalentemente a un segundo u otro(s) segmento(s) específico(s) que, además de o, en vez de, la función de unirse a una diana muestran otras funciones. Un ejemplo es una fusión entre uno o más polipéptidos de unión a HER-

ES 2 319 426 T3

2 y un polipéptido enzimáticamente activo que sirve como correspondiente o como fracción efectora. Ejemplos de enzimas correspondientes, que pueden ser acopladas al polipéptido de unión a HER-2 para formar una proteína de fusión, son conocidos por la persona experta e incluyen enzimas tales como la β -galactosidasa, la fosfatasa alcalina, la peroxidasa de rábano, la carboxipeptidasa. Otras opciones para el segundo y otro(s) segmento(s) específico(s) de un polipéptido de fusión según la invención incluyen polipéptidos fluorescentes, tales como la proteína verde fluorescente, la proteína roja fluorescente, luciferasa y variantes de las mismas.

Otras opciones para el segundo y otro(s) segmento(s) específico(s) de un polipéptido de fusión según la invención incluyen un segmento específico o segmentos específicos para aplicaciones terapéuticas. Para las aplicaciones terapéuticas, otras moléculas también podrían unirse covalentemente o no covalentemente y por otros medios al polipéptido de la invención, Ejemplos no limitativos incluyen enzimas para aplicaciones "ADEPT" (terapia profármaco de enzimas dirigidas a anticuerpos) utilizando el polipéptido según la invención para dirigir la enzima efectora (por ejemplo la carboxipeptidasa); proteínas para el reclutamiento de células efectoras y otros componentes del sistema inmune; citoquinas, tales como la IL-2, IL-12, TNF α , IP-10; factores procoagulantes, como los factor del tejido, los factores de von Willebrand; toxinas, tales como la ricina A, las exotoxinas de *Pseudomonas*, la calicheamicina, los maitansinoides; pequeñas moléculas tóxicas, como las análogas a auristatina, la dexorubicina. También, se contemplaron los aminoácidos adicionales anteriormente indicados (en particular el marcador de hexahistidina, cisteína), proporcionado el objetivo de acoplar queladores para radioisótopos a la secuencia del polipéptido, para incorporar fácilmente nucleótidos emisores para el diagnóstico (por ejemplo ^{68}Ga , ^{76}Br , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{124}I , ^{125}I) o para la terapia (por ejemplo ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At).

La invención abarca polipéptidos en los que el polipéptido de unión a HER-2 descrito anteriormente ha sido provisto con un grupo marcador, como por lo menos un fluoróforo, biotina o un isótopo radiactivo, por ejemplo para fines de detección del polipéptido.

Con respecto a la descripción anterior de proteínas de fusión que incorporan el polipéptido de unión a HER-2 según la invención, se debe de advertir que la denominación de primeros, segundos y otros segmentos específicos se lleva a cabo por razones de claridad para distinguir entre el segmento específico o segmentos específicos de unión a HER-2 por un lado, y los segmentos específicos que muestran otras funciones por otro lado. Estas denominaciones no tienen intención de referirse al orden real de los diferentes dominios en la cadena polipeptídica de la proteína de fusión. De esta manera, por ejemplo, dicho primer segmento específico puede aparecer sin restricción en el extremo N-terminal, en la mitad, o en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

Un ejemplo de un dominio de la SPA para su uso como un punto de partida para la creación de un polipéptido según la invención es la proteína Z, derivada del dominio B de la proteína A del estafilococo. Como está especificado en el apartado de Antecedentes, esta proteína ha sido previamente utilizada como estructura de soporte o "scaffold" para la creación de moléculas, denominadas moléculas Affibody[®], capaces de unirse a una variedad de dianas. La secuencia de 58 aminoácidos de la proteína Z sin modificar, denominada Z_{wt}, se presenta en la SEC ID NO:1 y se ilustra en la Figura 1.

En una forma de realización del polipéptido según la invención, éste se relaciona con un dominio de la SPA en que la secuencia del polipéptido se corresponde con la secuencia del dominio de la SPA teniendo entre 4 a 20 mutaciones por sustitución. Otras formas de realización pueden tener de 1 a 13 mutaciones por sustitución, o de 4 a 13 mutaciones por sustitución.

En una forma de realización más específica del polipéptido según la invención, su secuencia se corresponde con la secuencia establecida en la SEC ID NO:1 teniendo entre 1 a 20 mutaciones por sustitución, así como entre 4 a 20, entre 1 a 13 o entre 4 a 13 mutaciones por sustitución.

El polipéptido según la invención puede en algunas formas de realización corresponderse con la secuencia establecida en la SEC ID NO:1, cuya secuencia abarca de mutaciones por sustitución en una o más de las posiciones 13, 14, 28, 32 y 35. Adicionalmente, la secuencia del polipéptido según la invención puede constar de mutaciones por sustitución en una o más de las posiciones 9, 10, 11, 17, 18, 24, 25 y 27.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 13 de fenilalanina a tirosina.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 14 de tirosina a triptófano.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 28 de asparagina a un residuo aminoácido seleccionado de entre la arginina y la histidina, más preferentemente a arginina.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 32 de glutamina a arginina.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 35 de lisina a tirosina.

ES 2 319 426 T3

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 10 de glutamina a arginina.

5 La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 11 de asparagina a treonina.

La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 17 de leucina a valina.

10 La secuencia de un polipéptido según otra forma de realización de la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos una mutación por sustitución en la posición 27 de arginina a un residuo aminoácido seleccionado de entre la lisina y la serina.

15 Un polipéptido preferente según la invención se corresponde con la SEC ID NO:1, abarcando de por lo menos las siguientes mutaciones: F13Y, Y14W, N28R, Q32R y K35Y.

20 Ejemplos de secuencias específicas de diferentes formas de realización del polipéptido según la invención, cada una abarcando de una o más de las mutaciones específicas descritas anteriormente, se presentan en la SEC ID NO:2-4 y 6-79 (la SEC ID NO:5 se lista únicamente para fines ilustrativos) y se ilustran en la Figura 1. Las características de unión a HER-2 de estos polipéptidos se describen en los ejemplos que siguen a esta descripción general de la invención.

25 Como alternativa a la utilización del dominio de la SPA sin modificar, el dominio de la SPA puede también estar sujeto a una mutagénesis para incrementar la estabilidad del mismo en condiciones alcalinas. Dicha estabilización implica la sustitución dirigida al sitio en la secuencia no modificada en que se encuentre cualquier residuo de asparagina por residuos aminoácidos que son menos sensibles a las condiciones alcalinas. Cuando se utiliza el polipéptido según la invención como un ligando de afinidad en una cromatografía de afinidad, esta propiedad de tener una reducida sensibilidad a los álcalis proporciona beneficios; las columnas de cromatografía de afinidad son frecuentemente sometidas a tratamientos duros con álcali para su limpieza *in situ* (CIP) entre los ciclos de separaciones, y la capacidad de soportar dicho tratamiento prolonga la vida útil de la matriz usada en la cromatografía por afinidad. Como ejemplo, utilizando la proteína Z como punto de partida, el polipéptido según la invención puede tener, además de las mutaciones por sustitución que le confieren unión a HER-2, modificaciones en que por lo menos un residuo de asparagina seleccionado de entre N3, N6, N11, N21, N23, N28, N43 y N52 ha sido sustituido con un residuo aminoácido que es menos sensible al tratamiento alcalino. Ejemplos no limitativos de tales polipéptidos son los que tienen los siguientes conjuntos de mutaciones (con respecto a la secuencia de Z_{wt}): N3A; N6D; N3A, N6D y N23T; N3A, N6D, N23T y N28A; N23T; N23T y N43E; N28A; N6A; N11S; N11S y N23T; N6A y N23T. De esta manera, estos dominios de la SPA, al igual que otros dominios de la SPA que han sido sometidos a mutación de asparagina por razones de estabilidad, pueden ser todos sometidos a posteriores mutaciones por sustitución de residuos aminoácidos para obtener el polipéptido de unión a HER-2 de la invención. De manera alternativa, un polipéptido de unión a HER-2 de la invención que consta de residuos de asparagina puede ser sometido a mutaciones adicionales para sustituir dichos residuos. Evidentemente, esta última alternativa es sólo posible si se conserva la capacidad de unión a HER-2 de dicha molécula.

35 La invención también incluye polipéptidos que han sido derivados de cualquiera de los polipéptidos descritos anteriormente, a través de la generación de un fragmento de los polipéptidos anteriores, que conserva la afinidad para HER-2. El fragmento de polipéptido es tal que se mantiene estable, y conserva la especificidad para unirse a HER-2. La posibilidad de crear fragmentos de un dominio del tipo salvaje de la SPA con especificidad de unirse a la conservada inmunoglobulina G es mostrada por Braisted AC y Wells JA *et al.* en Proc Natl Acad Sci USA 93:5688-5692 (1996). Usando un diseño basado en la estructura y métodos de expresión mediante fagos, el dominio de la unión de un haz de triple hélice de 59 residuos fue reducido a un derivado resultante de doble hélice de 33 residuos. Esto se consiguió mediante una selección a pasos de mutaciones aleatorias en diferentes regiones, lo que causó una estabilidad y una afinidad de unión que mejoraron iterativamente. Siguiendo el mismo razonamiento con los polipéptidos según el primer aspecto de la invención, la persona experta sería capaz de obtener un polipéptido “minimizado” de unión a HER-2 con las mismas propiedades de unión que las del polipéptido HER-2 “parental”. Por lo tanto, un polipéptido que constituye un segmento específico de un polipéptido según el aspecto anterior de la invención, un fragmento que conserva la afinidad de unión para HER-2, es un aspecto adicional de la invención.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que abarca una secuencia que codifica un polipéptido según la invención.

60 Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector de expresión que abarca la molécula de ácido nucleico del aspecto anterior, y otros elementos ácido nucleicos que posibilitan la producción del polipéptido según la invención mediante la expresión de la molécula de ácido nucleico.

Otro aspecto más de la presente invención se refiere a una célula huésped que incluye el vector de expresión del aspecto anterior.

65 Los tres últimos aspectos de la invención son herramientas para la producción de un polipéptido según la invención, y la persona experta será capaz de obtenerlos y ponerlos en uso práctico sin excesivo esfuerzo, con la información

acerca del polipéptido a expresar dada en este documento y dado el actual nivel de dominio de la técnica de expresión de proteínas recombinantes. Como ejemplo, un plásmido puede ser utilizado para la expresión de la proteína Z no modificada (ver por ejemplo Nilsson B *et al.* (1987), *supra*) como el material de partida. Las deseadas mutaciones por sustitución pueden introducirse en este plásmido, utilizando técnicas conocidas, para obtener un vector de expresión según la invención.

Sin embargo, el polipéptido según la invención puede también ser producido por otros medios conocidos, incluyendo síntesis química o expresión en diferentes huéspedes procariotas o eucariotas, incluyendo plantas y animales transgénicos. Al utilizar síntesis químicas de polipéptidos, cualquiera de los residuos naturales de ácidos nucleicos que esté presente en el polipéptido como descrito anteriormente pueden ser sustituidos por cualquier residuo aminoácido que no se exprese naturalmente o un derivado del mismo, siempre y cuando la capacidad de unión a HER-2 del polipéptido no quede sustancialmente comprometida. La capacidad de unión debería por lo menos ser conservada, pero la sustitución con un residuo aminoácido que no se exprese naturalmente o un derivado del mismo podría realmente servir también para mejorar la capacidad de unión a HER-2 del polipéptido. También, la incorporación de un aminoácido que no se exprese naturalmente puede ser llevada a cabo para proporcionar un espacio para el acoplamiento alternativo de moléculas (por ejemplo marcadores, efectores, queladores, etc.) al polipéptido de unión a HER-2. Los aminoácidos no clásicos, o análogos sintéticos de aminoácidos, incluyen, pero no se limitan a, los isómeros D de los aminoácidos comunes, ácido α -amino isobutírico, ácido 4-amino butírico, ácido 2-amino butírico, ácido 6-amino hexanoico, ácido 2-amino isobutírico, ácido 3-amino propiónico, ornitina, norleucina, norvalina, hidroxiprolina, sarcosina, citrulina, ácido cisteico, t-butilglicina, t-butilalanina, fenilglicina, ciclohexilalanina, β -alanina, ácidos fluoro aminos, aminoácidos de diseño como aminoácidos β -metil, aminoácidos $C\alpha$ -metil, aminoácidos $N\alpha$ -metil, y aminoácidos análogos en general. Además, los residuos aminoácidos pueden presentarse en su forma D o L.

La presente invención también tiene que ver con diferentes aspectos del uso del polipéptido de unión a HER-2 descrito anteriormente, así como varios métodos para el tratamiento, diagnóstico y detección en los que el polipéptido resulta ser útil debido a sus características de unión. Cuando se hace referencia al "polipéptido de unión a HER-2" en la siguiente descripción de estos usos y métodos, este término pretende abarcar solo al polipéptido de unión a HER-2, pero también a todas las moléculas basadas en este polipéptido descrito anteriormente que por ejemplo constituyen segmentos específicos del mismo y/o incorporan el polipéptido de unión a HER-2 como un segmento específico en una proteína de fusión y/o están conjugadas con un marcador o agente terapéutico y/o están provistas de residuos aminoácidos adicionales para ser utilizados como marcador o para otros propósitos. Como explicado anteriormente, dichas proteínas de fusión, derivados, segmentos específicos, etcétera, forman parte de la presente invención.

Es así que, por una parte, la invención proporciona el uso como medicamento del polipéptido de unión a HER-2 como es descrito en la presente memoria.

En un aspecto adicional, la invención proporciona un uso del polipéptido de unión a HER-2 como es descrito en la presente memoria en la preparación de un medicamento para el tratamiento de por lo menos una forma de cáncer caracterizada por la sobre-expresión de HER-2. Una forma particular de cáncer caracterizada por la sobre-expresión de HER-2 es el cáncer de mama. Como es descrito en el apartado de Antecedentes, aproximadamente el 25% de todas las pacientes con cáncer de mama muestran una sobre-expresión de HER-2 (Slamon DJ *et al.*, *supra*).

Sin desear estar restringido por esta teoría, se piensa que el polipéptido descrito en la presente memoria es útil como agente terapéutico basándose en por lo menos uno de los siguientes mecanismos: (i) Potenciar la quimioterapia (citotóxica), en que la administración del polipéptido funcionará en sinergia con existentes y venideras cromoterapias y terapias hormonales. Se ha demostrado que el bloqueo de la proteína HER-2 en las superficies celulares evita la reparación del ADN que sigue al impacto que tienen los fármacos que dañan el ADN (Pietras RJ *et al.* (1994) *Oncogene* 9:1829-1838). (ii) Inhibición de la proliferación de células tumorales (citostático). Este argumento se basa en la observación de que la regulación descendente de la proteína HER-2 ocurre cuando una molécula (anticuerpo) se une a la proteína HER-2 en la superficie celular, provocando que algunos receptores sean endocitosados, limitando la señal para un crecimiento adicional de células (Baselga J *et al.* (1998) *Cancer Res* 58:2825-2831; Sliwkowski MX *et al.*, *supra*).

Un aspecto relacionado con la presente invención es la disposición de un método para el tratamiento de por lo menos una forma de cáncer caracterizada por la sobre-expresión de HER-2, método que incluye la administración a un sujeto necesitado de dicho tratamiento de una cantidad terapéuticamente efectiva de un compuesto, que consta de un polipéptido de unión a HER-2 como se describe en la presente memoria como sustancia activa.

Las propiedades de unión a HER-2 del polipéptido según descrito en la invención, junto con la adecuada creación de proteínas de fusión y/o moléculas de unión marcadas por el polipéptido, significa que el polipéptido también puede ser útil para dirigir otras sustancias activas hacia la localidad de un tumor que incluye células que sobre-expresan HER-2. De esta manera, otro aspecto de la presente invención es la disposición de un uso del polipéptido de unión a HER-2 como descrito en la presente memoria, conjugado con una sustancia con actividad anti-cancerígena para el envío de dicha sustancia a células que sobre-expresan HER-2. La sustancia conjugada también puede ser una que funciona provocando una respuesta del sistema inmune endógeno del sujeto. Las células Natural Killer (NK), u otros efectores del sistema inmune, pueden ser atraídas hacia el complejo de HER-2 y polipéptido de unión a HER-2 en la superficie de las células mediante la disposición de un segmento específico de fusión que sirve para reclutar dichos efectores. Las células NK u otros efectores, habiendo detectado que la célula es anormal, se unen a la proteína de unión a HER-

2. Finalmente, la célula cancerosa es consumida por las células NK (Sliwowski MX *et al.*, *supra*; Pegram MD *et al.* (1997) Proc Am Assoc Cancer Res 38:602, Abstract 4044).

5 Dicha sustancia activa puede ser una proteína acoplada al polipéptido de unión a HER-2 mediante fusión o mediante una unión química, como la escogida entre enzimas efectoras para aplicaciones "ADEPT" (terapia con profármacos de enzimas dirigidas a anticuerpos); proteínas para el reclutamiento de células efectoras y otros componentes del sistema inmune; citoquinas, tales como la IL-2, IL-12, TNF α , IP-10; factores procoagulantes, tales como el factor de tejido, el factor von Willebrand; toxinas, tales como la ricina A, la endotoxina del *Pseudomonas*, la calicheamicina, los maitansinoides. De manera alternativa, la sustancia activa puede ser un fármaco citotóxico, como las análogas a la auristatina o la dextrorubicina, o un isótopo radiactivo (por ejemplo ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At), tal isótopo puede estar directamente asociado al polipéptido de unión a HER-2, o asociado mediante un agente quelante, tales como los queladores DOTA o DTPA bien conocidos.

15 En un aspecto relacionado, la invención también proporciona un método para dirigir una sustancia que tiene una actividad anti-cancerosa hacia células que sobre-expresan HER-2 *in vivo*, abarcando la administración a un paciente de un conjugado de dicha sustancia activa y un polipéptido de unión a HER-2 como descrito en la presente memoria. El conjugado es adecuado como es descrito en el párrafo anterior.

20 Otro aspecto de la presente invención es el uso del polipéptido de unión a HER-2 como descrito en la presente memoria para la detección de HER-2 en una muestra. Por ejemplo, dicha detección puede llevarse a cabo con el objetivo de diagnosticar estados de la enfermedad caracterizados por una sobre-expresión de HER-2. La detección de la presencia de HER-2 en una muestra puede realizarse *in vitro* o *in vivo*. Una opción preferente para el diagnóstico *in vivo* es la utilización de una tomografía por emisión de positrones, PET. La muestra en cuestión puede ser, por ejemplo, una muestra de un fluido biológico o una muestra de tejido. Un método habitual, en uso hoy en día con anticuerpos dirigidos contra HER-2, puede ser adaptado para su uso con el polipéptido de unión a HER-2 de la presente invención, es la detección histoquímica de la presencia de HER-2 utilizada para la identificación de la sobre-expresión de proteína HER-2 en muestras de tejido fresco, congelado, o fijado en formalina y embebido en parafina. con el fin de detectar el HER-2, el polipéptido según la invención puede ser utilizado nuevamente como parte de la proteína de fusión, en la que el otro dominio es una enzima corresponsal o enzima fluorescente. De manera alternativa, puede ser marcado opcionalmente mediante un quelador con uno o más agentes fluorescentes y/o isótopo(s) radiactivo(s). Isótopos radiactivos adecuados incluyen ^{68}Ga , ^{76}Br , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{124}I y ^{125}I .

30 Otro aspecto más de la presente invención está constituido por el uso de un polipéptido de unión a HER-2 como descrito en la presente memoria en un método de detección de HER-2 en una muestra de flujo biológico. Este método abarca los pasos de (i) proporcionar una muestra para ser examinado de flujo biológico de un paciente, (ii) aplicar un polipéptido de unión a HER-2 como descrito en la presente memoria a la muestra en condiciones tales que se posibilite la unión del polipéptido a cualquier HER-2 presente en la muestra, (iii) retirar el polipéptido no unido, y (iv) detectar el polipéptido unido. La cantidad detectada de polipéptido unido se relaciona con la cantidad de HER-2 presente en la muestra. En el paso (ii), la aplicación de un polipéptido de unión a HER-2 a la muestra puede ser realizada en cualquier formato adecuado, e incluye por ejemplo la situación en la que el polipéptido de unión a HER-2 está inmovilizado sobre un soporte sólido que se pone en contacto con la muestra, como en configuraciones en las que el polipéptido de unión a HER-2 se presenta en solución.

45 Otro aspecto, relacionado, de la presente invención es un método para la detección de HER-2 en una muestra, que abarca los pasos de (i) proporcionar una muestra de tejido sospechosa de contener HER-2, por ejemplo una sección criostática de tejido o una sección de tejido embutida en parafina, (ii) aplicar un polipéptido de unión a HER-2 según la invención a dicha muestra en condiciones que lleven el polipéptido a unirse a cualquier HER-2 presente en la muestra, (iii) retirar el polipéptido no unido, y (iv) detectar el polipéptido unido. La cantidad de polipéptido unido detectado se relaciona con la cantidad de HER-2 presente en la muestra.

50 También se proporciona en la presente invención un kit para el diagnóstico de la sobre-expresión de HER-2 en una muestra de tejido, que abarca el polipéptido de unión a HER-2 según la invención fusionado con una enzima corresponsal (como la fosfatasa alcalina o la peroxidasa de rábano), reactivos para la detección de actividad enzimática, y porta objetivos con tejidos de control positivo y negativo.

55 También se proporciona en la presente invención un kit para el diagnóstico de la sobre-expresión de HER-2 en una muestra de tejido, que abarca el polipéptido de unión a HER-2 según la invención fusionado con un marcador para la detección mediante un anticuerpo (como un marcador flag o marcador myc), un anticuerpo primario específico para el marcador, un anticuerpo secundario específico para el anticuerpo primario y conjugado con una enzima corresponsal, reactivos para la detección de la actividad enzimática, y porta objetivos de tejidos de control positivo y negativo.

60 Un área dentro de las aplicaciones del diagnóstico es la detección *in vivo* de las células cancerosas o agregados de las mismas. La invención proporciona un kit para la realización de dicho diagnóstico, abarcando el polipéptido de unión a HER-2 según la invención marcado con un quelador, un isótopo radiactivo para el diagnóstico (ejemplos no limitativos son ^{68}Ga , ^{76}Br , ^{111}In , ^{99}Tc , ^{124}I y ^{125}I), y reactivos para el análisis de la eficiencia de incorporación.

Como descrito anteriormente, la invención incluye el uso del polipéptido de unión a HER-2 según la invención para dirigir sustancias activas hacia células que sobre-expresan HER-2, tales como ciertos tipos de células cancerosas.

La invención también proporciona un kit para este propósito, que abarca el polipéptido de unión a HER-2 según la invención marcado con un quelador, un isótopo radiactivo terapéutico (ejemplos no limitativos son ^{90}Y , ^{131}I , ^{211}At), y reactivos para el análisis de la eficiencia de incorporación.

5 Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra una alineación de las secuencias del listado de secuencias. Las posiciones de los aminoácidos que han sido sometidos a modificación según la invención en los polipéptidos $Z_{\text{HER-2}}$ (representados por la SEC ID NO:2-79) están indicadas en negrita.

10

La Figura 2 es una ilustración esquemática de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión producido en el Ejemplo 1. $Z_{\text{HER-2}}$ representa un dominio de unión a HER-2 con una secuencia seleccionada de SEC ID NO:2-3 y el His_6 representa un marcador hexahistidil.

La Figura 3 muestra el resultado de la electroforesis en gel de proteínas de fusión purificadas. Línea 1: $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ (8,7 kDa); Línea 2: $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2B}}$ (8,7 kDa); M: marcador de peso molecular (LMW-SDS Marker Kit, Amersham Biosciences #17-0446-01).

La Figura 4 muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de $10\ \mu\text{M}$ de la proteína de fusión $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ sobre las superficies de un chip sensorial que tienen inmovilizadas sobre ellas A: HER-2, B: HIV-1 gp 120, y C: BB.

La Figura 5 muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de $10\ \mu\text{M}$ de la proteína de fusión $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2B}}$ sobre las superficies de un chip sensorial que tienen inmovilizadas sobre ellas A: HER-2, B: HIV-1 gp 120, y C: BB.

La Figura 6 muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de A: $1\ \mu\text{M}$; B: $2\ \mu\text{M}$; C: $5\ \mu\text{M}$; D: $10\ \mu\text{M}$; E: $20\ \mu\text{M}$; F: $40\ \mu\text{M}$ de la proteína de fusión $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ sobre la superficie de un chip sensorial que tiene HER-2 inmovilizada sobre ella.

30

La Figura 7 muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de A: $1\ \mu\text{M}$; B: $2\ \mu\text{M}$; C: $5\ \mu\text{M}$; D: $10\ \mu\text{M}$; E: $20\ \mu\text{M}$; F: $40\ \mu\text{M}$ de la proteína de fusión $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2B}}$ sobre la superficie de un chip sensorial que tiene HER-2 inmovilizada sobre ella.

La Figura 8A muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ en un sistema de células de flujo con HER-2-ECD a las siguientes concentraciones seleccionadas; $312,5\ \text{nM}$ (rombos rellenos), $156,3\ \text{nM}$ (círculos rellenos), $78,2\ \text{nM}$ (triángulos rellenos), $39,1\ \text{nM}$ (cuadrados vacíos), $19,6\ \text{nM}$ (rombos vacíos), y $9,8\ \text{nM}$ (círculos vacíos).

La Figura 8B muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2B}}$ en un sistema de células de flujo con HER-2-ECD a las siguientes concentraciones seleccionadas; $625\ \text{nM}$ (cuadrados rellenos), $312,5\ \text{nM}$ (rombos rellenos), $156,3\ \text{nM}$ (círculos rellenos), $78,2\ \text{nM}$ (triángulos rellenos), $39,1\ \text{nM}$ (cuadrados vacíos) y $19,6\ \text{nM}$ (rombos vacíos).

La Figura 9 muestra la especificidad de unión de $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ a células SKBR-3. Se dejó $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ marcada con ^{125}I unirse a células SKBR-3, con una relación entre ligado:receptor Her-2 teóricamente estimada a un 5:1. Los valores son las medias de tres medidas. Las barras de error representan desviaciones estándar.

La Figura 10 muestra sensogramas de Biacore obtenidos tras la inyección de $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ purificada (cuadrados vacíos) e $\text{His}_6\text{-}(Z_{\text{HER-2A}})_2$ (cuadrados rellenos) sobre la superficie de un sistema de células de flujo en un chip sensorial que contiene HER-2-ECD acoplados mediante grupos amino. Los valores "y" de las curvas han sido normalizados a entre 0 y 100 Unidades de Resonancia. El gel insertado para SDS-PAGE (gel homogéneo de un 16% sw Tris-Glicina, condiciones reductoras) muestra la $\text{His}_6\text{-}Z_{\text{HER-2A}}$ expresada y purificada mediante IMAC (línea 1) y la $\text{His}_6\text{-}(Z_{\text{HER-2A}})_2$ (línea 2). La línea M indica las proteínas marcadoras con masas moleculares en kilodaltons.

55

La Figura 11 muestra una comparación de la biodistribución de radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 1 hora después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$. Bloqueado: datos para ratones pre-inyectados con $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ sin marcar. No bloqueado: datos para ratones sin esta pre-inyección.

La Figura 12 muestra una comparación de la biodistribución de radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 4 horas después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ (Z4dimer) o ^{125}I -benzoato- Z_{Taq} (Ztaq4:5).

La Figura 13 muestra la biodistribución de yodo radioactivo en ratones desnudos con un tumor, tras varios instantes en el tiempo después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$. Se ha combinado datos de dos experimentos de biodistribución. Los datos dados de 4 horas después de la inyección son las medias de ambos experimentos.

La Figura 14 muestra la biodistribución de yodo radioactivo en ratones desnudos con un tumor, 8 horas después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$.

ES 2 319 426 T3

La Figura 15 muestra una comparación de la concentración de radio-actividad en la sangre y tumores. Los datos son combinados a partir de dos experimentos de biodistribución. A: datos experimentales. B: curvas ajustadas usando regresión no lineal con un modelo de decaimiento exponencial de dos fases.

5 La Figura 16 muestra la relación de concentración de radio-actividad entre un tumor y la sangre. Los datos son combinados a partir de dos experimentos de biodistribución.

La Figura 17 es una imagen de cuerpo completo hecho con una cámara- γ de ratones desnudos con un tumor (SKOV-3) 6 horas (ratón de la izquierda) y 8 horas (ratón de la derecha) después de la inyección intra-venosa del conjugado ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ en la cola.

La Figura 18 muestra la biodistribución de la radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 4 horas después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $Z_{\text{HER-2A}}$.

15 La Figura 19 muestra la biodistribución de la radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 24 horas después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $Z_{\text{HER-2A}}$.

La Figura 20 muestra la cinética del yodo radioactivo en un tumor y la sangre de ratones desnudos con el tumor tras varios instantes en el tiempo después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $Z_{\text{HER-2A}}$.

20 La Figura 21 muestra la relación de radio-actividad entre el tumor y la sangre después de la inyección de ^{125}I -benzoato- $Z_{\text{HER-2A}}$.

La Figura 22 es una ilustración esquemática de la secuencia de aminoácidos de un polipéptido de fusión producido en el Ejemplo 6. $Z_{\text{HER-2A}}$ representa el dominio de unión a HER-2 con la secuencia que se muestra en SEC ID NO:2 y ABD representa un dominio de unión a albúmina de la proteína G del estreptococo.

La Figura 23 muestra la biodistribución de la radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 12 horas (gris) y 24 horas (blanco) después de la inyección de ^{125}I -benzoato-ABD $(Z_{\text{HER-2A}})_2$.

30 La Figura 24 muestra la cinética del yodo radioactivo en ratones desnudos con un tumor tras varios instantes en el tiempo después de la inyección de (A): ^{125}I -ABD $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, (B): ^{125}I - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, y (c): ^{125}I - Z_{HER2A} .

La Figura 25 muestra una comparación de la dosis de ^{125}I -benzoato- $Z_{\text{HER-2A}}$, ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, y $^{99\text{m}}\text{TC}$ - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$.

La Figura 26 muestra la biodistribución de la radio-actividad en ratones desnudos con un tumor, 8 horas después de la inyección de $^{99\text{m}}\text{TC}$ - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$.

40 La Figura 27 muestra una comparación de la radio-actividad en órganos seleccionados tomados de ratones desnudos con un tumor, 8 horas después de la inyección de $^{99\text{m}}\text{TC}$ - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$.

La Figura 28 es un diagrama que muestra el crecimiento de las células SKBR-3 después de su exposición a ^{211}At - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ durante 24 horas. Los círculos negros rellenos de la curva A representan células no expuestas; los cuadrados vacíos de la curva B representan células expuestas a un nivel moderado; y los cuadrados grises rellenos de la curva D representan células expuestas a un alto nivel de ^{211}At - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$. Los triángulos grises rellenos de la curva C representan células expuestas a alto nivel de ^{211}At - $(Z_{\text{HER-2}})_2$ combinado con una cantidad 500 veces mayor de His_6 - $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ sin marcar. Los valores son las medias de tres experimentos, las barras de error representan la desviación estándar.

50 Las Figuras 29A y 29B muestran los resultados de un ABAS ELISA para determinar la actividad de unión de clones escogidos de las cuartas y quintas rondas de selección de maduración por afinidad.

La Figura 30 es una ilustración esquemática de la secuencia de aminoácidos del polipéptido de fusión producido en los Ejemplos 9 y 10. $Z_{\text{HER-2}}$ representa un polipéptido de unión a HER-2 según el primer aspecto de la invención, e His_6 representa un marcador hexahistidil.

La Figura 31 es un conjunto trazado de varios sensoogramas obtenidos a partir de 10 polipéptidos de unión a HER-2 madurados por afinidad según la invención, después de ser inyectados sobre una superficie cubierta con HER-2 a una concentración aproximada de 50 nM. A: $Z_{\text{HER-2:205}}$; B: $Z_{\text{HER-2:149}}$; C: $Z_{\text{HER-2:202}}$; D: $Z_{\text{HER-2A}}$; E: $Z_{\text{HER-2:222}}$; F: $Z_{\text{HER-2:225}}$; G: $Z_{\text{HER-2:209}}$; H: $Z_{\text{HER-2:229}}$; I: $Z_{\text{HER-2:207}}$; J: $Z_{\text{HER-2:107}}$; K: $Z_{\text{HER-2:101}}$. Observen que $Z_{\text{HER-2A}}$, aislada de la selección de la biblioteca de primera generación, fue añadida al estudio.

La Figura 32 muestra los resultados del análisis de unión de variantes de $Z_{\text{HER-2}}$, que posee una actividad específica de unión a HER-2. Los diversos sensoogramas trazados conjuntamente de las inyecciones de (A) $Z_{\text{HER-2:3053}}$ (B) $Z_{\text{HER-2:0434}}$ (C) $Z_{\text{HER-2:0024}}$ sobre las superficies de chips sensoresiales, contienen HER-2 o HIV-1 gp 120 como esta indicado.

A continuación se procederá con la ilustración de la invención mediante la serie de experimentos llevados a cabo de acuerdo con lo descrito en la presente memoria.

Ejemplo 1

5

Selección y estudio de polipéptidos de unión a HER-2

En estos experimentos, varios polipéptidos de unión a HER-2 según la invención fueron seleccionados, y posteriormente tipificados a partir de una biblioteca de una multitud de polipéptidos relacionados con diferentes dominios de la SPA.

10

Análisis severa de la biblioteca y selección de clones

Se preparó una biblioteca combinatoria de péptidos expresados en fagos como esencialmente se describe en Nord K *et al.* (1995, *supra*). El fondo común de esta biblioteca fue utilizada en el presente estudio abarcando 8,7 x 10⁸ variantes de la proteína Z (moléculas Affibody®), con residuos aminoácidos aleatorios en las posiciones 9, 10, 11, 13, 14, 17, 18, 24, 25, 27, 28, 32 y 35. Las moléculas Affibody® de unión a antígenos fueron seleccionadas en cuatro ciclos de análisis severa utilizando el dominio extracelular de HER-2 humana biotinizado (HER-2-ECD) como diana (dominio extracelular recombinante de HER-2 humana, aminoácidos 238-2109, proporcionado por el Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, E.E.U.U.). A partir de los resultados de los cuatro ciclos de selección, fueron recogidos 91 clones para ELISA por fago para llevar a cabo un análisis de su actividad de unión a HER-2.

20

ELISA por Fago para el análisis de la unión a HER-2

Los fagos de los clones obtenidos después de las cuatro rondas de selección fueron producidos en placas de 96 pocillos, y se utilizó una Técnica de Ensayo con sustancias Inmunoabsorbentes unidas a Enzimas (ELISA) para el cribado de fagos que expresaron moléculas Affibody® de unión a HER-2. Colonias individuales fueron utilizadas para inocular 250 µl de medio TSB (30,0 Tryptic Soy Broth (Merck), con agua hasta un volumen final de 1l, esterilizado en un autoclave) con un suplemento de 2% glucosa y 100 µl de ampicilina en una placa de 96 pocillos hondos y cultivados en un agitador durante toda la noche a una temperatura de 37°C. Se añadieron 5 µl de este cultivo a 500 µl de medio TSB+YE (30,0 Tryptic Soy Broth (Merck), 5,0 extracto de levadura, y agua hasta un volumen final de 1l, esterilizado en un autoclave) con un suplemento de 0,1% glucosa y 100 µg/ml de ampicilina en una placa nueva. Después de ser cultivados a 37°C durante 3 horas, se añadieron a cada pocillo 0,5 µl de 5 x 10¹² pfu/ml (2,5 x 10⁹ pfu) de fago ayudante M13K07 (New England Biolabs, #NO325S) y 100 µl de medio TSB+YE, y se incubaron las placas sin agitación a 37°C durante 30 minutos. Se añadieron a cada pocillo 300 µl de TSB+YE suplementado con IPTG, kanamicina y ampicilina hasta una concentración final de 1 mM de IPTG, 25 µg/ml de kanamicina y 100 µg/ml de ampicilina, y se incubaron las placas en un agitador durante toda la noche a 30°C. Se obtuvo un precipitado de las células mediante centrifugación a 2500 g durante 15 minutos y los sobrenadantes, conteniendo fagos que expresan moléculas Affibody®, fueron utilizados en un ELISA. Se añadieron 100 µl de 4 µg/ml de HER-2 en PBS (2,68 mM KCl, 137 mM NaCl, 1,47 mM KH₂PO₄, 8,1 mM Na₂HPO₄, a pH=7,4) a una placa con pocillos pequeños (Nunc #446612) y esta fue incubada durante 1 mes a 4°C. Después de tapar los pocillos con 2% de leche desnatada en polvo en PBS (tampón de bloqueo) durante 1 hora a temperatura ambiente, se añadió 200 µl de sobrenadante conteniendo fagos y 50 µl del 10% tampón de bloqueo. Las placas fueron incubadas durante 2 horas a temperatura ambiente. Se diluyó un anticuerpo policlonal (anti-M13 de conejo, Abcam #ab6188) en una proporción de 1:1000 con el tampón de bloqueo al 2%, y se añadió 150 µl a cada pocillo. Se incubó la placa a temperatura ambiental durante 1 hora. Se diluyó un anticuerpo de cabra IgG anti-conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma #A-3687) en una proporción de 1:1000 con el tampón de bloqueo al 2%, después de lo cual se añadió 150 µl a cada pocillo y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiental. Se preparó una solución de desarrollo disolviendo el sustrato Sigma-104 (Sigma #104-105) en una mezcla con una proporción de 1:1 con M dietanolamina, 5 mM de MgCl₂, a pH=9,8 y agua (1 comprimido/5 ml de mezcla 1:1). Después, se añadió a cada pocillo 180 µl de la solución de desarrollo. Se lavaron los pocillos dos veces con PBS-T (PBS + 0,1% Tween-20) y una vez con PBS antes de añadir cada reactivo nuevo. 25 minutos después de añadir el sustrato, se leyeron las placas a A₄₀₅ en un espectrofotómetro para ELISA (Basic Sunrise, Tecan).

50

Los fagos que codifican ligandos para HER-2 fueron identificados mediante el criterio del umbral de un valor A₄₀₅ del ELISA de por encima de 0,5. 48 clones dieron una señal por encima de este valor, y fueron seleccionados para el análisis de la secuencia de ADN, junto con 5 clones seleccionados aleatoriamente que no dieron ningún resultado.

55

Análisis de la secuencia de ADN

La secuenciación del ADN de los clones aislados según el procedimiento anterior se llevó a cabo en el equipo ABI PRISM®, BigDye™ Terminator v2.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. Se prepararon los plásmidos y se secuenció el ADN codificador de las moléculas Affibody® utilizando los oligonucleótidos RIT-27 (5'-GCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTG-3') Y el NOKA-2 biotinizado (5'-CGGAACCAGAGCCACCACCGG-3'). Las secuencias fueron analizadas en un analizador ABI PRISM®3700 Genetic Analyser (Applied Biosystems). De los 53 clones previamente seleccionados, se descubrió que varios clones codificaban la misma secuencia de aminoácidos. Teniendo en cuenta estas degeneraciones, se muestran cuatro secuencias de moléculas Affibody® expresadas por clones seleccionados durante el ensayo de unión de ELISA en la Figura 1 (Z_{HER-2A-D}), y se identifican en la secuencia listada como SEC ID NO:2-5.

65

Clonación y producción de proteínas

Los polipéptidos Z_{HER-2} fueron expresados en células *E. coli*, utilizando vectores de expresión que codifican construcciones que son ilustrados esquemáticamente en la Figura 2. Los polipéptidos fueron producidos por estos como uniones a un marcador hexahistidil N-terminal. Los polipéptidos unidos a His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} fueron purificados sobre columnas de Cromatografía de Afinidad por ión Metálico Inmovilizado (IMAC) y analizados en SDS-PAGE. Los resultados del experimento SDS-PAGE son mostrados en la Figura 3.

10 *Análisis de polipéptidos unidos mediante un biosensor*

Las interacciones entre las variantes de Z_{HER-2} marcado con His producidas según la sección anterior y HER-2 fueron analizadas utilizando la resonancia de plasmón superficial en un sistema Biacore®2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). La HER-2 humana, HIV-1 gp 120 (Protein Sciences Corporation, #2003-MN), y BB (proteína de unión a la albúmina derivada de la proteína G del estreptococo), las dos últimas empleadas como controles, fueron inmovilizadas en diferentes células de flujo mediante el acoplamiento de aminas a la capa de dextran carboxilado encima de superficies de chips CM-5, según las recomendaciones del fabricante. La inmovilización de la HER-2 humana, HIV-1 gp 120, y BB dió como resultado 1900, 6290, y 1000 unidades de resonancia (RU), respectivamente. Una cuarta superficie de una célula de flujo fue activada y desactivada para su uso como blanco durante las inyecciones. Las proteínas His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} fueron diluidas en HBS (5 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3,4 mM EDTA, 0,005% P-20 surfactante, a pH=7,4) hasta una concentración final de 10 μ M, e inyectadas aleatoriamente como duplicados a una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto. La capacidad de las proteínas purificadas His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} de interactuar con HER-2 se confirmó, como se ilustra mediante los sensogramas de las Figuras 4 y 5, respectivamente.

Además, se llevó a cabo estudios cinéticos para His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} . Se utilizó el chip CM-5 con 1900 RU de HER-2 humana inmovilizada en el mismo. Se prepararon una serie de seis diferentes concentraciones (1 μ M-40 μ M) de polipéptido de unión a HER-2 en HBS para cada His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} , y se inyectaron aleatoriamente como duplicados a una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto. El tiempo total de la inyección fue de 50 segundos (asociación) seguido de un lavado durante 6 minutos (disociación). Las superficies fueron regeneradas con 20 mM de HCl durante 10 segundos. Las respuestas medidas en las células de referencia (superficie activada/desactivada) fueron sustraídas de la respuesta medida en las células con la HER-2 inmovilizada. Las curvas denominando la unión (sensogramas) fueron analizadas utilizando el modelo de Langmuir de interacción proporcionado al 1:1 del programa BIAevaluation 3.0.2 (Biacore AB). Como queda claro en las curvas de interacción presentadas en las Figuras 6 (His_6-Z_{HER-2A}) y 7 (His_6-Z_{HER-2B}), ambos His_6-Z_{HER-2A} e His_6-Z_{HER-2B} claramente se unen a HER-2, como es evidente en las curvas de asociación y disociación con una K_D indicada de 10-100 nM para His_6-Z_{HER-2A} y de 200-400 nM para His_6-Z_{HER-2B} . Además, la unión es selectiva, ya que ninguno de los polipéptidos de unión a HER-2 estudiados se unen a los antígenos de control BB y gp 120 (Figuras 4 y 5).

En un segundo experimento cinético, las variantes His_6-Z_{HER-2A} y His_6-Z_{HER-2B} fueron nuevamente inyectadas sobre la superficie de HER-2 a diferentes concentraciones (de 0 a 5 μ M, con 0,0098 μ M como la menor concentración para His_6-Z_{HER-2A} y 0,0196 μ M para His_6-Z_{HER-2B} , diluidas en HBS) con una velocidad de flujo de 30 μ l/minuto. Previo al análisis cinético, las concentraciones de proteínas habían sido determinadas por análisis de aminoácidos. La constante de equilibrio de disociación (K_D), la constante de velocidad de asociación (k_a), y la constante de velocidad de disociación (k_d) fueron calculadas utilizando el programa BIAevaluation 3.2 (Biacore), suponiendo que la unión era de uno a uno. Para los dos primeros análisis Biacore, se corrieron las muestras a 25°C por duplicado y en orden aleatorio, y las células de flujos fueron regenerados mediante la inyección de 10 mM de HCl después de cada inyección. Tras la evaluación de las curvas de asociación (Figura 8A-8B), se determinó que la constante de equilibrio de disociación (K_D) era de aproximadamente 50 nM para His_6-Z_{HER-2A} y de aproximadamente 140 nM para His_6-Z_{HER-2B} . La razón para la diferencia de la K_D probablemente se debe a la destacada diferencia en la velocidad de disociación, como puede verse comparando el diagrama A de la Figura 4 con el diagrama A de la Figura 5. Para His_6-Z_{HER-2A} , se calculó que la constante de velocidad de asociación (k_a) era de aproximadamente $1,8 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la constante de velocidad de disociación (k_d) de aproximadamente $9,9 \times 10^{-3} \text{ s}^{-1}$, mientras que para His_6-Z_{HER-2B} , k_a y k_d eran difíciles de estimar debido a la rápida cinética de asociación y disociación. De esta manera, la variante His_6-Z_{HER-2A} de affibody que mostraba una unión más fuerte a su diana, fue seleccionada para una caracterización adicional.

Ejemplo 2

*Unión de Z_{HER-2A} a células que expresan HER-2**Cultivo celular*

La línea celular de cáncer de mama humano SKBR-3, que como se sabe expresa aproximadamente 2×10^6 moléculas de HER-2 por célula, fue adquirida de ATCC (ATCC #HTB-30). Las células fueron cultivadas en medio RPMI 1640 con un suplemento de un suero fetal bovino al 10%, 2 mM de L-glutamina, y PEST (100 IU/ml de penicilina y 100 μ g/ml de estreptomina), todo de Biochrom KG (Berlín, Alemania). Las células fueron cultivadas a 37°C en aire humidificado que contenía 5% CO_2 , y sembradas en placas de petri de 3 cm tres días antes del experimento.

Marcar con un radio-isotopo

Se preparó el precursor para marcar, N-succinilmidyl *p*-(trimetilestaño)benzoato (SPMB), según Orlova *et al.* En Nucl Med Biol 27:827-835 (2000), y se añadió 5 μg de SPMB a 5 MBq de ^{125}I en una solución de 5% ácido acético. Para iniciar la reacción, se añadió 40 μg de cloramina-T (Sigma, St. Louis, MO) en una solución acuosa. Se mezcló la mezcla de reacción durante 5 minutos, y se añadió 80 μg de sodio metabisulfato (Aldrich, Steinheim; Alemania) en una solución acuosa para aplacar la reacción. Se añadió el precursor marcado con un radioactivo a 40 μg de His₆-Z_{HER-2A} o His₆-Z_{HER-2B} en 0,07 M de tampón borato, a pH=9,2. Se llevó a cabo una reacción de acoplamiento a temperatura ambiental durante 45 minutos en constante agitación. Se separaron las variantes de Z_{HER-2} marcadas de los productos de bajo peso molecular utilizando una columna de exclusión por tamaño NAPTM-5 (Amersham Biosciences) equilibrada con PBS. A continuación se analizaron las variantes de Z_{HER-2} marcadas utilizando la tecnología Biacore para verificar que el procedimiento de marcado no había afectado la afinidad de unión hacia HER-2-ECD. Ambas variantes de Z_{HER-2} mostraron conservar la afinidad (datos no mostrados).

15 *Ensayos celulares*

A cada placa de aproximadamente 100000 células SKBR-3, se añadió 14 ng de His₆-Z_{HER-2A} o His₆-Z_{HER-2B} en 1 ml de medio complementado. Esta cantidad corresponde a una relación teórica de 5:1 ligando:receptor. Se trataron tres placas sin células de la misma manera, para determinar la unión inespecífica que no deriva de las células. Este valor fue restado de todos los demás. Para analizar la especificidad de unión de las células, tres placas se trataron no solo con las variantes de Z_{HER-2} marcadas, sino también con una cantidad 500 veces mayor de variantes de Z_{HER-2} no marcadas. Después de tres horas de incubación a 37°C, se retiró el medio reactivo y se lavaron rápidamente las placas tres veces con un medio helado libre de suero. Se incubaron las células con 0,5 ml de solución Tripsina/EDTA (0,25%/0,02% en PBS; Biochrom KG, Berlín, Alemania) durante 15 minutos a 37°C. Luego las células fueron suspendidas en 1 ml de medio complementario, y se utilizó 0,5 ml de suspensión celular para el contar la cantidad de células y el restante 1 ml fue utilizado para medir de la radio-actividad en un contador γ automático.

Como es presentado en la Figura 9, His₆-Z_{HER-2A} mostró una unión específica a las células SKBR-3 (barra denominada “no bloqueada”), que como se sabe expresan 2×10^6 receptores de HER-2 por célula. La unión de His₆-Z_{HER-2A} marcada con un radioactivo podría ser totalmente bloqueada por la adición de un exceso de His₆-Z_{HER-2A} no marcada (barra denominada “bloqueada”). Sin embargo, la unión de His₆-Z_{HER-2B} a células SKBR-3 estaba por debajo del límite de detección (datos no mostrados), probablemente como resultado de la mayor velocidad de disociación para esta variante de Z_{HER-2} (un factor de conductividad mayor).

Ejemplo 3

*Expresión y caracterización de dímeros de polipéptidos de unión a HER-2**Construcción del ADN y producción de proteínas*

La elección de un ligando de affibody novedoso, denominado His₆-Z_{HER-2A} y con afinidad para el receptor de HER-2, ha sido descrito anteriormente. Se construyó una variante Z_{HER-2} dimérica mediante sub-clonación del segmento específico del gen que codifica el polipéptido Z_{HER-2A} en el vector de expresión para His₆-Z_{HER-2A}. El segmento específico Z_{HMR2A} introducido se verificó mediante la secuenciación del ADN en un secuenciador de ADN ABI Prism[®]3700 Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). Se utilizó la cepa RR1ΔM15 de *Escherichia Coli* (Rüther, Nucleic Acids Res 10:5765-5772 (1982)) como huésped bacteriano durante el procedimiento de clonación. El vector resultante codifica, bajo el control del promotor T7 (Sturdier *et al.*, Methods Enzymol 185:60-89 (1990)), una variante de Z_{HER-2} dimérica (Z_{HER-2A})₂, unida con un marcador hexahistidil N-terminal (His₆), que permite la purificación mediante Cromatografía de Afinidad por ión Metálico inmovilizado (IMAC).

La variante dimérica de Z_{HER-2} fue expresada como una proteína de fusión marcada con His₆ en la cepa *E. coli* BL21 (DE3), y recuperada mediante purificación IMAC en una columna “Talon Metal Affinity Resin” (8901-2, Biosciences, CA) en condiciones de desnaturalización, como es descrita para los polipéptidos monoméricos en el Ejemplo 1. La renaturalización de la proteína de unión His₆-(Z_{HBR2A})₂ purificada fue llevada a cabo por filtración en gel utilizando columnas PD-10, equilibradas con PBS (10 mM de fosfato, 154 mM de NaCl, a pH=7,1) según el protocolo del fabricante (Amersham Biosciences). La concentración de proteína fue calculada a partir de las medidas de absorción a 280 nm, utilizando el coeficiente de extinción apropiado (30440 M⁻¹cm⁻¹), y también verificada mediante análisis de aminoácidos (Aminosyraanalyscentralen, Uppsala, Suecia). La proteína purificada fue adicionalmente analizada mediante SDS-PAGE en un gel de Tris-Glicina homogéneo al 16%, utilizando un sistema Novex (Novex, CA, E.E.U.U.). Las bandas de proteína fueron visualizadas con un tinte de Azul Brillante Coomassie. Tras el análisis con SDS-PAGE, la proteína fue visualizada como una banda específica del peso molecular esperado (15,6 kD) (Figura 10, Línea 2 de inserción). Las estimaciones a partir de las medidas de absorción a 280 nm demostraron un nivel de expresión de aproximadamente 200 mg/l de cultivo celular.

Análisis mediante un biosensor

Se utilizó un instrumento Biacore®2000 (Biacore AB) para el análisis de la interacción bioespecífica en tiempo real (BIA). Un dominio extracelular recombinante de HER-2 (HER-2-ECD), diluido en 10 mM de NaAc, a pH=4,5, fue inmovilizado (aproximadamente 2200 RU) en la capa de dextran carboxilado de la superficie de una célula de flujo de un chip sensor CM5 (de un nivel de investigación) (BR-1000-14, Biacore AB) mediante la unión a aminas según las instrucciones del fabricante. Otra superficie de la célula de flujo fue activada y desactivada, para servir como superficie de referencia. Para la muestra de Z_{HER-2} , el tampón fue cambiado a HBS (5 mM HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, 0,005% de P20 surfactante, a pH=7,4) mediante una filtración sobre gel utilizando una columna NAP™-10, según el protocolo del fabricante (Amersham Biosciences), y a continuación se filtró la muestra f(0,4 μ m; Milipore, Billerica, MA). Los análisis de la unión fueron llevados a cabo a 25°C, y se utilizó HBS como el tampón para las ejecuciones. Para todos los análisis Biacore; las muestras fueron ensayadas por duplicado en orden aleatorio, y después de cada inyección las células de flujo fueron regeneradas al inyectar 10 mM de HCl.

En un primer experimento, se ensayó la diferencia de la unión a HER-2-ECD entre las proteínas Z_{HER-2} monomérica y dimerica (His_6 - Z_{HER-2A} del Ejemplo 1 e His_6 -(ZHER-2 A)₂) mediante la inyección de 5 μ M de cada proteína sobre la superficie de HER-2-ECD, con una velocidad de flujo de 5 μ l/min. Como puede observar en la Figura 10, se encontró una velocidad de disociación más lenta para His_6 -(ZHER-2 A)₂, indicando una unión más fuerte entre HER-ECD e His_6 -(ZHER-2 A)₂, comparada con His_6 - Z_{HER-2A} .

En un segundo experimento, His_6 -(ZHER-2 A)₂ fue sometida a un análisis cinético, en el que la proteína fue inyectada sobre la superficie de HER-2-ECD a diferentes concentraciones (de 0 a 5 μ M, con una concentración de 0,0049 μ M como mínimo, diluida en HBS) con una velocidad de flujo de 30 μ l/min. Previo al análisis cinético, se determinó la concentración de proteína mediante el análisis de aminoácidos. La constante de equilibrio de disociación (K_D), la constante de velocidad de asociación (k_a), y la constante de velocidad de disociación (k_d) fueron calculadas utilizando el programa BIAevaluation 3.2 (Biacore AB), suponiendo una proporción de unión de 1:1. Tras la evaluación de las curvas de unión, se determinó que la constante de equilibrio de disociación (K_D) era de aproximadamente 3 nM, se calculó que la constante de velocidad de asociación (k_a) era de aproximadamente $2,5 \times 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$ y la constante de velocidad de disociación (k_d) de aproximadamente $7,6 \times 10^{-4} \text{ M}^{-1} \text{ s}^{-1}$. Pueden compararse estos valores con las constantes cinéticas obtenidas para el His_6 - Z_{HER-2A} monomérico del Ejemplo 1, confirmando la asociación más fuerte del His_6 -(ZHER-2 A)₂ dimerico. Dicha afinidad elevada aparentemente mejorada, debida a los efectos de avidéz para los construcciones dimericos, ha sido demostrado anteriormente para otras moléculas Affibody® (Gunneriusson E *et al.*, Protein Eng 12:873-878) (1999)).

Ejemplo 4

Biodistribución y el enfoque al tumor con (Z_{HER-2A})₂ en xenoinjertos de ratones desnudos que padecen SKOV-3

En los experimento que constituyen este ejemplo, el polipéptido (Z_{HER-2A})₂ dimerico marcado con His_6 según el Ejemplo 3 fue marcado el radioactivo ¹²⁵I e inyectado en ratones desnudos que padecían de un tumor injerto caracterizado por la sobre-expresión de HER-2. Se llevaron a cabo estudios de la biodistribución del polipéptido, al mismo tiempo que se tomó imágenes de los ratones inyectados para estudiar la localización del polipéptido marcado. Se utilizó un derivado del dominio Z marcado con afinidad de unión para la polimerasa Taq ADN como control sin especificidad para HER-2 (Z_{Taq} ; descrita en Gunneriusson E *et al.*, *supra* y denominada $Z_{TaqS1-1}$).

Materiales y métodos

Yodación indirecta de (Z_{HER-2A})₂ mediante radiación

Se añadió un volumen de 2,3 μ l de ¹²⁵I (correspondiente a 10 MBq) ($Na[^{125}I]$, Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) a un tubo con recubrimiento de silicona para la microcentrífuga. Se añadió 10 μ l de ácido acético (al 0,1% en agua), 5 μ l de N-succinilmidyl *p*-(trimetilestaño)benzoato (1 mg/ml en ácido acético en metanol al 5%) (preparado según Koziorowski J *et al.*, Appl Radiat Isot 49:955-959 (1998)) y 10 μ l de Cloramina-T (4 mg/ml en agua) ($CH_3C_6H_4SO_2N(Cl)Na \cdot 3H_2O$, Sigma, St Louis, MO, E.E.U.U.). Se dejó que la reacción tuviese lugar durante cinco minutos mezclando de vez en cuando. Luego se paró la reacción añadiendo 10 μ l de sodio metabisulfato (8 mg/ml en agua) ($Na_2S_2O_5$, Sigma, St Louis, MO, E.E.U.U.). Se añadió un volumen de 40 μ l de dímero (Z_{HER-2A})₂ (0,25 mg/ml en 0,07 M de tampón borato, a pH=9,2 (borato de sodio, $Na_2B_4H_7 \cdot 10H_2O$, Sigma, St Louis, MO, USA y ácido hidrocórico, HCl, Merck, Darmstadt, Alemania)) al tubo de ensayo. Se añadieron a cada tubo otros 40 μ l de tampón borato para elevar el pH hasta aproximadamente 9. Después de un tiempo de reacción de 45 minutos mezclando continuamente, se separaron los componentes de la reacción sobre columnas de exclusión por tamaño NAP-5 (Amersham Biosciences, Uppsala, Suecia) equilibradas con PBS según el protocolo del fabricante. El tubo de ensayo, la fracción vacía, la fracción MW alta, la fracción MW baja y la columna fueron todos medidos a 60 cm (¹²⁵I) con un detector portátil γ (Mini-instruments Lt., Essex, UK) para calcular el rendimiento del etiquetado. La fracción con un alto peso molecular fue almacenada en un tubo con recubrimiento de silicona para la microcentrífuga a -20°C hasta su uso al día siguiente. El rendimiento obtenido fue del 25-30%.

ES 2 319 426 T3

Yodación indirecta de Z_{taq} mediante radiación

Se mezcló una solución estándar de [^{125}I]-NaI con $10\ \mu\text{l}$ de solución acuosa de 0,1% ácido acético, $5\ \mu\text{l}$ de solución N-succinilmidyl *p*-trimetilestano-benzoato (1 mg/ml en ácido acético en metanol al 5%), y $10\ \mu\text{l}$ de solución acuosa de Cloramina-T (4 mg/ml). La mezcla reactiva fue agitada vigorosamente en un vórtex, e incubada durante 5 minutos a temperatura ambiental con agitación. La reacción fue enfriada con $10\ \mu\text{l}$ de solución acuosa de metabisulfito de sodio (8 mg/ml). Se añadió $21\ \mu\text{l}$ de solución de Z_{taq} en PBS (2,4 mg/ml) a la mezcla reactiva cruda. El pH de la mezcla reactiva fue ajustado a aproximadamente 9 mediante la adición de tampón borato (0,1 M, a pH=9,15). Se incubó la mezcla reactiva a temperatura ambiental durante 30 minutos en agitación, y se separó en una fracción de alto peso molecular (Z_{taq} marcada) y en una fracción de bajo peso molecular utilizando una columna NAP-5 pre-equilibrada con 5% albúmina (bovina, fracción V, Sigma, St. Louis, MO, E.E.U.U.) en PBS, utilizando PBS como disolvente. El rendimiento del químico radioactivo obtenido fue de entre un 75% y un 80%. La radio-actividad específica fue de $100\ \text{kBq}/\mu\text{g}$.

Preparación de los animales

Se utilizaron ratones hembras mestizas BALB/c nu/nu de M&B (de 10 a 12 semanas de edad cuando llegaron) bajo el permiso C181/1. Los ratones fueron aclimatados en las instalaciones para animales del laboratorio Rudbeck, Uppsala, Suecia, utilizando una dieta, un alojamiento y un ambiente estándar durante una semana anterior a la implantación de los xenoinjertos. Los ratones tenían acceso libre a la comida y al agua potable.

Dos meses antes del primer experimento, 33 ratones fueron inyectadas subcutáneamente en la pata trasera derecha con 5×10^6 células de cáncer de ovario humano SKOV-3 (ATCC #HTB-77) de. Este grupo se denomina "Conjunto A".

Tres semanas antes del segundo experimento, 32 ratones fueron inyectados subcutáneamente en ambas patas traseras con 10^7 células SKOV-3 de. Este grupo se denomina "Conjunto B".

Para los estudios por imágenes, se tomaron del Conjunto A los dos ratones con los tumores más grandes (ver a continuación) y todos los demás del Conjunto B.

En el momento de hacer los experimentos, los tumores se habían establecido en todos los ratones, pero eran bastante pequeños y diferían en tamaño y estatus (encapsulado e invasivo, estadio de vascularización). En el momento de uso, todos los ratones pesaban entre 22 y 27 gramos.

Experimento de Biodistribución I

Se dividieron aleatoriamente los 20 ratones del Conjunto A en 5 grupos (I-V) con 4 ratones en cada grupo. Se excluyeron 2 ratones del Conjunto A que tenían los tumores más grandes para su uso en los estudios por imágenes. Los grupos, inyecciones y tiempos de sacrificio se hicieron de acuerdo con el Esquema 1.

Se inyectó en la cola de los ratones por vía intra-venosa $0,5\ \mu\text{g}$ de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, marcada indirectamente con ^{125}I ($100\ \text{kBq}$ por ratón), en $50\ \mu\text{l}$ de PBS. Los ratones del grupo II ("grupo bloqueado") fueron pre-inyectados subcutáneamente con $200\ \mu\text{l}$ de PBS con 0,05 mg de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ sin marcar, 45 minutos antes de la inyección de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ marcado. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

Esquema 1

Grupo	Número de identificaci ón del ratón	Tratamiento adicional	Tiempo de sacrificio después de la inyección (h)
I	1-4	$(Z_{\text{HER-2A}})_2$ sin marcar	1
II	5-8		1
III	9-12		4
IV	13-16		8
V	17-20		24

ES 2 319 426 T3

5 minutos antes del sacrificio, se inyectó a los ratones por vía intra-peritoneal una dosis letal de la solución Kelatar/Rompun (20 $\mu\text{l/g}$ de peso corporal, Kelatar 10 mg/ml (Pfizer, New York, E.E.U.U.), Rompun 1 mg/ml (Bayer, Leverkusen, Alemania)). Se sacó la sangre al momento del sacrificio mediante la punción con una jeringa de 1 ml lavada con heparina diluida (5000 IE/ml, Leo Pharma, Copenhagen, Dinamarca). La sangre, las muestras de orina, el músculo, el hueso, el intestino delgado y grueso, el corazón, la vejiga, el pulmón, el hígado, el bazo, el páncreas, el riñón, el estómago, las glándulas salivares y el tiroides, el cerebro, los tumores y las colas fueron diseccionadas y recogidas en botellas de plástico de 20 ml pesadas anteriormente. En el caso de tumores múltiples en algunos de los ratones del Conjunto B, cada tumor fue recogido en una botella separada. Las muestras de órganos y tejidos fueron pesadas, y su radio-actividad fue medida con un contador γ (contador γ automatizado con un detector NaI(Tl) de 3 pulgadas, 1480 Wallac WIZARD, Wallak OY, Turku, Finlandia).

Experimento de Biodistribución II

Se dividieron aleatoriamente los 24 ratones del Conjunto B en 6 grupos diferentes con 4 ratones en cada grupo. Se seleccionaron 8 ratones del Conjunto B que tenían tumores más grandes para su uso en los estudios por imágenes. Los grupos, inyecciones y tiempos de sacrificio se hicieron de acuerdo con el Esquema 2.

Se inyectó en la cola de los ratones de los grupos I y IV-VI por vía intra venosa 0,5 μg de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, marcado indirectamente con ^{125}I (100 kBq por ratón), en 50 μl de PBS. Se inyectó a los ratones del grupo II la misma cantidad de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ yodado radio-activamente, pero por vía subcutáneo en la cola. A los ratones del grupo III ("grupo control negativo") se inyectó por vía intra-venosa en la cola 1,07 μg de Z_{Taq} marcado indirectamente con ^{125}I (100 kBq por ratón) en 50 μl de PBS. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

Esquema 2

Grupo	Número de identificación del ratón	Tratamiento adicional	Tiempo de sacrificio después de la inyección (h)
I	1-4	$(Z_{\text{HER-2A}})_2$ marcada	4
II	5-8		4
III	9-12		4
IV	13-16		6
V	17-20		10
VI	21-24		15

Se llevó a cabo el sacrificio y la toma de muestras como se ha descrito anteriormente para el Experimento de Biodistribución I. En este segundo experimento, también se recogió el cuerpo y se midió su contenido en radio-actividad. Se pesaron las muestras de órganos y tejidos, y se midió su radio-actividad con un contador γ .

Medida de la radio-actividad

Se utilizó un protocolo estándar para la medición de ^{125}I . Se utilizaron los recuentos por minuto corregidos con el nivel de señal de fondo para la evaluación. Se calculó el valor de absorción del tejido, expresado como %ID/g, porcentaje de dosis inyectado por gramo de tejido, como

$$\%ID / g = \frac{\text{radioactividad de tejido} / \text{radioactividad inyectada}}{\text{peso de tejido}} \times 100$$

ES 2 319 426 T3

Donde para inyecciones intra venosas:

Radioactividad Inyectada = Radioactividad media en jeringas de control

5

– Radioactividad en jeringa usada

– Radioactividad en cola

10 y para inyecciones sub-cutáneas:

Radioactividad Inyectada = Radioactividad media en jeringas de control

15

– Radioactividad en jeringa usada

Estudio por imágenes

20

Para la toma de imágenes, los ratones fueron divididos en dos grupos con 5 ratones en cada uno, teniendo en cuenta que cada grupo constaría de un ratón con un tumor grande del Conjunto A. Los ratones del Conjunto B fueron *aleatorizado*. Se inyectó a los dos grupos de ratones 2,3 μg de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ marcado indirectamente con ^{125}I (2,9 MBq por ratón) en 90 μl de PBS, 6 horas o 8 horas antes de la toma de imágenes, respectivamente. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

25

Se llevó a cabo la toma de imágenes del cuerpo completo de los ratones a las 6 horas y 8 horas post-inyección (p.i.) del radio-conjugado. Se forzó a los ratones a orinar, se les anestesió con una inyección intra-peritoneal de Ketalar/Rompun letal y se les mató por dislocación cervical. Se colocó a los ratones (5 en cada grupo) en una cámara y e.CAM (Siemens, Alemania), y se obtuvieron imágenes de 10 minutos en cada punto del tiempo. Se seleccionaron dos ratones con los tumores más grandes (1 de cada grupo) para una imagen especial en la misma cámara, con una exposición de 20 minutos. Las imágenes fueron obtenidas en una matriz de 256 x 256 bit con baja energía, colimador de alta resolución en una ventana de energía de 35 keV con un tamaño de ventana del 99%. Las imágenes fueron evaluadas con la ayuda del programa de Nuclear Diagnostics (Kent, Reino Unido).

35

Resultados

Experimento de bloqueo

40

El experimento de bloqueo descrito en el Experimento de Biodistribución I se llevó a cabo para establecer si la absorción de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ en los tumores era específico y regulado por el receptor. Antes de la inyección intra venosa principal del dímero radioyodado, se inyectaron sub cutaneamente 0,05 mg de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ en los ratones del grupo II del Esquema 1. Se compararon la absorción de radio-actividad 1 hora después de la inyección en el grupo I con el grupo II. Las relaciones entre el tumor y la sangre para los dos grupos de ratones fue de 0,72 (grupo I, media) y de 0,25 (grupo II, media) (Figura 11). Sin embargo, la diferencia en la absorción no es significativa ($p=0,16$). En todos los órganos, excepto en el tumor, la absorción de radio-actividad fue la misma tanto para animales bloqueados como animales no bloqueados.

45

Esta relación bastante baja entre tumor y sangre en el caso de los ratones no bloqueados puede explicarse por el instante en el tiempo temprano (1 hora post-inyección) escogido para este experimento.

50

Especificidad de absorción

55

En el experimento de Biodistribución II, se inyectó a los ratones del grupo II con una cantidad de Z_{Taq} correspondiente a la cantidad de $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ inyectada en los ratones de los otros grupos. Z_{Taq} había sido marcada con yodo radioactiva utilizando el mismo método indirecto que para $(Z_{\text{HER-2A}})_2$. Z_{Taq} es no-específica con respecto a los receptores de HER-2. Se compararon la absorción de radio-actividad a las 4 horas post-inyección en el grupo I y en el grupo III. Los resultados de este experimento (Figura 12) muestran que la molécula Z_{Taq} no-específica tenía una menor absorción al tumor que la molécula $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ específica. Las relaciones entre el tumor y la sangre en este experimento fueron de 1,43 (grupo I, $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ específica) y 0,15 (grupo III, Z_{Taq} inespecífica). El análisis estadístico mostró que la diferencia era significativa ($p=0,009$). En todos los demás órganos, la absorción de radio-actividad fue del mismo nivel para ambas moléculas Z.

60

En este experimento se observó una relación mayor entre tumor y sangre para $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, en comparación con el experimento de bloqueo. Esto se debió probablemente al instante en el tiempo más tardío (4 horas post-inyección).

65

Biodistribución

Los resultados de los grupos de ratones en los Experimentos de Biodistribución I y II que habían sido inyectados intra-venosa con $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ marcada fueron combinados en un análisis de la biodistribución del yodo radioactivo en los órganos y tejidos de los ratones con tumor. Los resultados se muestran en las Figuras 13 a 16.

Referente a las Figuras 13 y 14, la concentración de ^{125}I en los tumores fue mayor que en la mayoría de los órganos normales, indicando que el polipéptido $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ es capaz de señalar células tumorales con HER-2. Se descubrió que la concentración de radio-actividad en órganos y tejidos normales era menor que en los tumores, con la excepción del riñón (en cualquier instante en el tiempo), tiroides (cualquier instante en el tiempo), e hígado (instantes tempranos en el tiempo). Los experimentos mostraron una rápida eliminación del yodo radioactivo en la sangre y de los órganos normales. La eliminación en los órganos normales siguió principalmente a la eliminación en la sangre, con la excepción de la tiroides, donde se encontró acumulación de yodo radioactivo. La elevada absorción de yodina libre en la tiroides, incluso en métodos de marcado indirecto, es bien conocida y puede, hasta cierto punto, ser evitada mediante yodina “fría”, o no radiactiva (Larsen RH *et al.*, Nucl Med Biol 25:351-357 (1998)). Las altas concentraciones de yodo radioactivo fueron también encontradas en los riñones de los ratones, lo que también se esperaba ya que los riñones son la principal vía de excreción de tales pequeñas moléculas y catabolitos.

Las Figuras 15A y 15B muestran la progresión en el tiempo de la concentración de yodo radioactivo en sangre y en el tumor. Comenzando a las 4 horas post-inyección, la radio-actividad en el tumor era mayor que la radio-actividad en la sangre. Utilizando los datos del experimento como se presentan en la Figura 15A, se calcularon las vidas medias de yodo radioactivo en la sangre y en los tumores utilizando GraphPad Prism[®], v 3.0, de GraphPad Software (San Diego, E.E.U.U.). Se utilizó como modelo la regresión no lineal de decaimiento exponencial de dos fases, y las gráficas resultantes se presentan en la Figura 15B. $T_{1/2\alpha}$ para los tumores fue más corto (0,36 horas) que para la sangre (0,76 horas), pero $T_{1/2\beta}$ fue más largo (87,5 horas para tumores *versus* 4,3 horas para la sangre), lo que está de acuerdo con los resultados obtenidos. Para comparar, el $T_{1/2\alpha}$ del dímero marcado en la sangre, calculado con el mismo modelo utilizando datos de distribución de ratones sin tumor normales, fue de 0,3 horas (datos no mostrados).

La relación de concentración de radio-actividad entre el tumor y la sangre (Figura 16) se incrementó con el tiempo durante al menos 12 horas post-inyección. Esta relación es un buen factor de estimación para el contraste de imagen, porque el fondo principal en la toma de imágenes por radio-actividad viene de la radio-actividad en la sangre. Teniendo en cuenta la relación entre el tumor y la sangre y las concentraciones de radio-actividad en los tumores, se concluyó que 6 horas y 8 horas post-inyección podrían ser los instantes en el tiempo óptimos para las imágenes. Para una imagen con un buen contraste, la proporción de la concentración de radio-actividad entre tumor y no tumor no debería ser menor de 2.

Imágenes gamma

Las imágenes Gamma fueron tomadas de cada uno de los dos grupos de 5 ratones, cada uno de ellos seleccionado por visualización de imágenes (a las 6 horas y a las 8 horas post-inyección, respectivamente). En todos los ratones en ambos instantes en el tiempo, pudieron ser identificados los riñones con estructuras bien definidas. Una estructura adicional (probablemente hígado) es visible sobre los riñones en la imagen de ratones 6 horas post-inyección, así como un fondo elevado de un pool de sangre generalizado. Algunos animales tenían algo de orina en sus vejigas, lo que también es directamente visible. En la imagen con ratones a las 8 horas post-inyección, se puede identificar una estructura adicional en el área del cuello, que con toda probabilidad es la tiroides.

De los 5 animales en cada sesión de imágenes, se denotó un tumor (del lote de inyección de SKOV-3) invasivo. Ninguna otra localización para el tumor fue evidente. Los dos animales en cuestión fueron escogidos para una sesión adicional de imágenes, y el resultado se muestra en la Figura 17.

Sumario

La biodistribución del polipéptido dímero $(Z_{\text{HER-2A}})_2$, indirectamente marcado con yodo radioactivo (^{125}I) mediante un grupo benzoato, en ratones con tumores SKOV-3 (línea celular de cáncer de ovario) se mostró de acuerdo con la biodistribución normal del conjugado en ratones normales. Se consiguió que el tumor absorbiese el yodo radioactivo inyectado como ^{125}I -benzoato- $(Z_{\text{HER-2A}})_2$. La absorción del tumor fue mediada por un receptor y específica, como se muestra con los experimentos de bloqueo utilizando una pre-inyección de una alta concentración de una molécula $(Z_{\text{HER-2A}})_2$ no marcada, y mediante la inyección de una Z_{Taq} , variante Z marcada, no específica. El análisis de los datos obtenidos mostró que la concentración de la radio-actividad en el tumor fue mayor que la concentración de la radio-actividad en sangre después de 4 horas post-inyección, y mayor que en la mayoría de los órganos y tejidos normales después de 6 horas post-inyección, excepto para los riñones y la tiroides. Las imágenes Gamma de ratones con tumores xenoinjertados con SKOV-3 fueron obtenidas a las 6 horas y a las 8 horas post-inyección. Se obtuvo una buena resolución. En ambos instantes en el tiempo, pudieron identificarse claramente tumores invasivos grandes.

Ejemplo 5

Biodistribución y enfoque al tumor con monómeros His₆-Z_{HER-2A} en xenoinjertos de ratones desnudos que padecen SKOV-3

En los experimentos que constituyen este ejemplo, el polipéptido Z_{HER-2A} monomérico según los Ejemplos 1 y 2 fue marcado con ¹²⁵I radioactivo e inyectado en ratones que padecían de un tumor injertado caracterizado por la sobre-expresión de HER-2. Estudios de biodistribución del polipéptido fueron llevados a cabo para estudiar su localización.

Materiales y métodos

Yodación indirecta de Z_{HER-2A} mediante radiación

Para marcar con ¹²⁵I, 40 µl de His-Z_{HER-2A} fueron sometidos al mismo tratamiento que el constructo polipéptido dimérico en el Ejemplo 4.

Preparación de los animales

Se utilizaron ratones hembra BALB/c nu/nu de M&B (de 10 a 12 semanas cuando llegaron) bajo el permiso C66/4. Los ratones fueron aclimatados en las instalaciones para animales del laboratorio Rudbeck, Uppsala, Suecia, utilizando una dieta, un alojamiento y un ambiente estándar durante la semana anterior a que se les implantaran los xenoinjertos. Los ratones tenían acceso libre a comida y agua potable. Tres semanas antes del experimento, 5 x 10⁷ células de cáncer de ovario humano SKOV-3 (ATCC #HTB-77) fueron inyectadas subcutáneamente en la pata trasera derecha de 16 ratones. En el momento de los experimentos, se habían establecido tumores en todos los ratones y todos los ratones pesaban de 22 a 27 gramos.

Medición de la radio-actividad

Se llevó a cabo la medición de ¹²⁵I y se calculó el %ID/g como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Experimento de biodistribución

Se dividieron al azar 16 ratones en 4 grupos (I-IV) con 4 ratones en cada grupo. Los grupos, inyecciones y tiempos de sacrificio se determinaron de acuerdo con el Esquema 3. Se inyectó a los ratones en la col intra-venosamente a 0,5 µg de Z_{HER-2A}, marcado indirectamente con ¹²⁵I (100 kBq por ratón) en 50 µl de PBS. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

Esquema 3

Grupo	ID del ratón	Tiempo de sacrificio post-inyección (h)
I	1-4	1
II	5-8	4
II	9-12	8
IV	13-16	24

Los ratones fueron sacrificados y se tomaron las muestras como se ha descrito en el primer estudio de biodistribución del Ejemplo 4. Se pesaron las muestras de los órganos y tejidos, y se midió su radio-actividad con un contador γ (contador γ automatizado con un detector NaI (T1) de 3 pulgadas, 1480 Wallac WIZARD, Wallak OY, Turku, Finlandia).

Resultados

Se analizaron los resultados de los grupos de ratones que habían sido inyectados sub-cutáneamente con Z_{HER-2A} marcado para establecer la distribución del yodo radioactivo en los órganos y tejidos de los ratones. Los resultados se muestran en las Figuras 18 a 20. En relación a las Figuras 18 y 19, la concentración de ¹²⁵I en los tumores fue mayor que en la mayoría de los órganos normales a las 4 horas y a las 24 horas, indicando que el polipéptido Z_{HER-2A} es capaz de señalar células tumorales con HER-2. La concentración de radio-actividad en los órganos y tejidos normales resultó

ser menor que en los tumores, con la excepción del riñón (en cualquier instante en el tiempo) y tiroides (en cualquier instante en el tiempo). Los experimentos mostraron una rápida eliminación del yodo radioactivo en la sangre y en los órganos normales. La eliminación de los órganos normales siguió principalmente a la eliminación en la sangre, con la excepción de la tiroides, donde se encontró acumulación de yodo radioactivo. También se encontraron altas concentraciones de yodo radioactivo en los riñones de los ratones. La Figura 20 muestra la progresión a lo largo del tiempo de la concentración de yodo radioactivo en la sangre y en el tumor. Comenzando a las 4 horas post-inyección, la radio-actividad en el tumor era seis veces mayor que la radio-actividad en la sangre. La relación entre tumor y sangre de la concentración de radio-actividad (Figura 21) se incrementó a lo largo del tiempo durante por lo menos 8 horas post-inyección, momento en el que fue de 10 a 1.

Sumario

La biodistribución del polipéptido monómero Z_{HER-2A} , marcado indirectamente con yodo radioactivo (^{125}I) mediante un grupo benzoato, en ratones con tumores SKOV-3 (línea celular de cáncer de ovario) se mostró de acuerdo con la distribución normal del conjugado en ratones normales. Se consiguió la absorción del tumor del yodo radioactivo inyectado como ^{125}I -benzoato- Z_{HER-2A} . El análisis de los datos obtenidos mostró que la concentración de radio-actividad en el tumor era mayor que la concentración de radio-actividad en sangre después de 4 horas post-inyección, y en contraste con la forma dimérica de $(Z_{HER-2A})_2$, también mayor que en la mayoría de los órganos y tejidos normales después de 4 horas post-inyección, excepto para los riñones y la tiroides.

Ejemplo 6

Biodistribución y enfoque al tumor con $ABD(Z_{HER-2A})_2$ en xenoinjertos de ratones desnudos que padecen SKOV-3

En los experimentos que constituyen este ejemplo, un polipéptido (Z_{HER-2A}) dimérico según el Ejemplo 3 fue genéticamente fusionado en su extremo N-terminal con un "Dominio de Unión a la Albúmina" (ABD) de la proteína G del estreptococo, para formar un polipéptido denominado $ABD(Z_{HER-2A})_2$ (Figura 22). ABD se une a la seroalbúmina humana y del ratón con una alta afinidad (M Johansson *et al.*, J Biol Chem 277:8114-8120 (2002)). La albúmina es una proteína abundante en la sangre con una eliminación lenta del plasma. La unión a la albúmina con una alta afinidad debería conferir al ligando una cinética lenta similar a la de la proteína albúmina misma. Alargando el tiempo de circulación de un ligando que marca el tumor en un animal, debería, en teoría, potenciar la dosis enviada al tumor. Para probar esto, se marcó el polipéptido $ABD(Z_{HER-2A})_2$ con ^{125}I radioactivo y esto se inyectó en ratones con injerto de tumor caracterizado por la sobre-expresión de HER-2. Los estudios de biodistribución del polipéptido fueron llevados a cabo para estudiar su localización.

Materiales y métodos

Construcción del ADN y producción de proteínas

La selección de un ligando affibody novedoso, denominado His_6-Z_{HER-2A} y con afinidad por el receptor HER-2, se ha descrito anteriormente en los Ejemplos 1 y 2. Una variante Z_{HER-2A} dimérica, construida mediante subclonación del segmento específico genético que codifica el polipéptido Z_{HER-2A} en el vector de expresión para HIS_6-Z_{HER-2A} , fue descrita en el Ejemplo 3. Se construyó una proteína de fusión ABD de esta variante Z_{HER-2A} dimérica mediante subclonación del segmento específico genético que codifica el polipéptido ABD en el vector de expresión para HIS_6-Z_{HER-2A} , sustituyendo el marcador hexahistidina con el polipéptido ABD. Se verificó el segmento específico ABD introducido mediante secuenciación del ADN en un secuenciador de ADN ABI Prism[®]3700 Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA). La cepa RR1ΔM15 de *Escherichia Coli* (Rüther, Nucleic Acids Res 10:5765-5772 (1982)) fue utilizada como huésped bacteriano durante el procedimiento de clonación. El vector resultante codifica, bajo control del promotor T7 (Sturdier *et al.*, Meth Enzymol 185:60-89 (1990)), una variante Z_{HER-2} dimérica fusionada con ABD, $ABD(Z_{HER-2A})_2$, fusionada con un residuo de cisteína C-terminal, que permite situar modificaciones químicas específicas (Figura 22). La variante Z_{HER-2} dimérica fue expresada como una fusión con ABD en la cepa BL21 de *E. Coli* (DE3), y fue recuperado mediante purificación por cromatografía de afinidad sobre una columna de afinidad de Sefarosa albúmina preparada según el protocolo del fabricante (Amersham Biosciences). Se calculó la concentración de proteína a partir de las mediciones de absorbancia a 280 nm, utilizando el apropiado coeficiente de extinción. La proteína purificada fue posteriormente analizada mediante SDS-PAGE en un gel homogéneo de Tris-Glicina al 16%, utilizando un sistema Novex (Novex, CA, E.E.U.U.). Las bandas de proteína fueron visualizadas con tinción Azul Brillante Coomassie. Tras el análisis SDS-PAGE, se observó la proteína como una banda específica del peso molecular esperado.

Yodación indirecta de $ABD(Z_{HER-2A})_2$ mediante radiación

Para marcar con ^{125}I , 40 μ l de $ABD-(Z_{HER-2A})_2$ fueron sometidos al mismo tratamiento que el constructo polipéptido dimérico en el Ejemplo 4.

ES 2 319 426 T3

Preparación de los animales

Se utilizaron ratones hembra BALB/c nu/nu de M&B (de 10 a 12 semanas de edad cuando llegaron) bajo el permiso C66/4. Los ratones fueron aclimatados en las instalaciones para animales del laboratorio Rudbeck, Uppsala, Suecia, utilizando una dieta, un alojamiento y un ambiente estándar durante la semana anterior a que se les implantaran los xenoinjertos. Los ratones tenían acceso libre a comida y agua potable. Tres semanas antes del experimento, 16 ratones fueron inyectadas subcutáneamente con 5×10^7 células de cáncer de ovario humano SKOV-3 (ATCC #HTB-77) en la pata trasera derecha. En el momento de los experimentos, se habían establecido tumores en todos los ratones y todos los ratones pesaban de 22 a 27 gramos.

Medición de la radio-actividad

Se llevó a cabo la medición de ^{125}I y se calculó el %ID/g como se ha descrito en el Ejemplo 4.

Experimento de biodistribución

Se dividieron al azar 16 ratones en 4 grupos (I-IV) con 4 ratones en cada grupo. Los grupos, inyecciones y tiempos de sacrificio fueron de acuerdo al Esquema 4. Se inyectó intra venosamente a los ratones en la cola $0,5 \mu\text{g}$ de ABD ($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$, marcado indirectamente con ^{125}I (100 kBq por ratón) en $50 \mu\text{l}$ de PBS. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

Esquema 4

Grupo	ID del ratón	Tiempo de sacrificio post-inyección (h)
I	1-4	12
II	5-8	24
II	9-12	48
IV	13-16	72

Los ratones fueron sacrificados y se tomaron las muestras como se ha descrito en el primero estudio de biodistribución del Ejemplo 4. Se pesaron las muestras de órganos y tejidos, y se midió su radio-actividad con un contador y (contador y automatizado con un detector Nal(Tl) de 3 pulgadas, 1480 Wallac WIZARD, Wallac OY, Turku, Finlandia).

Resultados

Los resultados se muestran en las Figuras 23 y 24. En relación a la Figura 23, la concentración de ^{125}I en los tumores fue mayor que en la mayoría de los órganos normales a las 12 horas (tumor $2,4\% \text{ID/g}$) y 24 horas (tumor $2,2\% \text{ID/g}$), indicando que el polipéptido ABD($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ es capaz de señalar células tumorales con HER-2. La concentración de radio-actividad en órganos y tejidos normales resultó ser menor que en los tumores, con la excepción del riñón (en cualquier instante en el tiempo, a las 24 horas $3,5\% \text{ID/g}$), tiroides (en cualquier instante en el tiempo, a las 24 horas $5,2\% \text{ID/g}$) y la sangre (en cualquier instante en el tiempo, a las 24 horas $3,9\% \text{ID/g}$). Los valores en los pulmones son más o menos equivalentes a los valores del tumor, lo que puede ser debido al alto contenido de sangre en los pulmones. Los experimentos mostraron una eliminación muy lenta del yodo radioactivo en la sangre. Esto era de esperar, ya que la fracción de ABD($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ se une con alta afinidad a la seroalbúmina, una proteína abundante en la sangre y con una cinética baja. La eliminación en los órganos normales fue más rápida que la eliminación en la sangre, con la excepción de la tiroides, donde se encontró acumulación de yodo radioactivo. También se encontraron altas concentraciones de yodo radioactivo en los riñones de los ratones. La Figura 24 muestra la progresión en el tiempo de la concentración de yodo radioactivo asociada con ABD($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ en el tumor, en comparación con los resultados generados para los constructos monomérico y dimérico de $\text{Z}_{\text{HER-2A}}$ en los Ejemplos 4 y 5. A las 24 horas post-inyección, la radio-actividad del tumor utilizando ABD($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ era trece veces mayor que para el monómero o el dímero, indicando que alargando el tiempo de residencia de la fracción de señalización en el cuerpo podía efectivamente ser utilizado para incrementar la dosis en el tumor. Los datos también sostienen que la fracción ($\text{Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ puede ser acoplada funcionalmente al dominio de unión a la albúmina.

Sumario

La biodistribución del polipéptido de fusión ABD($Z_{\text{HER-2A}}$)₂, marcado indirectamente con yodo radioactivo (¹²⁵I) mediante un grupo benzoato, en ratones con tumores SKOV-3 (línea celular de cáncer de ovario) se mostró de acuerdo con las propiedades esperadas de un polipéptido de unión a la albúmina. Se consiguió la absorción del tumor del yodo radioactivo inyectado como ¹²⁵I-ABD($Z_{\text{HER-2A}}$)₂, y la dosis en el tumor fue mayor que para la versión monomérica o dimérica del polipéptido $Z_{\text{HER-2A}}$. El análisis de los datos obtenidos mostró que la concentración de radio-actividad en el tumor era mayor que la concentración de radio-actividad en la mayoría de los demás órganos después de 12 horas post-inyección, aunque el nivel de radio-actividad en los pulmones, los riñones, el tiroides y la sangre se mantuvo alto.

*Ejemplo 7**Biodistribución del dímero ^{99m}Tc-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂ marcado con tecnecio*

En los experimentos que constituyen este ejemplo, el polipéptido His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂ dimérico según el Ejemplo 3 fue marcado con el núclido ^{99m}Tc de diagnóstico por imágenes e inyectado en ratones normales y en ratones que padecían de un tumor injertado caracterizado por la sobre-expresión de HER-2. El ^{99m}Tc (tecnecio) es un radionucleótido con propiedades cercanas al ideal para diagnóstico *in vivo*. Además, es barato y fácilmente disponible, siendo un buen candidato para la obtención de imágenes médicas en la clínica práctica. Los estudios de biodistribución del polipéptido fueron llevados a cabo para estudiar su localización.

*Materiales y métodos**Marcado con Tecnecio de His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂*

Se marcó el polipéptido His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂ según las instrucciones del fabricante utilizando el kit IsoLink™ (Mallinckrodt, Países Bajos) comercialmente disponible, que dirige el núclido ^{99m}Tc al marcador hexahistidina en la proteína His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂. Los reactivos del kit IsoLink™ generan un catión tecnecio, [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺, que entonces puede ser coordinado establemente por el marcador hexahistidina, proporcionando medios para marcar específicamente el marcador His₆ del polipéptido His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂.

Brevemente, se incubaron 0,5-0,6 ml de solución madre de ^{99m}Tc del generador en el Hospital Universitario de Uppsala eluido con el contenido del agente marcador Carbonil del IsoLink™ (DRN4335, Mallinckrodt) durante 20 minutos a 100°C en baño de agua. Se mezclaron 40 μl del catión tecnecio así obtenido, [^{99m}Tc(CO)₃(H₂O)₃]⁺, con 40 μl de His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂ en PBS (1,2 mg/ml) y se incubaron durante 1 hora a 50°C. Se purificó el producto por separación sobre una columna de exclusión por tamaño NAP-5 con un corte de 5 kD (Pharmacia, Uppsala). La pureza del producto fue del 97%, según la cromatografía en capa fina instantánea.

Preparación de los animales

Se utilizaron ratones hembra BALB/c nu/nu de M&B (de 10 a 12 semanas de edad cuando llegaron) bajo el permiso C66/4. Los ratones fueron aclimatados en las instalaciones para animales del laboratorio Rudbeck, Uppsala, Suecia, utilizando una dieta, un alojamiento y un ambiente estándar durante la semana anterior a que se les implantaran los xenoinjertos. Los ratones tenían acceso libre a comida y agua potable. Tres semanas antes del experimento, 4 ratones fueron inyectadas subcutáneamente con 5 x 10⁷ células de cáncer de ovario humano SKOV-3 (ATCC #HTB-77) en la pata trasera derecha. En el momento de los experimentos, se habían establecido tumores en todos los ratones y todos los ratones pesaban de 22 a 27 gramos.

Medición de la radio-actividad

Se llevó a cabo la medición de ^{99m}Tc y se calculó el %ID/g como se ha descrito para ¹²⁵I en el Ejemplo 4.

Experimento de biodistribución

Para el experimento se utilizó un grupo de ratones con 4 animales. Los grupos, inyecciones y tiempos de sacrificio se hicieron de acuerdo al Esquema 5. Se inyectó a 0,5 μg de His₆-($Z_{\text{HER-2A}}$)₂, marcado con ^{99m}Tc (100 kBq por ratón) en 50 μl de PBS intra venosamente en la cola de los ratones. Todas las inyecciones fueron bien toleradas, a juzgar por la ausencia de cualquier problema visible.

ES 2 319 426 T3

Esquema 5

Grupo	ID del ratón	Tiempo de sacrificio post-inyección (h)
I	1-4	8

Los ratones fueron sacrificados y se tomaron las muestras como se ha descrito en el primer estudio de biodistribución del Ejemplo 4. Se pesaron las muestras de los órganos y tejidos, y se midió su radio-actividad con un contador γ (contador γ automatizado con un detector Nal(Tl) de 3 pulgadas, 1480 Wallac WIZARD, Wallak OY, Turku, Finlandia).

Resultados

El conjugado $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ tenía una alta estabilidad *in vitro* (confrontación con PBS, plasma, cisteína y exceso de histidina libre). Los resultados de los experimentos de la biodistribución *in vivo* de $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ se muestran desde la Figura 25 a la 27. En relación a la Figura 25, la dosis total en el tumor fue tres veces mayor utilizando $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ (3,3%ID/g a las 8 horas p.i.) en comparación con la concentración del constructo monomérico marcado con I, $^{125}\text{I}-\text{benzoato}-\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}}$ (1,1%ID/g a las 8 horas post-inyección), o el constructo dimérico, $^{125}\text{I}-\text{benzoato}-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ (1,06%ID/g a las 8 horas p.i.). Es conocido que el ^{99m}Tc es un mejor agente de permanencia que el ^{125}I , lo que implica que la dosis enviada se mantiene, mientras que las dosis de yodina se metabolizan y se liberan de las células tumorales. En relación a la Figura 26, la concentración de ^{99m}Tc en los tumores era mayor que en la mayoría de los órganos normales a las 8 horas post-inyección (tumor 3,3%ID/g), indicando que el polipéptido $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ es capaz de señalar células tumorales con HER-2. La concentración de radio-actividad en los órganos y tejidos normales resultó ser menor que en los tumores, con la excepción del riñón (a las 8 horas 27%ID/g, 36 x la dosis del tumor) y el hígado (a las 8 horas 11,4%ID/g, 3 x la dosis del tumor) (Figura 27). Los altos valores en el riñón eran esperados, ya que el $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ se elimina a través de los riñones. El alto nivel de marcador en los riñones no presenta problemas de toxicidad, ya que la dosis total inyectada será muy baja para propósitos de diagnóstico. La cantidad de radio-actividad en la tiroides no fue en absoluto tan alta como cuando se utilizó ^{125}I (Ejemplo 4), como se esperaba (a las 8 horas 1%ID/g). La eliminación en los órganos normales siguió principalmente a la eliminación en la sangre, con la excepción de los riñones, donde se observó la acumulación de ^{99m}Tc con un pico después de una hora. Los niveles decrecieron después, con una fase de eliminación rápida durante una hora (hasta 2 horas post-inyección) seguida de una fase de eliminación lenta, con una dosis sustancial (70%ID/g) todavía en el riñón después de 24 horas.

La relación entre el tumor y la sangre para el conjugado de tecnecio a las 8 horas post-inyección fue de 4, con una dosis total en el tumor de 3,3%ID/g. Esto indicaba que el ^{99m}Tc podría ser utilizado para aplicaciones de diagnóstico *in vivo*. Para comparar, en el mismo instante en el tiempo, las dosis de $^{125}\text{I}-\text{benzoato}-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ y $^{125}\text{I}-\text{benzoato}-\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}}$ en el tumor fueron de aproximadamente un 1%, pero la relación entre el tumor y la sangre fue de aproximadamente 11.

Sumario

La biodistribución del polipéptido marcado con ^{99m}Tc , $^{99m}\text{Tc}-\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$, en ratones con tumores SKOV-3 (línea celular de cáncer de ovario) mostraron propiedades de distribución relativamente buenas para propósitos de toma de imágenes médicas. Se consiguió la absorción en el tumor y la dosis en el tumor fue mas alta que para las versiones monomérica o dimérica del polipéptido $\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}}$ marcadas con ^{125}I . El análisis de los datos obtenidos mostró que la concentración de radio-actividad en el tumor era más alta que la concentración de radio-actividad en la mayoría del resto de los órganos y el sangre después de las 8 horas post-inyección, aunque el hígado y el riñón tenían una absorción sustancialmente mayor que el tumor.

Ejemplo 8

Marcado y caracterización *in vitro* utilizando ^{211}At

En los experimentos que constituyen este ejemplo, el polipéptido dimérico $\text{His}_6-(\text{Z}_{\text{HER}-2\text{A}})_2$ según el Ejemplo 3 fue marcado con el radio núcleo terapéutico ^{211}At (Astatina (^{211}At), utilizando la misma química descrita anteriormente para el marcado con ^{125}I . Un objetivo para el enfoque al tumor con radionúclidos es la terapia de radiación. Esto requiere núclidos que emitan partículas de alta energía, como partículas α y partículas β de alta energía, que puedan erradicar la célula señalizada. El radiohalógeno ^{211}At , emisor de partículas α ($T_{1/2}=7,2$ horas), tiene una variedad de sólo unos pocos diámetros celulares, lo que significa que la erradicación celular puede darse con gran precisión. Se llevaron a cabo estudios de la capacidad aniquiladora de células *in vitro* del polipéptido marcado con ^{211}At .

Materiales y métodos

Dos días por adelantado, 100.000 células SKBR-3, caracterizadas por la sobre-expresión de HER-2, fueron sembradas en placas de 3 cm. Se marcaron 60 μg de polipéptido $\text{His}_6\text{-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ con ^{211}At producida en el ciclotrón Scanditronix MC32 del Hospital Universitario de Copenhague y se purificaron en el laboratorio de Jörgen Carlsson, Universidad de Uppsala, Suecia. Se añadieron a cada una de las tres placas una relación molar aproximada de 1:1 y 5:1 moléculas de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ por receptor celular. Se suministró a tres placas adicionales una concentración 5:1 de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ pero también 500 veces mayor $\text{His}_6\text{-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ sin marcar para bloquear los sitios de unión y así estimar los efectos de la irradiación inespecífica. Las células fueron incubadas con $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ durante 24 horas a 37°C. Después de 24 horas de incubación, se lavaron todas las células y se les suministró un nuevo medio fresco. Después se monitorizó su crecimiento una vez por semana durante aproximadamente dos meses.

Paralelamente, se suministró a un conjunto de placas preparadas de la misma manera que las utilizadas en el ensayo de aniquilación celular descrito anteriormente, las mismas soluciones de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$. Estas células se cosecharon en diferentes instantes en el tiempo, se contó el número de células y se midió el contenido radiactivo, para establecer curvas de absorción para todos los grupos de placas. Estas curvas se utilizaron para calcular la cantidad de desintegraciones por célula durante el período de 24 horas utilizado en el experimento de aniquilación celular.

Resultados

Células de la línea celular SKBR-3 de cáncer de mama humano, que sobre-expresan HER-2, fueron expuestas a dos dosis diferentes de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ durante 24 horas. En la primera dosis, las moléculas de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ añadidas igualaron el número de receptores diana de HER-2 en las células. En la segunda dosis, se añadieron moléculas marcadas con ^{211}At en una cantidad 5 veces mayor. Después de 24 horas de incubación, las células fueron monitorizadas y contadas una vez a la semana durante dos meses, y se determinó la fracción de supervivientes. Como se ve en la Figura 28, la respuesta se relaciona con la dosis suministrada. Las células que habían recibido una cantidad equimolar de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ no mostraban ningún retraso específico en su crecimiento en comparación con el control donde la radio-actividad había sido añadida sin un agente señalizador. Hubo un pequeño retraso en el crecimiento debido a daños por radiación inespecífica, pero las células no dejaron de crecer. Al contraste, cuando se añadió una cantidad cinco veces mayor de $^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$, la inhibición del crecimiento celular fue impresionante. Al final del experimento, el grupo que había recibido la dosis alta no se había recuperado todavía, mientras que el grupo con una dosis baja y el grupo control se habían multiplicado por 10^6 . Asumiendo que las células supervivientes conservan aproximadamente la misma tasa de crecimiento después de la irradiación que antes, todas las células en el grupo 5:1 fueron erradicadas. La curva de absorción también reveló que el grupo bloqueado 5:1 había recibido una irradiación sustancial asociada a las células, probablemente debido a un bloqueo insuficiente. Se estimó el número de desintegraciones por célula (DPC) a partir de las curvas de absorción integradas. A partir de la curva de crecimiento, se calcularon los tiempos de duplicación como la pendiente de la curva de crecimiento exponencial, y la fracción superviviente fue calculada por extrapolación del crecimiento retrasado remontándose al tiempo de exposición. Los resultados se muestran en la Tabla 1.

TABLA 1

	Tiempo de duplicación (días)	DPC	Supervivencia
Control	2,5	-	100%
Bloque	2,6	12	7,0%
1:1	2,5	37	3,4%
5:1	-	98	-

Sumario

$^{211}\text{At-(Z}_{\text{HER-2A}}\text{)}_2$ mostró unión específica a células SKBR-3 que sobre-expresan HER-2 *in vitro*. La muerte celular inducida correlacionó bien con la dosis acumulada. Menos de 100 desintegraciones por célula resultaron ser suficientes para causar la muerte de células individuales y para conseguir la total erradicación celular.

Ejemplo 9

Identificación y caracterización de polipéptidos de unión a HER-2 adicionales

5 Para incrementar la afinidad de las variantes de Z de unión a HER-2 obtenidas a partir de la selección descrita en el Ejemplo 1, se aplicó una estrategia de maduración de la afinidad que implica la construcción de una segunda biblioteca (Gunneriusson *et al.*, Protein Eng 12:873-878 (1999); Nord *et al.*, Eur J Biochem 268:4269-77 (2001)), seguida de una reelección contra HER-2. Una alineación de la primera generación de las variantes Z_{HER-2A,B,CyD} del polipéptido mostró que, aparte de las identidades en las posiciones, 13, 14, 28, 32 y 35, entre Z_{HER-2A} y Z_{HER-2B}, hay una convergencia de R y K en la posición 10 y de Q y T en la posición 11. De esta manera, la biblioteca de segunda generación contenía cinco posiciones fijas 13, 14, 28, 32 y 35 y dos posiciones parcialmente fijas, la posición 10 (cgc/aaa como codones degenerados) y la posición 11 (caa/acc como codones degenerados), mientras que las restantes posiciones 9, 17, 18, 24, 25 y 27 fueron nuevamente aleatoriamente escogidas utilizando codones degenerados NNG/T. Después de la transformación, se obtuvo una biblioteca de 3 x 10⁸ clones. Se sometieron las moléculas de unión al antígeno a cinco rondas de selección, utilizando concentraciones decrecientes de un dominio extracelular biotinizado de HER-2 humana (HER-2-ECD) como diana (dominio extracelular biotinizado de HER-2 humana recombinante, aminoácidos 238-2109, proporcionado por el Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, E.E.U.U.).

20 Se recogieron 80 y 260 clones de colonias obtenidos a partir de las rondas cuarta y quinta, respectivamente, para llevar a cabo un análisis de su actividad de unión a HER-2.

ABAS ELISA para el análisis de la unión a HER-2

25 Se produjeron los clones escogidos aleatoriamente a partir de las rondas cuarta y quinta de la selección en placas de 96 pocillos (Nunc.). Se utilizó un procedimiento de detección ELISA, denominado ABAS ELISA, para identificar variantes de Z de unión de alta afinidad a HER-2. Se inocularon colonias individuales en 1 ml de medio TBS-YE (30,0 g de Tryptic Soy Broth (Merck) y 5,0 g de extracto de levadura (Merck), y agua hasta un volumen final de 1 l) suplementado con 1 mM de IPTG y 100 µg/ml de ampicilina en placas de 96 pocillos hondos tipo y se hicieron crecer en agitación durante toda la noche a 37°C. Se obtuvo el pellet de las células por centrifugación a 3000 g durante 10 minutos. Los pellet se resuspendieron en 300 µl de PBS-T y se congelaron al menos durante 30 minutos a -80°C. Se descongelaron las placas en agua tibia y se centrifugaron a 3500 g durante 20 minutos. Se cargaron 100 µl del sobrenadante en pocillos de microtitulación (#9018 Costar®) que habían sido incubados con 6 µg/ml de seroalbúmina humana (HSA) en 15 mM de Na₂CO₃ y 35 mM de NaHCO₃ (a pH=9,6) durante toda la noche a 4°C y bloqueados con 2% leche desnatada en polvo en PBS-T durante 1 hora a temperatura ambiental. Se lavaron las placas cuatro veces, antes de añadir a cada pocillo 100 µl de HER-2 biotinizada 1 µg/ml y se incubaron durante 1,5 horas. Después de lavar los pocillos cuatro veces, se añadieron 100 µl de Streptavidin-HPR (1:5000) (#P0397 Dako) a cada pocillo y se incubaron durante 1 hora. Se lavaron los pocillos cuatro veces y después del lavado final, se añadieron 100 µl de solución de desarrollo (ImmunoPure) TMB (#34021 Pierce) a cada pocillo. Después de 20-30 minutos, se añadieron 40 100 µl de solución de detección (2 M H₂SO₄) a cada pocillo. Se midió la absorbancia a 450 nm en un lector ELISA (Tecan). Los resultados del ABAS ELISA se presentan en la Figura 29. Los ejes X de los diagramas de las Figuras 29A y 29B corresponden a la numeración del pocillos de la placa de 96 pocillos en cuestión-de esta manera, la Figura 29A muestra los resultados del ELISA para una primera placa de 96 pocillos, mientras que la Figura 29B muestra los resultados para una segunda placa.

45

Análisis de la secuencia del ADN

La secuenciación del ADN que codifica las variantes de Z_{HER-2} analizadas en el ABAS ELISA fue llevada a cabo con un Kit ABI PRISM® dGTP, BigDye™ Terminator v3.0 Ready Reaction Cycle Sequencing (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante, utilizando el oligonucleótido biotinizado AFFI-72 (5'-biotin-CGGAACCA-GAGCCACCAC-CGG). Se analizaron las secuencias en un analizador ABI PRISM®3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems). El análisis de la secuencia dio como resultado 130 secuencias únicas. Las secuencias originadas a partir de las variantes de Z_{HER-2} que mostraron unión en el experimento ABAS ELISA, como se fue evidente por un valor de absorbancia al menos dos veces mayor que el valor del control negativo, se presentan en la Figura 1 y se identifican en el listado de secuencias como SEC ID NO:6-76. La nomenclatura de estas variantes de Z que se unen a HER-2 es lo siguiente. Las variantes aisladas a partir de la primera placa del experimento ELISA (Figura 29A) se denominan Z_{HER-2:1NN}, donde NN corresponde al número del pocillo en la primera placa en la que fue analizada esa variante concreta del polipéptido. Las variantes aisladas a partir de la segunda placa del experimento ELISA (Figura 29B) se denominan Z_{HER-2:2NN}, donde NN corresponde al número del pocillo en la segunda placa en la que fue analizada esa variante concreta del polipéptido.

60

Clonación y producción de proteínas

65

Los polipéptidos de unión a HER-2 seleccionados se expresaron en células *E. coli* utilizando un vector de expresión que codifica constructos que han sido esquemáticamente ilustrados en la Figura 30. Los polipéptidos fueron producidos como combinaciones con un marcador hexahistidil N-terminal. Los polipéptidos marcados con His₆ Z_{HER-2:101},

ES 2 319 426 T3

$Z_{HER-2.107}$, $Z_{HER-2.149}$, $Z_{HER-2.202}$, $Z_{HER-2.205}$, $Z_{HER-2.207}$, $Z_{HER-2.209}$, $Z_{HER-2.222}$, $Z_{HER-2.225}$ y $Z_{HER-2.229}$, así como Z_{HER-2A} fueron purificados utilizando un equipo BioRobot 3000 (Qiagen) y el procedimiento NI-NTA Superflow 96 BioRobot en condiciones de desnaturalización. Se dializaron las proteínas marcadas con His₆ purificadas en PBS (2,68 mM de KCl, 137 mM de NaCl, 1,47 mM de KH₂PO₄, 8,1 mM de Na₂HPO₄, a pH=7,4). La concentración de proteína en las muestras fue calculada a partir del valor de absorción medido a 280 nm y a partir del coeficiente de extinción teórico de la respectiva proteína.

Análisis mediante biosensor de las variantes de Z_{HER-2} marcadas con His₆

Las interacciones entre las variantes de Z_{HER-2} marcadas con His₆ producidas según la sección anterior y la HER-2 fueron analizadas utilizando la resonancia del plasmón superficial en un sistema Biacore®2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). La HER-2 humana y la IgG (Inmunoglobulina G) fueron inmovilizadas en diferentes células de flujo mediante acoplamiento sobre aminas sobre la capa de dextran carboxilado en superficies de chips CM-5, según las recomendaciones del fabricante. La inmovilización de HER-2 humana e IgG dio como resultado 4600 y 5100 unidades de resonancia (RU), respectivamente. Una tercera superficie de una célula de flujo fue activada y desactivada para su uso como blanco durante las inyecciones. Los polipéptidos de fusión $Z_{HER-2.101}$, $Z_{HER-2.107}$, $Z_{HER-2.149}$, $Z_{HER-2.202}$, $Z_{HER-2.205}$, $Z_{HER-2.207}$, $Z_{HER-2.209}$, $Z_{HER-2.222}$, $Z_{HER-2.225}$ y $Z_{HER-2.229}$ fueron diluidos en 1 x HBS-EP (5 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, P-20 surfactante al 0,005%, a pH=7,4) hasta una concentración final de 50 nM, e inyectados a una velocidad de flujo constante de 10 μ l/minuto. El tiempo total de inyección fue de 2 minutos (asociación) seguido de un lavado durante 3 minutos (disociación). Las superficies fueron regeneradas con dos inyecciones de 25 mM de HCl (30 segundos/ inyección). Las respuestas medidas en las células de referencia (superficie activada/desactivada) fueron sustraídas de la respuesta medida en las células con HER-2 inmovilizada. Se confirmó la capacidad de las proteínas purificadas para interactuar con HER-2, como se muestra en los sensogramas de la Figura 31.

Ejemplo 10

Identificación y caracterización de polipéptidos de unión a HER-2 adicionales

Se llevó a cabo un análisis completo de secuencia de los clones obtenidos después de la tercera y cuarta rondas de la selección descrita en el Ejemplo 1. Se secuenció el ADN utilizando el equipo ABI PRISM®, BigDye™ Terminator v2.0 Ready Reaction Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante y un analizador ABI PRISM®3100 Genetic Analyser (Applied Biosystems) según las recomendaciones del fabricante. Se utilizó como cebador el oligonucleótido biotinizado AFFI-72 (5' -biotin-CGGAACCAGAGCCACCACCGG). El análisis de la secuencia reveló 11 nuevas secuencias de polipéptido, es decir, clones que no habían sido encontrados en el estudio descrito en el Ejemplo 1.

Se decidió expresar estas variantes de Z en células de *E. coli*, utilizando un vector de expresión que codifica constructos que son esquemáticamente ilustrados en la Figura 30. Los polipéptidos fueron producidos de esta manera como fusiones con un marcador hexahistidil N-terminal. Se purificaron los polipéptidos mediante Cromatografía de Afinidad por ión Metálico Inmovilizado (IMAC) utilizando un BioRobot 3000 (Qiagen) y el procedimiento NI-NTA Superflow 96 BioRobot bajo condiciones de desnaturalización. Las proteínas eluidas fueron analizadas utilizando SDS-PAGE. Los tampones de proteínas marcadas con His₆ purificadas fueron cambiados por 5 mM de NH₄Ac utilizando columnas PD-10 (Amersham Biosciences) según las recomendaciones del fabricante. Después, las proteínas fueron liofilizadas y disueltas en HBS-EP (5 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, P-20 surfactante al 0,005%, a pH=7,4). Las concentraciones de proteína de las muestras fueron calculadas a partir de los valores de absorción medidos a 280 nm y a partir del coeficiente de extinción teórico de la respectiva proteína.

Análisis mediante biosensor de las variantes de Z_{HER-2} marcadas con His₆

La actividad de unión entre las variantes de Z_{HER-2} marcadas con His₆ y la HER-2 fue analizada utilizando un equipo Biacore®2000 (Biacore AB, Uppsala, Suecia). Se inmovilizaron HER-2 humana y HIV-1 gp 120 (Protein Sciences Corporation, #2003-MN) en diferentes células de flujo mediante acoplamiento sobre aminas sobre la capa de dextran carboxilado en superficies de chips CM-5, según las recomendaciones del fabricante. La inmovilización de HER-2 humana y HIV-1 gp 120 dio como resultado 2631 y 3138 unidades de resonancia (RU), respectivamente. Una tercera superficie de una célula de flujo fue activada y desactivada para su uso como blanco durante las inyecciones. Se diluyeron las variantes de Z_{HER-2} en 1 x HBS-EP (5 mM de HEPES, 150 mM de NaCl, 3,4 mM de EDTA, P-20 surfactante al 0,005%, a pH=7,4) hasta una concentración final de 1 μ M, y se inyectaron a una velocidad de flujo constante de 10 μ l/minuto. El tiempo total de inyección fue de 1 minuto (asociación) seguido de un lavado durante 3 minutos (disociación). Las superficies se regeneraron con una inyección de 10 mM de HCl durante 30 segundos. Las respuestas medidas en células de referencia (superficie activada/desactivada) fueron sustraídas de la respuesta medida en las células con HER-2 inmovilizada. Tres de las proteínas purificadas, $Z_{HER-2.3053}$, $Z_{HER-2.0434}$ y $Z_{HER-2.0024+}$, se unieron específicamente a HER-2 como se ilustra mediante los sensogramas de la Figura 32. Las secuencias de estas variantes de Z_{HER-2} se presentan en la Figura 1, y se identifican en el listado de secuencias como SEC ID NO:77-79.

Referencias citadas en la descripción

Esta lista de referencias citadas por el solicitante es solamente para conveniencia del lector. La misma no forma parte del documento de patente europea. A pesar de que se ha tenido mucho cuidado durante la recopilación de las referencias, no deben excluirse errores u omisiones y a este respecto la OEP se exime de toda responsabilidad.

Documentos de patente citados en la descripción

WO 9519374 A [0002] WO 0208263 A [0002]

WO 0063243 A [0002] WO 9101743 A [0029]

Literatura (no patentes) citada en la descripción

- NILSSON B *et al. Protein Engineering*, 1987, vol. 1, 107-133 [0002]
- NORD K *et al. Prot Eng*, 1995, vol. 8, 601-608 [0002]
- NORD K *et al. Nature Biotechnology*, 1997, vol. 15, 772-777 [0002]
- HYNES NE *et al. Biochim Biophys Acta*, 1994, vol. 1198, 165-184 [0003]
- SHIS C *et al. Nature*, 1981, vol. 290, 261-264 [0003]
- SUNDARESAN *et al. Curr Oncol Rep*, 1999, vol. 1, 16-22 [0004]
- SLIWKOWSKI MX *et al. Semin Oncol*, 1999, vol. 26 (12), 60-70 [0006]
- GREENLEE R *et al. CA Cancer J Clin*, 2001, vol. 51, 15-36 [0007]
- SLAMON DJ *et al. Science*, 1989, vol. 244, 707-712 [0007]
- SJOGREN S *et al. J Clin Oncol*, 1998, vol. 16 (2), 462-469 [0007]
- PIETRAS RJ *et al. Oncogene*, 1994, vol. 9, 1829-1838 [0059]
- REILLY RM *et al. Clin Pharmacokinet*, 1995, vol. 28, 126-142 [0011]
- CARTER P. *Nat Rev Cancer*, 2001, vol. 1, 118-129 [0012]
- GOLDENBERG DM. *J Nucl Med*, 2002, vol. 43, 693-713 [0012]
- REICHERT JM. *Curr Opin Mol Ther*, 2002, vol. 4, 110-118 [0012]
- SCHNEIDER JW *et al. Semin Oncol*, 2002, vol. 29 (11), 22-28 [0012]
- NYGREN P-A *et al. Mol Recogn*, 1988, vol. 1, 69-74 [0029]
- WELLS JA *et al. Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, vol. 93, 5688-5692 [0050]
- BASELGA J *et al. Cancer Res*, 1998, vol. 58, 2825-2831 [0059]
- PEGRAM MD *et al. Proc Am Assoc Cancer Res*, 1997, vol. 38, 602 [0061]
- ORLOVA *et al. Nucl Med Biol*, 2000, vol. 27, 827-835 [0083]
- RÜTHER. *Nucleic Acids Res*, 1982, vol. 10, 5765-5772 [0086] [0128]
- GUNNERIUSSON E *et al. Protein Eng*, 1999, vol. 12, 873-878 [0090]
- KOZIOROWSKI *et al. Appl Radiat Isot*, 1998, vol. 49, 955-959 [0092]
- LARSEN RH *et al. Nucl Med Biol*, 1998, vol. 25, 351-357 [0113]
- M JOHANSSON *et al. J Biol Chem*, 2002, vol. 277, 8114-8120 [0127]
- STURDIER *et al. Met Enzymol*, 1990, vol. 185, 60-89 [0128]
- GUNNERIUSSON *et al. Protein Eng*, 1999, vol. 12, 873-878 [0151]
- NORD *et al. Eur J Biochem*, 2001, vol. 268, 4269-77 [0151]

REIVINDICACIONES

- 5 1. Polipéptido, que tiene afinidad de unión por HER-2 de manera que el valor K_D de la interacción es como máximo de 1×10^{-6} M y que está relacionado con un dominio de la proteína A del estafilococo (SPA), en el que la secuencia del polipéptido se corresponde con la secuencia de la proteína Z de la SPA, según se establece en la SEC ID NO:1, que consta de entre 3 a 20 mutaciones por sustitución, constandingo el polipéptido de por lo menos tres de las siguientes mutaciones por sustitución:
- 10 (a) de fenilalanina a tirosina en la posición 13,
(b) de tirosina a triptófano en la posición 14,
(c) de glutamina a arginina en la posición 32 y
15 (d) de lisina a tirosina en la posición 35.
2. Polipéptido según la reivindicación 1, que tiene una afinidad de unión por HER-2 de manera que el valor K_D de la interacción es como máximo de 1×10^{-7} M.
- 20 3. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 2, que consta de entre 4 a 20 mutaciones por sustitución.
4. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, que consta de todas las mutaciones por sustitución (a)-(d).
- 25 5. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, que consta de una mutación por sustitución en la posición 28.
6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, que además consta de mutaciones por sustitución en una o más de las posiciones 9, 10, 11, 17, 18, 24, 25 y 27.
- 30 7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, que consta de una mutación por sustitución en la posición 28 de asparagina a un residuo aminoácido seleccionado entre arginina e histidina.
- 35 8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, que consta de una mutación por sustitución en la posición 28 de asparagina a arginina.
9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que consta de una mutación por sustitución en la posición 10 de glutamina a arginina.
- 40 10. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, que consta de una mutación por sustitución en la posición 11 de asparagina a treonina.
11. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, que consta de una mutación por sustitución en la posición 17 de leucina a valina.
- 45 12. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, que consta de una mutación por sustitución en la posición 27 de arginina a un residuo aminoácido seleccionado entre lisina y serina.
13. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, cuya secuencia de aminoácidos corresponde con la de la SEC ID NO:1, y que consta por lo menos de las siguientes mutaciones: F13Y, Y14W, N28R, Q32R y K35Y.
- 50 14. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, cuya secuencia de aminoácidos es como se presenta en cualquiera de las secuencias SEC ID NO:2-4 y 6-79.
- 55 15. Polipéptido según la reivindicación 14, cuya secuencia de aminoácidos es como se presenta en cualquiera de las secuencias SEC ID NO:2-3.
16. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que por lo menos uno de los residuos de asparagina presentes en el dominio de la proteína A del estafilococo (SPA) con la que dicho polipéptido está relacionado ha sido reemplazado con otro residuo aminoácido.
- 60 17. Polipéptido según la reivindicación 16, en el que la secuencia de dicho dominio de la proteína A del estafilococo (SPA) corresponde con la secuencia de la proteína Z de la SPA según se establece en la SEC ID NO:1, y el polipéptido abarcando las mutaciones por sustitución en por lo menos una de las posiciones escogidas de entre N3, N6, N11, N21, N23, N28, N43 y N52.
- 65

ES 2 319 426 T3

18. Polipéptido según la reivindicación 17, que consta de por lo menos una de las siguientes mutaciones: N3A, N6A, N6D, N11S, N23T, N28A y N43E.
- 5 19. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta de residuos aminoácidos adicionales en cualquier extremo terminal.
20. Polipéptido según la reivindicación 19, en el que el residuo aminoácido adicional abarca un residuo de cisteína en el extremo N-terminal o en el extremo C-terminal del polipéptido.
- 10 21. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en el que los residuos aminoácidos adicionales abarcan un marcador, preferentemente escogido de entre un marcador de hexahistidina, un marcador myc y un marcador flag.
- 15 22. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en el que los residuos aminoácidos adicionales abarcan por lo menos un dominio funcional del polipéptido, de manera que el polipéptido es un polipéptido de fusión de un primer segmento específico, que consiste en el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones de 1 a 18, y por lo menos un segundo y opcionalmente otro segmento específico o segmentos específicos.
- 20 23. Polipéptido según la reivindicación 22, en el que el segundo segmento específico consiste en uno o más polipéptido(s) según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, haciendo el polipéptido un multímero de los polipéptidos de unión a HER-2 según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18, cuyas secuencias pueden ser las mismas o diferentes.
- 25 24. Polipéptido según la reivindicación 22, en el que el segundo segmento específico abarca por lo menos un dominio del polipéptido capaz de unirse a una molécula diana aparte de HER-2.
- 26 25. Polipéptido según la reivindicación 24, en el que el segundo segmento específico abarca por lo menos un dominio del polipéptido capaz de unirse a la suero-albúmina humana.
- 30 26. Polipéptido según la reivindicación 25, en el que por lo menos un dominio del polipéptido capaz de unirse a la seroalbúmina humana es el dominio de unión a la albúmina de la proteína G del estreptococo.
- 35 27. Polipéptido según la reivindicación 24, en el que el segundo segmento específico abarca un polipéptido que está relacionado con un dominio de la proteína A del estafilococo (SPA) en que la secuencia del polipéptido corresponde con la secuencia del dominio de la SPA teniendo entre 1 a 20 mutaciones por sustitución.
- 40 28. Polipéptido según la reivindicación 27, en el que la secuencia del polipéptido del segundo segmento específico corresponde con la secuencia de la proteína Z de la SPA, según se establece en la SEC ID NO:1, teniendo entre 1 a 20 mutaciones por sustitución.
- 45 29. Polipéptido según la reivindicación 22, en el que el segundo segmento específico es capaz de actividad enzimática.
30. Polipéptido según la reivindicación 22, en el que el segundo segmento específico es capaz de actividad fluorescente.
- 50 31. Polipéptido según la reivindicación 22, en el que el segundo segmento específico es una proteína de recubrimiento de fagos o un segmento específico del la misma.
32. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que consta de un grupo marcador.
- 55 33. Polipéptido según la reivindicación 32, en el que el grupo marcador se elige entre los marcadores fluorescentes, biotina y marcadores radioactivos.
34. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones anteriores, acoplado a una sustancia con una actividad contra las células que sobre-expresan HER-2.
- 60 35. Polipéptido según la reivindicación 34, en el que dicha sustancia con actividad contra las células que sobre-expresan HER-2 se elige entre agentes citotóxicos, agentes radiactivos, encimas para aplicaciones ADEPT, citoquinas y factores pro-coagulantes.
- 65 36. Molécula de ácido nucleico que consta de una secuencia que codifica un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 31.
37. Vector de expresión que consta de la molécula de ácido nucleico según la reivindicación 36.
38. Célula huésped que consta del vector de expresión según la reivindicación 37.
39. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 para su uso como medicamento.

ES 2 319 426 T3

40. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 en la preparación de un medicamento para el tratamiento de por lo menos una forma de cáncer **caracterizada** por la sobre-expresión de HER-2.

5 41. Uso según la reivindicación 40, en el que dicho polipéptido está conjugado con una sustancia con actividad anti-cancerígena.

42. Uso de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 para la detección *in vitro* de HER-2 en una muestra.

10 43. Método de detección *in vitro* de HER-2 en una muestra, en el que se utiliza un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35.

15 44. Método según la reivindicación 43, que abarca los pasos: (i) disposición de una muestra para ser sometida a ensayo, (ii) aplicación de un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 a la muestra en condiciones tales que se facilite la unión del polipéptido a cualquier HER-2 presente en la muestra, (iii) eliminación del polipéptido no unido, y (iv) detección del polipéptido unido.

20 45. Método según la reivindicación 44, en el que la muestra es una muestra de fluido biológico, preferentemente una muestra de plasma sanguíneo humano.

46. Método según la reivindicación 44, en el que la muestra es una muestra de tejido, preferentemente una muestra de tejido humano, más preferentemente una muestra de biopsia de un ser humano que padece cáncer.

25 47. Kit de diagnóstico de sobre-expresión de HER-2 en una muestra de tejido, kit que abarca un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 fusionado con una enzima corresponsal, reactivos para la detección de la actividad de dicha enzima corresponsal, y porta objetos con tejido de control positivo y negativo.

30 48. Kit de diagnóstico *in vivo* de sobre-expresión de HER-2, kit que abarca un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 marcado con un quelador, un isótopo radiactivo para el diagnóstico, y reactivos para el análisis de la eficiencia de incorporación.

35 49. Kit para llevar a cabo un método de dirigir una sustancia que tiene actividad anti-cancerosa a células que sobre-expresan HER-2 *in vivo*, método que abarca la administración de un conjugado de dicha sustancia y un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 a un sujeto, kit que abarca un polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 35 marcado con un quelador, un isótopo radiactivo terapéutico, y reactivos para el análisis de la eficiencia de incorporación.

40

45

50

55

60

65

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID NO:
Z _{wt}	VDNKFNKEQQ NAFYEIILHLP NLNEEQRNAF IQSLKDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	1
Z _{HER2 A}	VDNKFNKELR QAYWEIQALP NLNWTQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	2
Z _{HER2 B}	VDNKFNKEPK TAYWEIVKLP NLNPEQRRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	3
Z _{HER2 C}	VDNKFNKEPK EAYWEIQRLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	4*
Z _{HER2 D}	VDNKFNKEMV QAGSEIYNLP NLNRAQMAF IRSLSDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	5
Z _{HER2:101}	VDNKFNKEMR HAYWEIVKLP NLNPRQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	6
Z _{HER2:102}	VDNKFNKEMR KAYWEIVLLP NLNRRQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	7
Z _{HER2:103}	VDNKFNKEMR HAYWEIATLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	8
Z _{HER2:104}	VDNKFNKEFR TAYWEIVLLP NLNPGQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	9
Z _{HER2:105}	VDNKFNKELR TAYWEIVLLP NLNWTQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	10
Z _{HER2:106}	VDNKFNKEPK KAYWEIATLP NLNPAQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	11
Z _{HER2:107}	VDNKFNKEMR NAYWEIATLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	12
Z _{HER2:108}	VDNKFNKELR TAYWEIVGLP NLNHFQVRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	13
Z _{HER2:109}	VDNKFNKELR TAYWEIVLLP NLNMQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	14
Z _{HER2:110}	VDNKFNKELR TAYWEIATLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	15
Z _{HER2:112}	VDNKFNKEFR KAYWEIVLLP NLNMQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	16
Z _{HER2:113}	VDNKFNKEFR TAYWEIVLLP NLNMQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	17
Z _{HER2:114}	VDNKFNKEMR TAYWEIATLP NLNMQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	18
Z _{HER2:115}	VDNKFNKEFR NAYWEIVLLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	19
Z _{HER2:116}	VDNKFNKEFR NAYWEIAKLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	20
Z _{HER2:118}	VDNKFNKEFR QAYWEIATLP NLNHSQTRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	21
Z _{HER2:120}	VDNKFNKEPK HAYWEIVKLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	22
Z _{HER2:121}	VDNKFNKELR TAYWEIVGLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	23
Z _{HER2:122}	VDNKFNKELR TAYWEIAGLP NLNPKQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	24
Z _{HER2:123}	VDNKFNKEMR KAYWEITQLP NLNTRQTRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	25
Z _{HER2:124}	VDNKFNKEFR KAYWEIVLLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	26
Z _{HER2:125}	VDNKFNKEFR KAYWEITQLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	27
Z _{HER2:126}	VDNKFNKEMR HAYWEIATLP NLNMQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	28
Z _{HER2:127}	VDNKFNKEMR NAYWEIVGLP NLNMQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	29

FIGURA 1

* sólo con fines ilustrativos

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID NO:
Z _{HER2} :129	VDNKFNKELR NAYWEIVKLP NLNFWQHRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	30
Z _{HER2} :130	VDNKFNKEFR TAYWEIVKLP NLNVRQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	31
Z _{HER2} :133	VDNKFNKENR TAYWEIVKLP NLNDYQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	32
Z _{HER2} :135	VDNKFNKEFR TAYWEITQLP NLNRLQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	33
Z _{HER2} :137	VDNKFNKEIR TAYWEIAGLP NLNAQQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	34
Z _{HER2} :138	VDNKFNKEMR QAYWEIVRLL NLNADQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	35
Z _{HER2} :139	VDNKFNKEMR NAYWEIVTLP NLNKTQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	36
Z _{HER2} :140	VDNKFNKEMR QAYWEIVKLP NLNPGQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	37
Z _{HER2} :148	VDNKFNKEMR TAYWEIALLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	38
Z _{HER2} :153	VDNKFNKEFR KAYWEIALLP NLNMQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	39
Z _{HER2} :158	VDNKFNKEMR KAYWEIALLP NLNMQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	40
Z _{HER2} :159	VDNKFNKEMR QAYWEIVLLE NLNFWQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	41
Z _{HER2} :162	VDNKFNKELR KAYWEIVGLP NLNREQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	42
Z _{HER2} :165	VDNKFNKEMR TAYWEIVGLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	43
Z _{HER2} :167	VDNKFNKELR TAYWEIVRLL NLNMQTRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	44
Z _{HER2} :168	VDNKFNKEFR HAYWEIVRLL NLNMQHRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	45
Z _{HER2} :169	VDNKFNKELR KAYWEIVTLP NLNPSQHRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	46
Z _{HER2} :170	VDNKFNKEMR TAYWEIAKLP NLNPPQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	47
Z _{HER2} :171	VDNKFNKELR TAYWEIVTLP NLNPSQTRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	48
Z _{HER2} :172	VDNKFNKELR KAYWEIQVLE NLNVRQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	49
Z _{HER2} :177	VDNKFNKEPR QAYWEIVLLE NLNRFQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	50
Z _{HER2} :178	VDNKFNKEMR NAYWEIVGLP NLNQGQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	51
Z _{HER2} :179	VDNKFNKEPR QAYWEIVKLP NLNNSQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	52
Z _{HER2} :180	VDNKFNKENR TAYWEIVRLL NLNFWQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	53
Z _{HER2} :205	VDNKFNKEMR NAYWEIVLLE NLNFWQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	54
Z _{HER2} :207	VDNKFNKEMR TAYWEIVLLE NLNFWQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	55
Z _{HER2} :209	VDNKFNKEMR NAYWEIALLP NLNVAQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	56
Z _{HER2} :222	VDNKFNKEFR QAYWEIVKLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	57
Z _{HER2} :223	VDNKFNKEMR TAYWEIVKLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	58
Z _{HER2} :225	VDNKFNKELR TAYWEIVSLP NLNMQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	59
Z _{HER2} :226	VDNKFNKEMR NAYWEIVKLP NLNMQSRF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQPK	60

FIGURA 1

Polipéptido	Secuencia de aminoácidos	SEC ID NO:
Z _{HER2} :227	VDNKFNKEMR QAYWEIALLP NLNKGQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	61
Z _{HER2} :229	VDNKFNKEMR TAYWEIAVLP NLNMQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	62
Z _{HER2} :230	VDNKFNKEMR TAYWEIVKLP NLNNAQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	63
Z _{HER2} :232	VDNKFNKEMR TAYWEIVVLP NLNSKQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	64
Z _{HER2} :233	VDNKFNKEMR NAYWEIVTLP NLNKGQIRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	65
Z _{HER2} :234	VDNKFNKEMR KAYWEIATLP NLNKSQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	66
Z _{HER2} :235	VDNKFNKEMR TAYWEIVTLP NLNVGQTRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	67
Z _{HER2} :236	VDNKFNKELR TAYWEIVGLP NLNTRQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	68
Z _{HER2} :237	VDNKFNKELR HAYWEIVQLP NLNREQGRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	69
Z _{HER2} :239	VDNKFNKEMR HAYWEIKLP NLNGKQHRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	70
Z _{HER2} :240	VDNKFNKEMR TAYWEIVSLP NLNTLQSRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	71
Z _{HER2} :261	VDNKFNKEMR KAYWEIQGLP NLNNRQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	72
Z _{HER2} :264	VDNKFNKEMR NAYWEIAKLP NLNREQKRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	73
Z _{HER2} :265	VDNKFNKEMR HAYWEIVGLP NLNMIQRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	74
Z _{HER2} :271	VDNKFNKELR NAYWEIVKLP NLNRAQNRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	75
Z _{HER2} :278	VDNKFNKELR TAYWEIIKLP NLNNYQRRAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	76
Z _{HER2} :0024*	VDNKFNKEMR EAYWEIQRLP NLNKKQKTAFA IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	77
Z _{HER2} :0434	VDNKFNKEMY AAYWEIIDLP NLNTPQIHAF IRSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	78
Z _{HER2} :3053	VDNKFNKETR SAYWEIVNLP NLNQGRHAF IKSLYDDPSQ SANLLAEAKK LNDQAQAPK	79

FIGURA 1

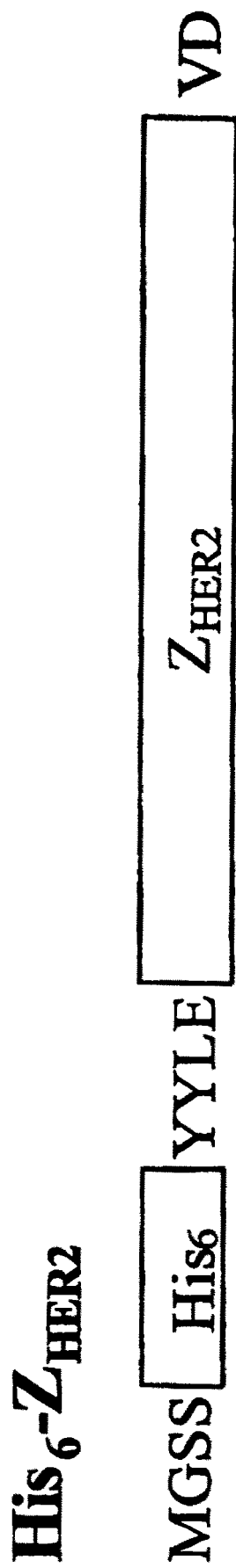


FIGURA 2

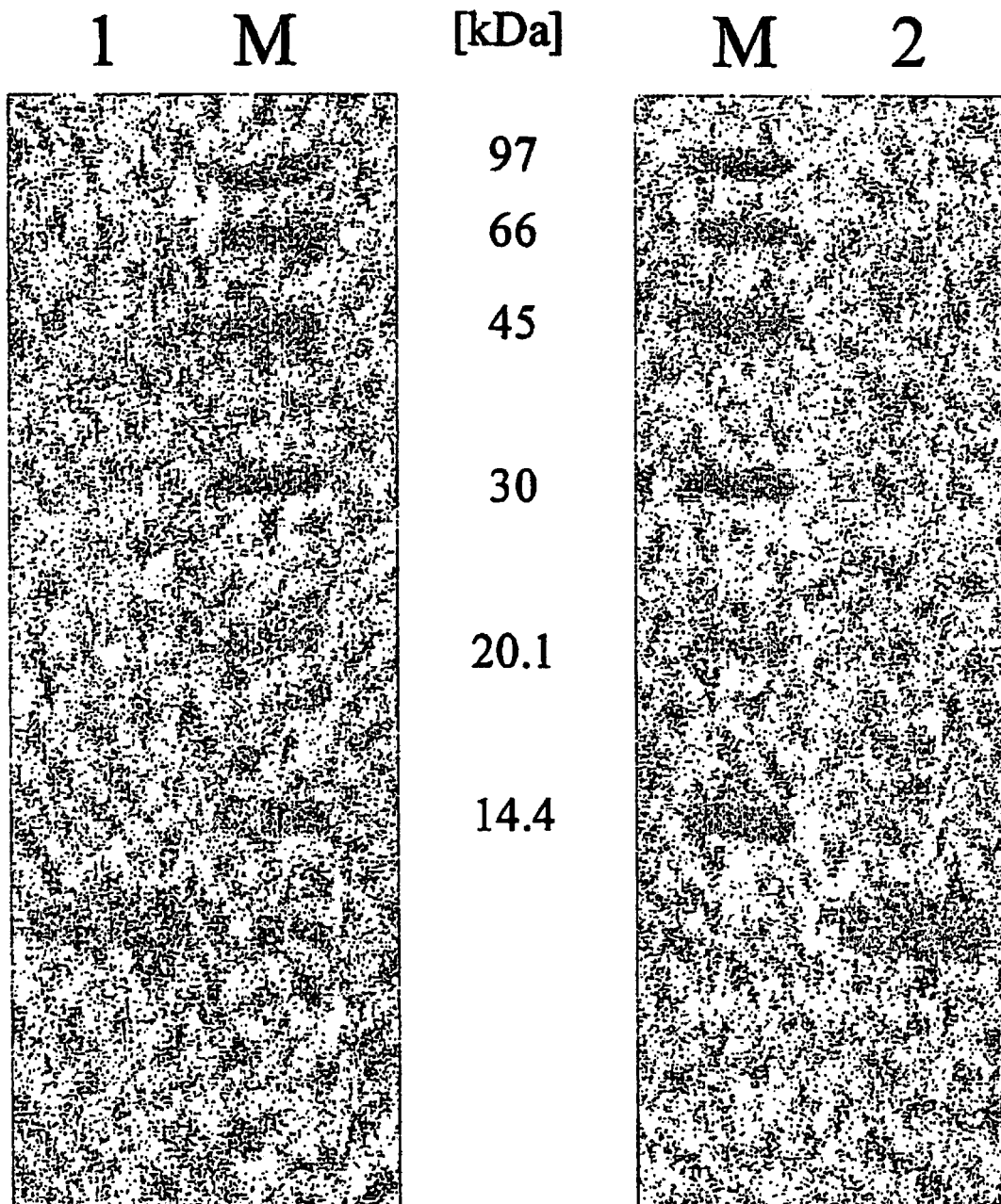


FIGURA 3

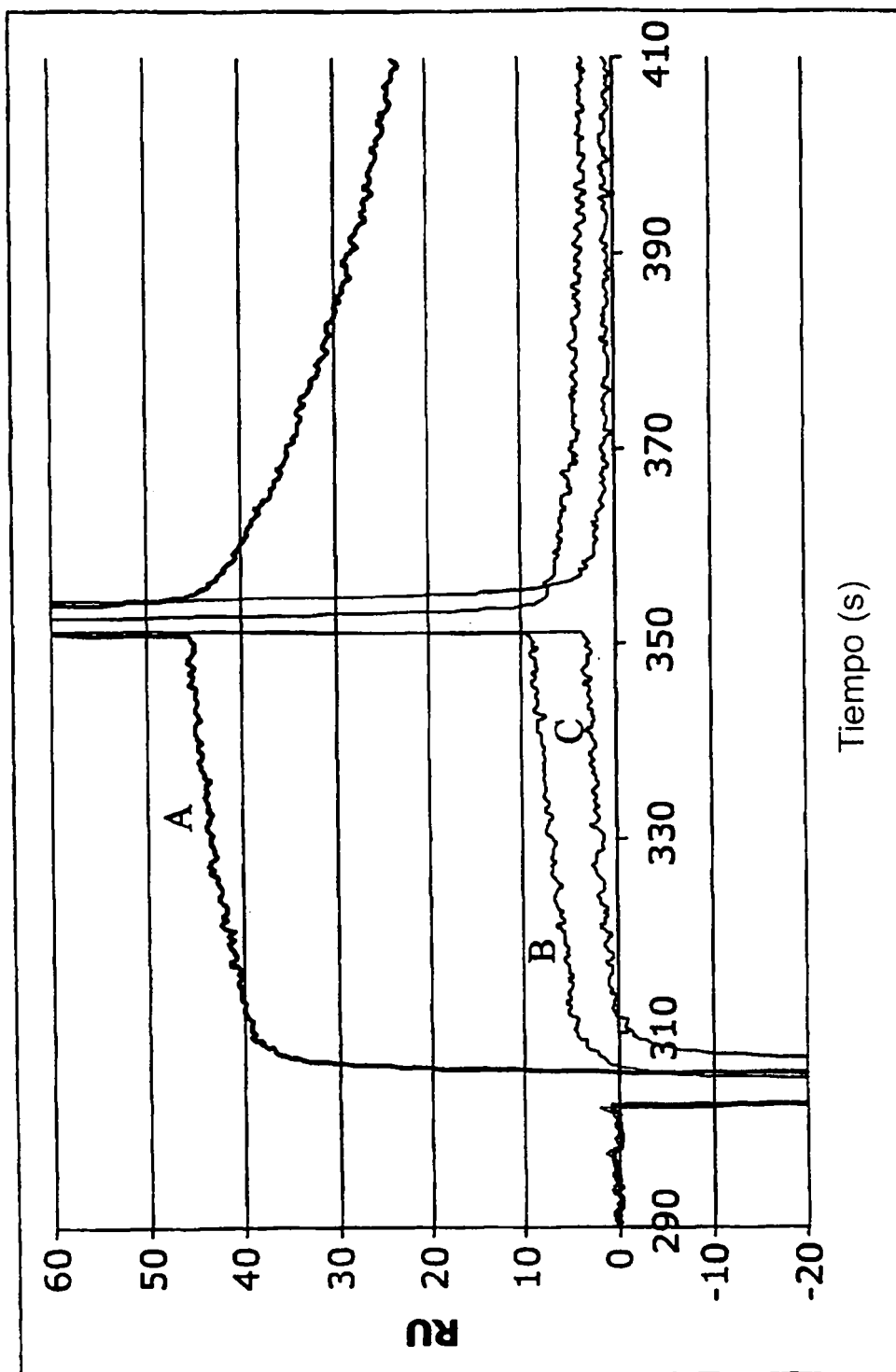


FIGURA 4

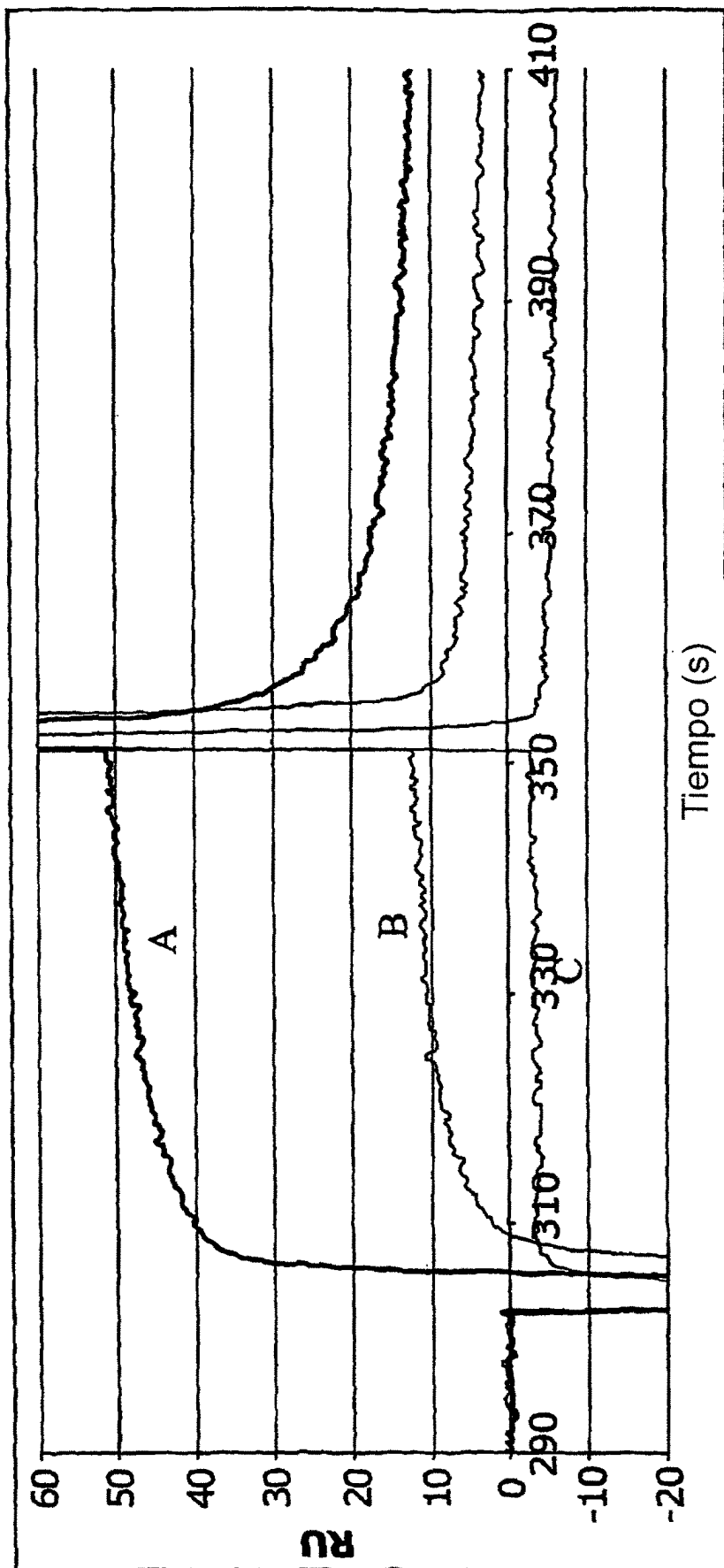


FIGURA 5

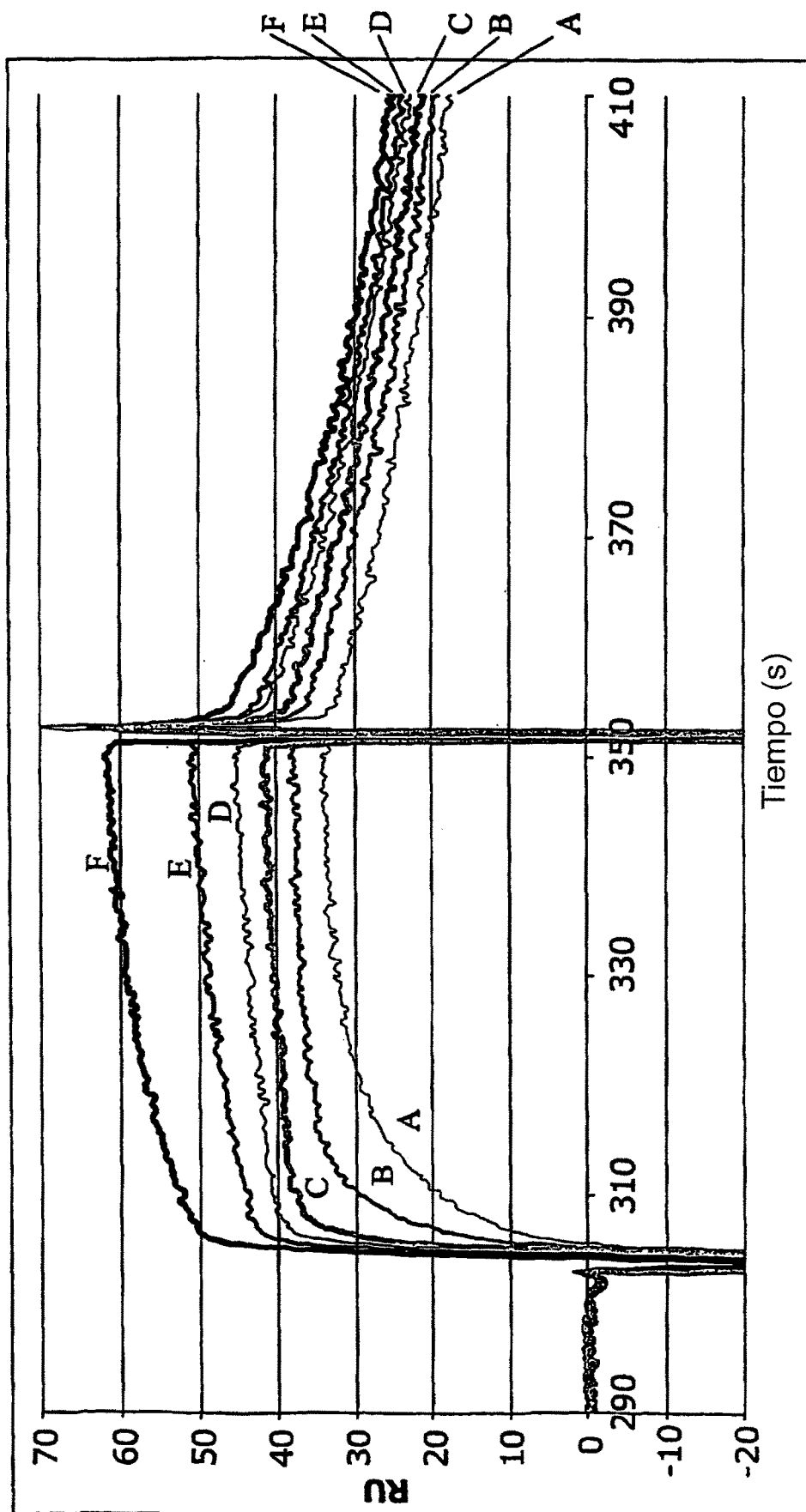


FIGURA 6

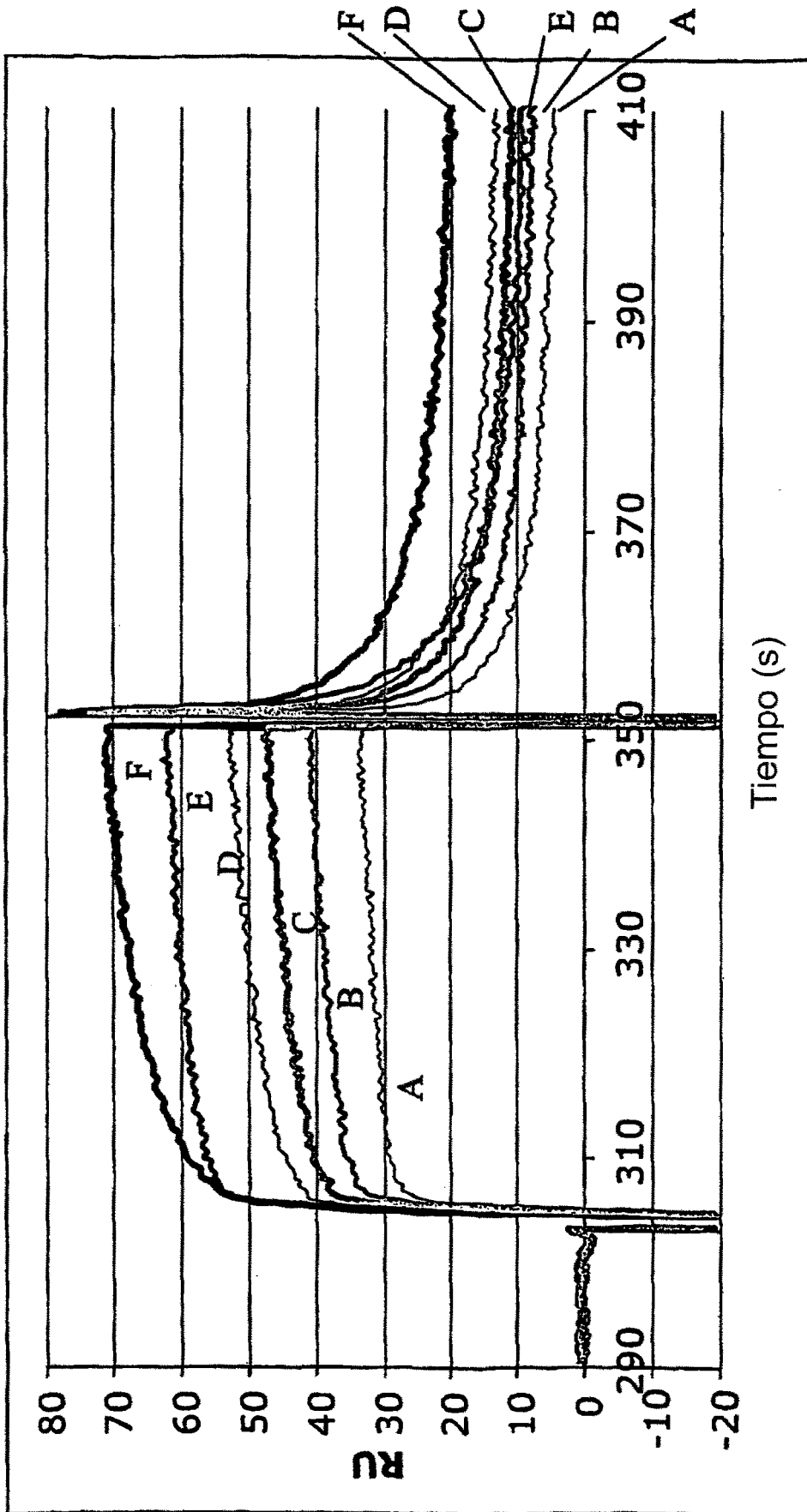


FIGURA 7

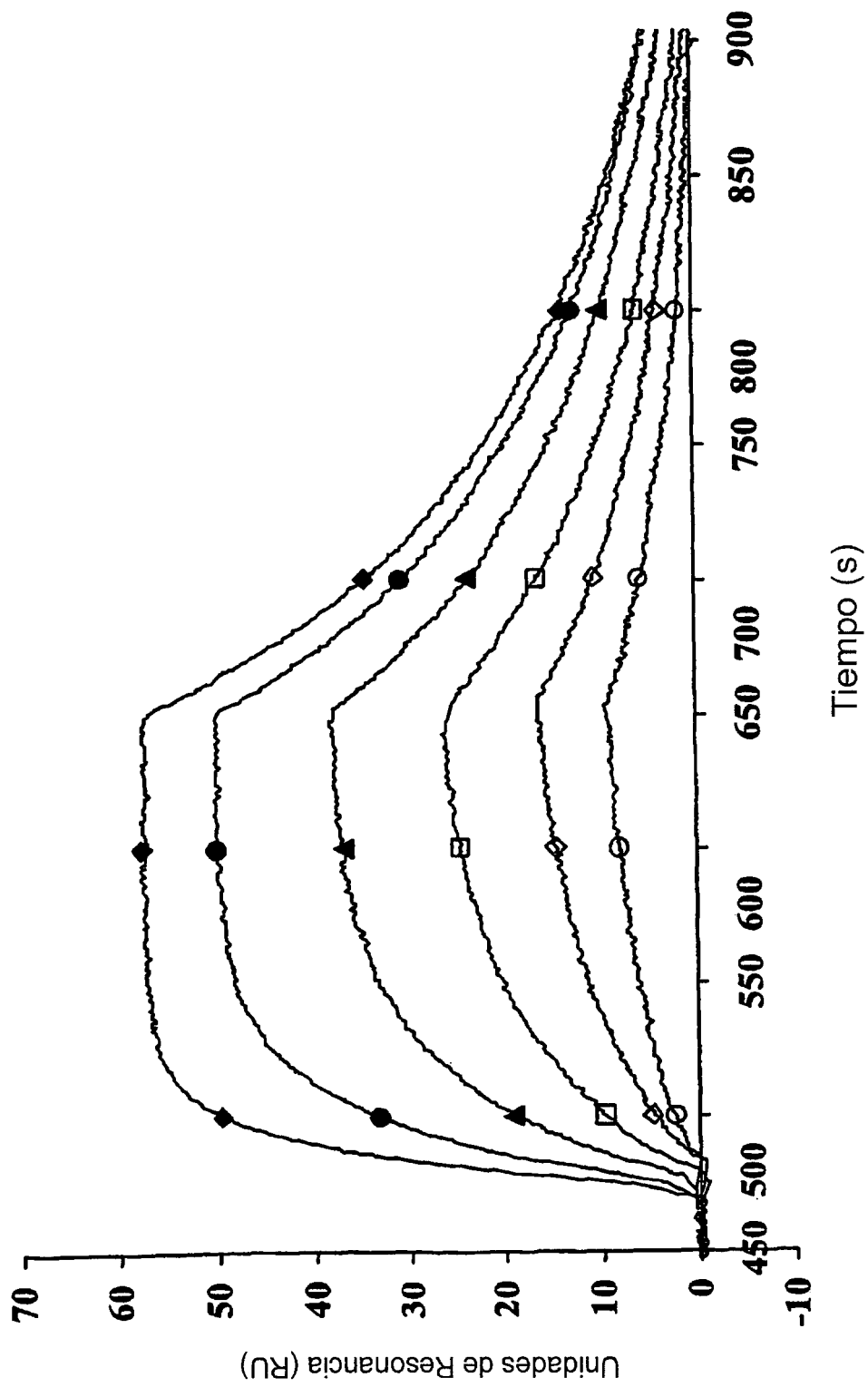


FIGURA 8A

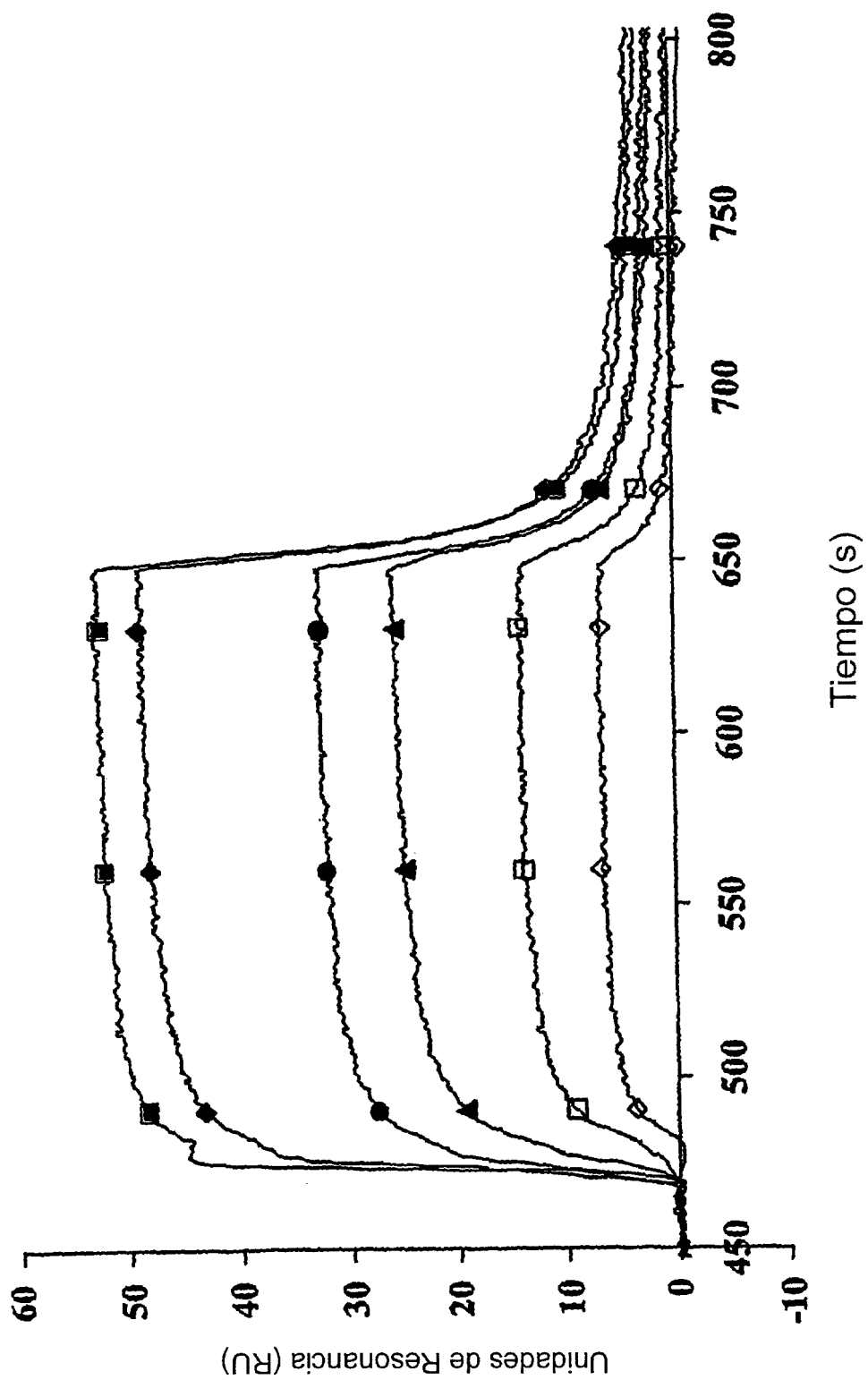


FIGURA 8B

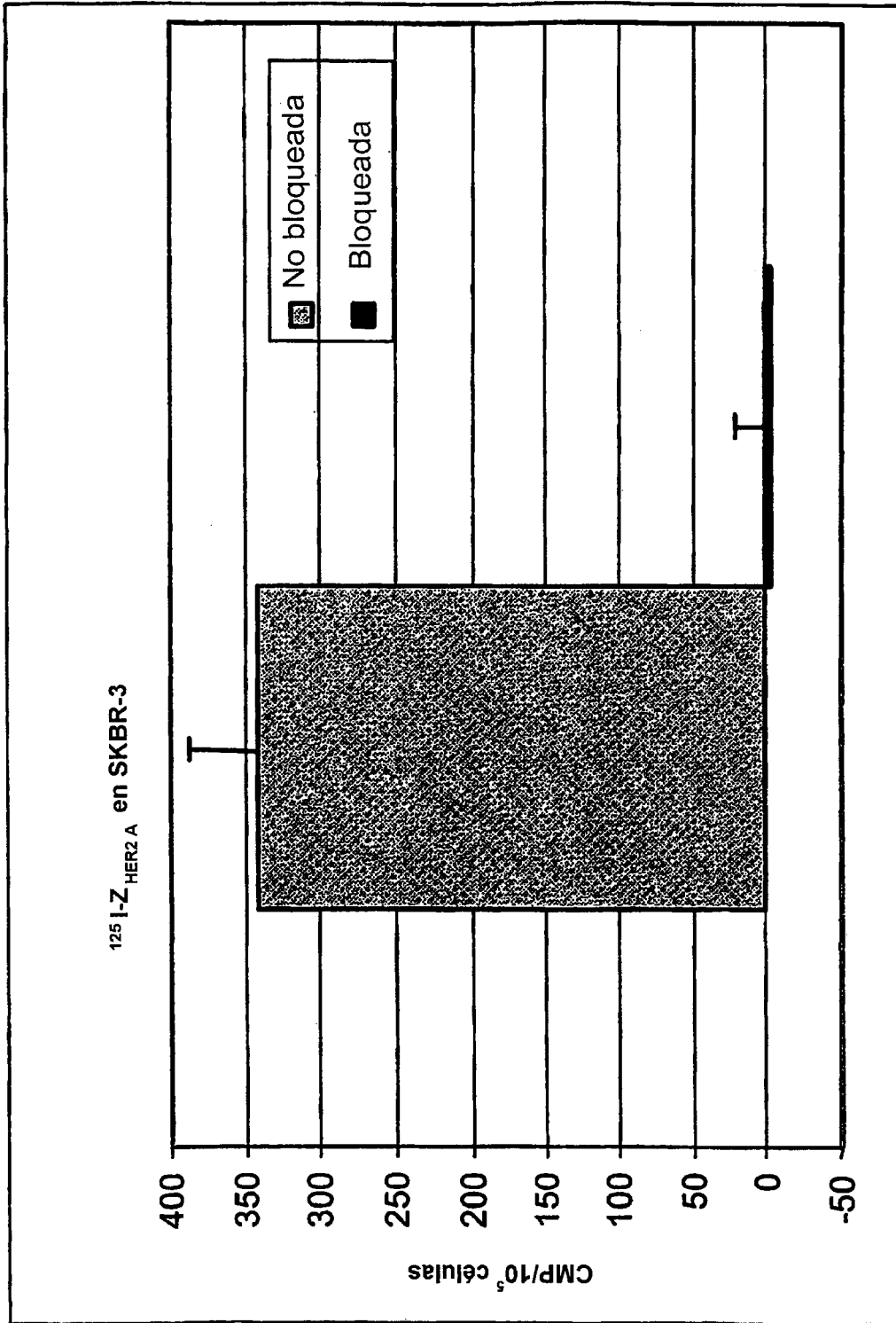


FIGURA 9

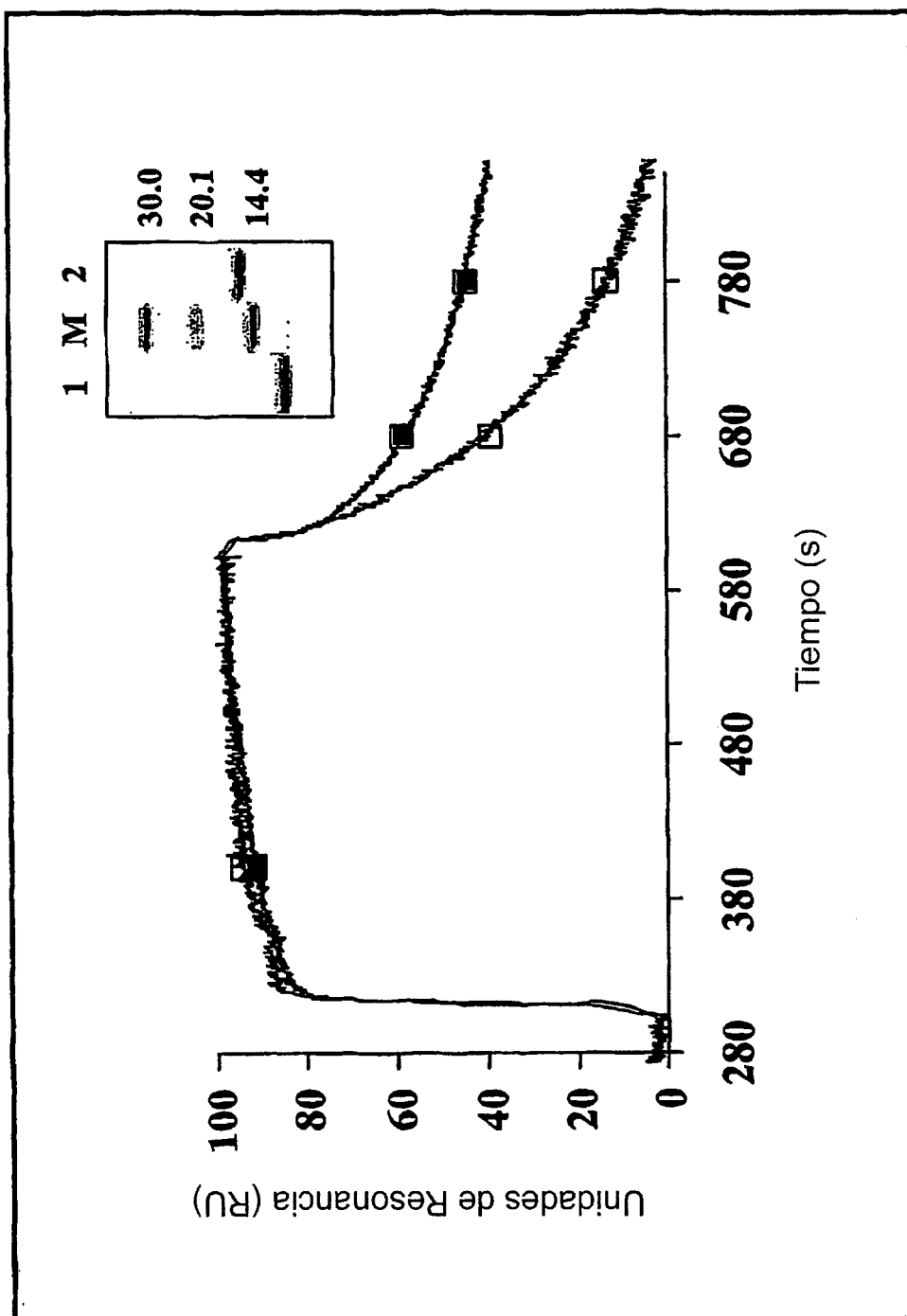


FIGURA 10

Bloqueada vs no bloqueada

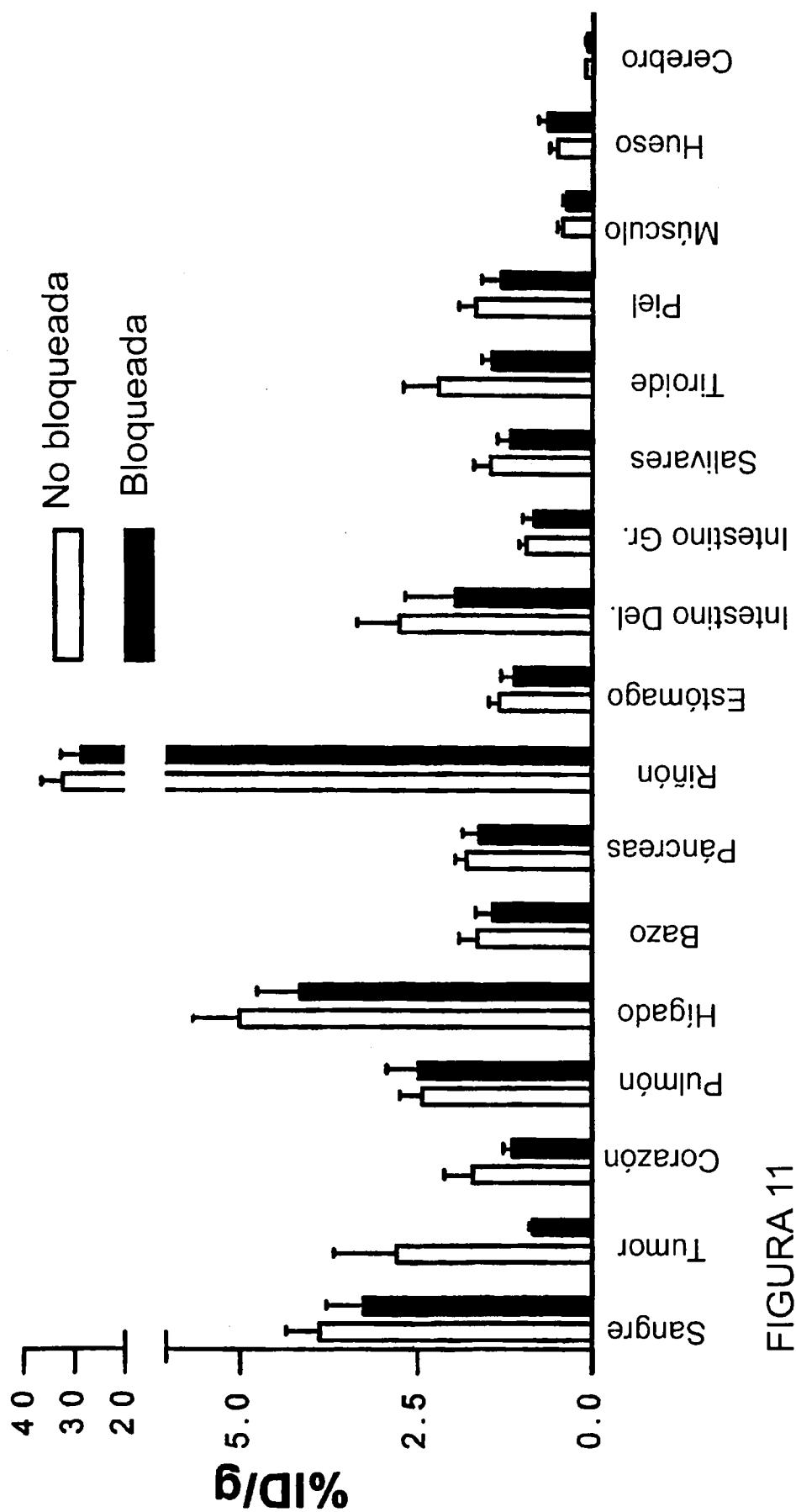


FIGURA 11

Affibody específica vs inespecífica

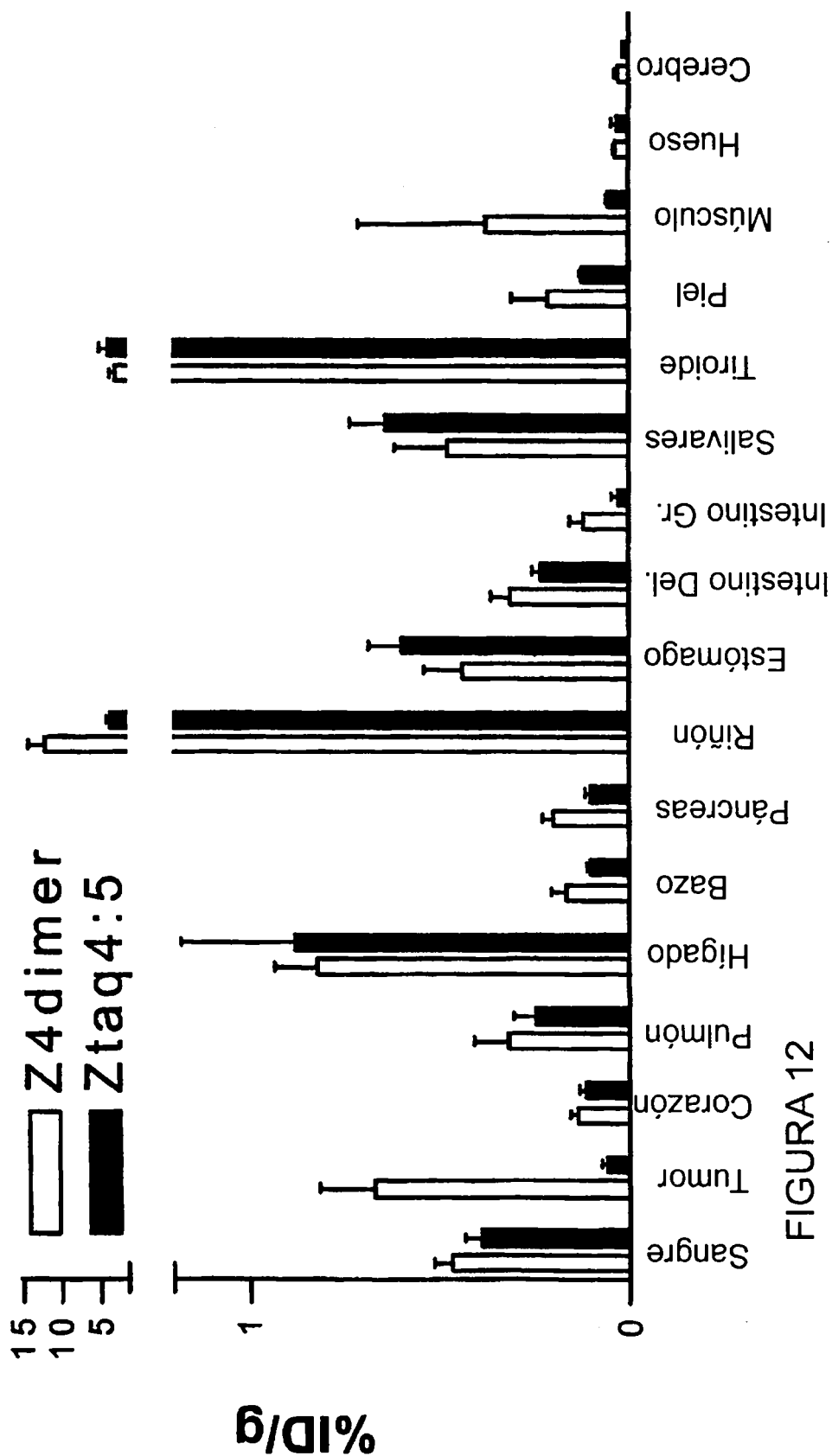


FIGURA 12

Biodistribución, datos combinados

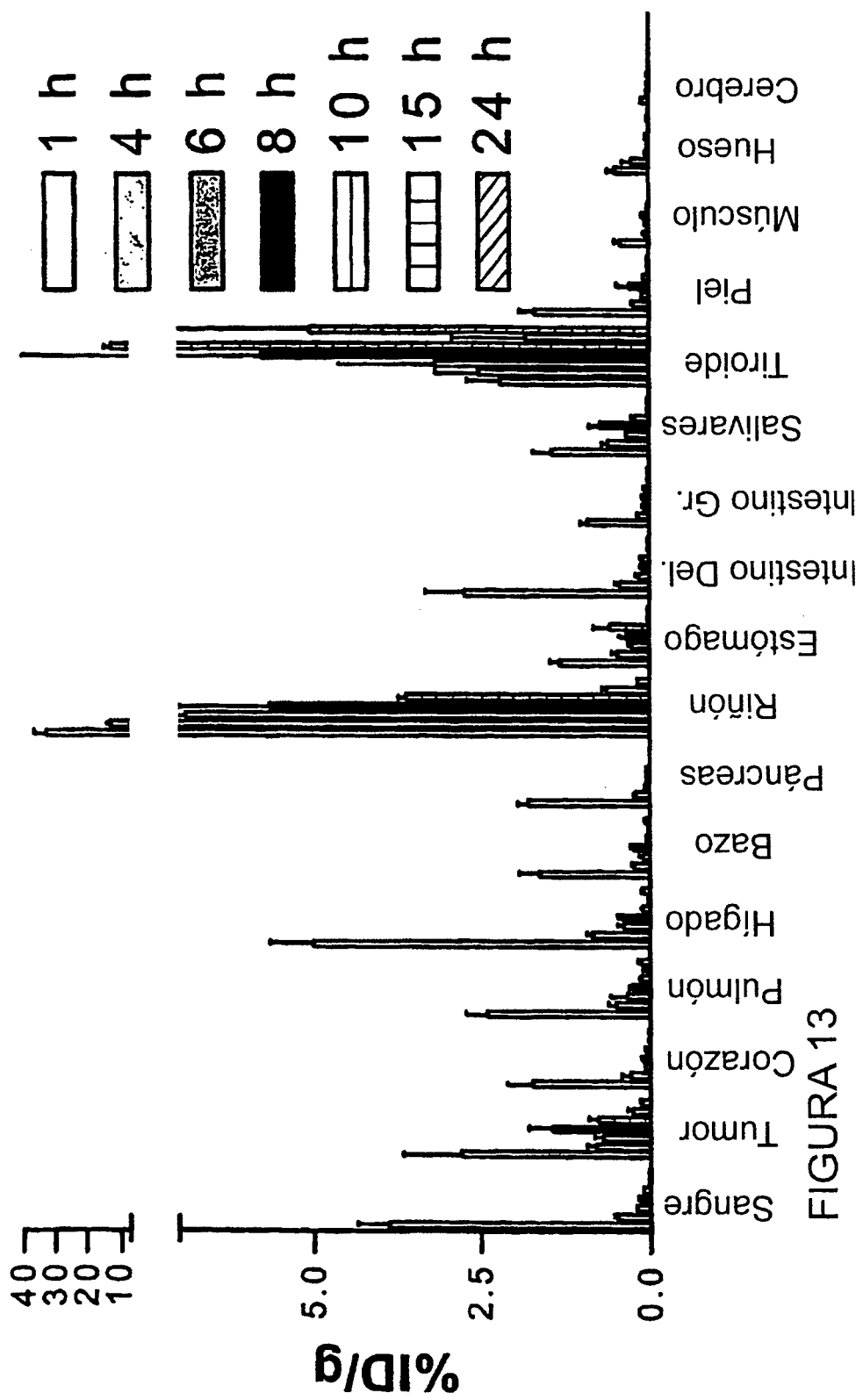


FIGURA 13

Biodistribución a las 8 horas i.p.

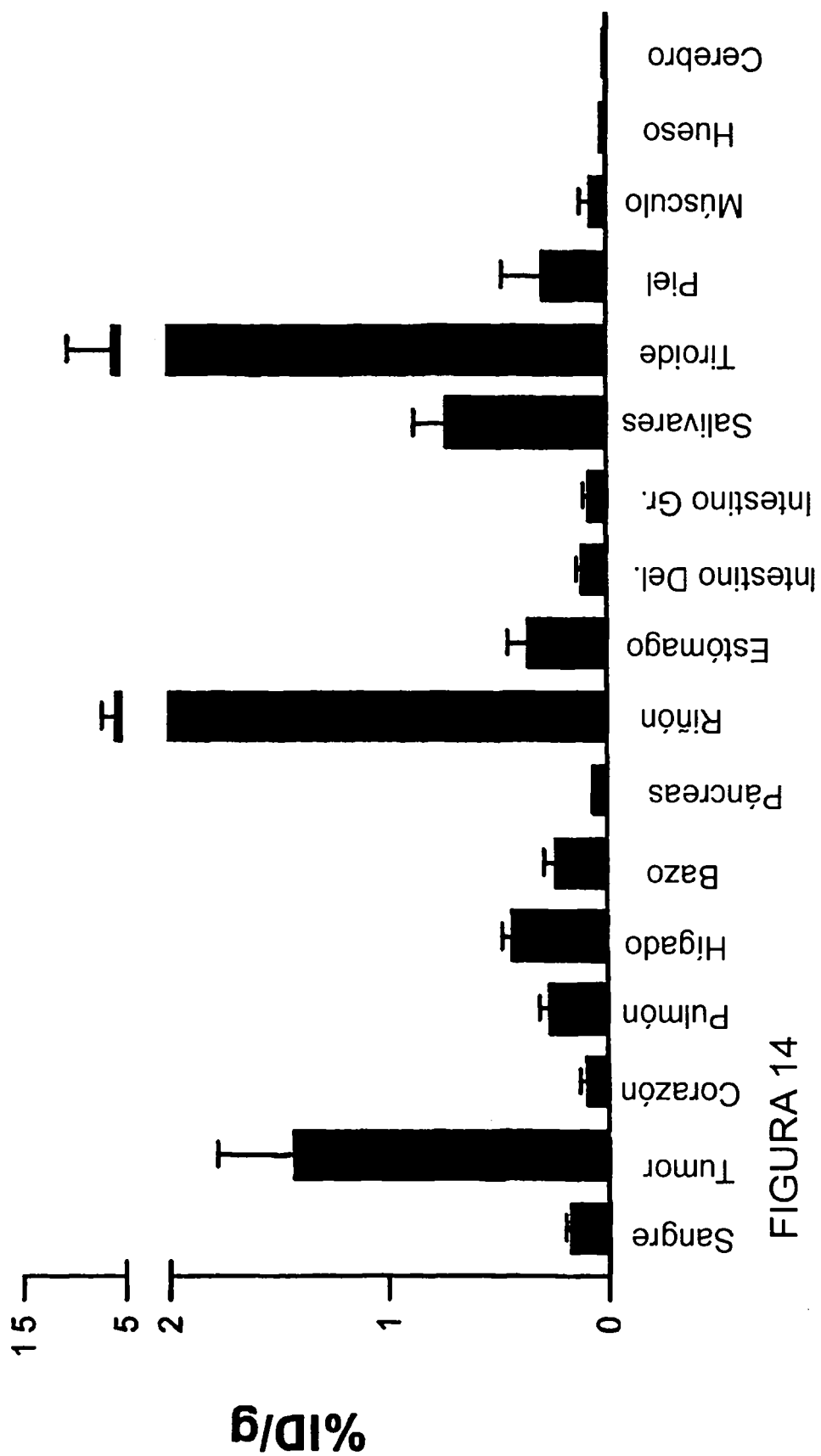


FIGURA 14

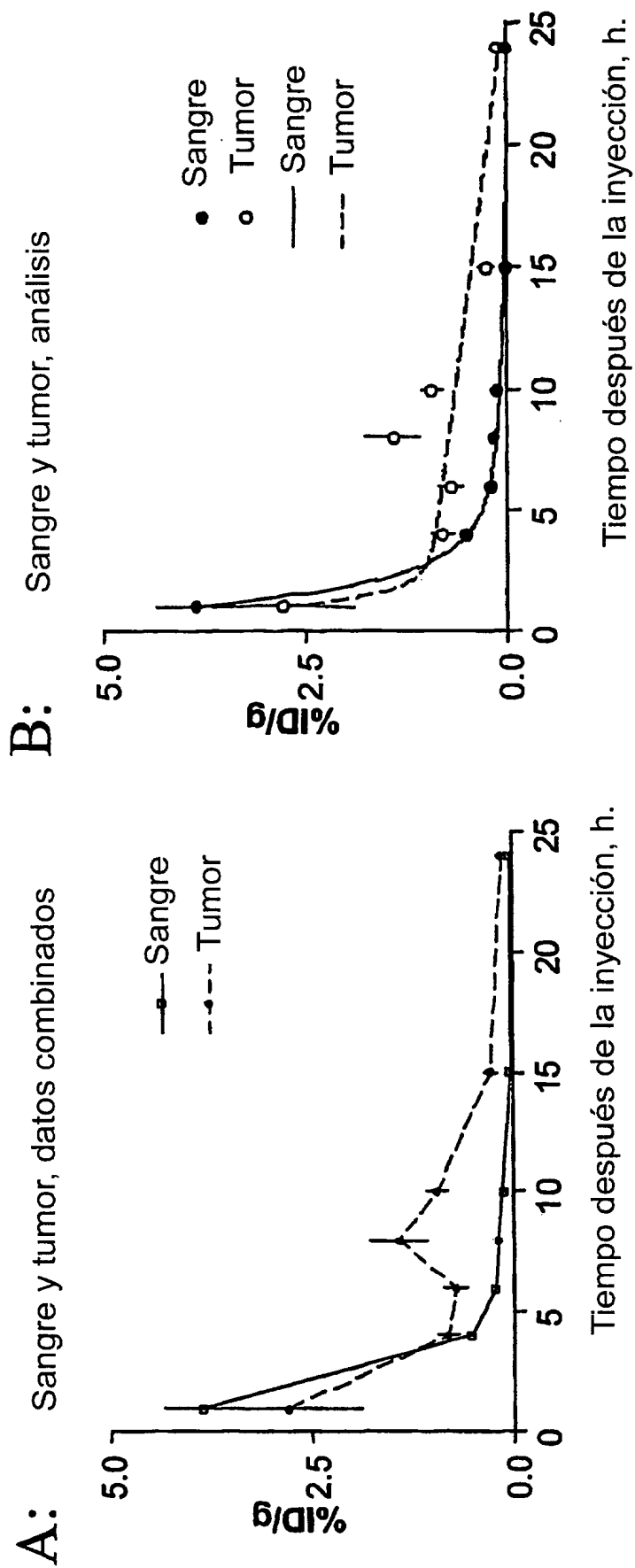


FIGURA 15

Relación entre tumor y sangre, datos combinados

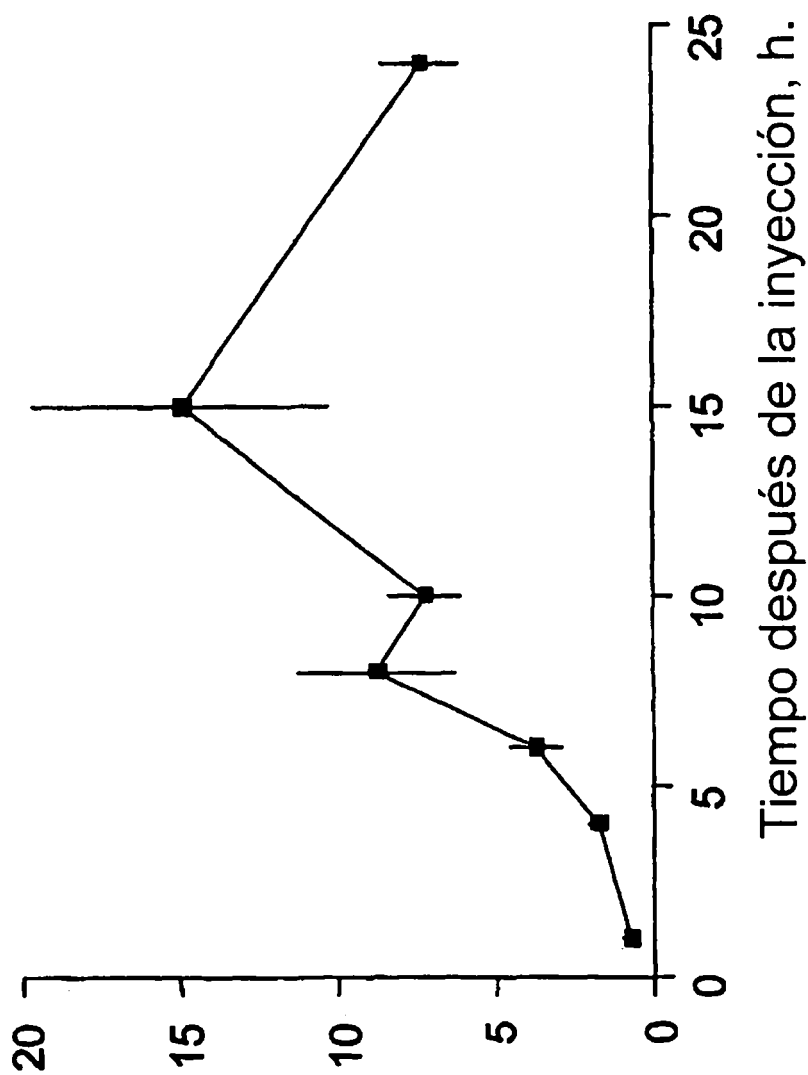
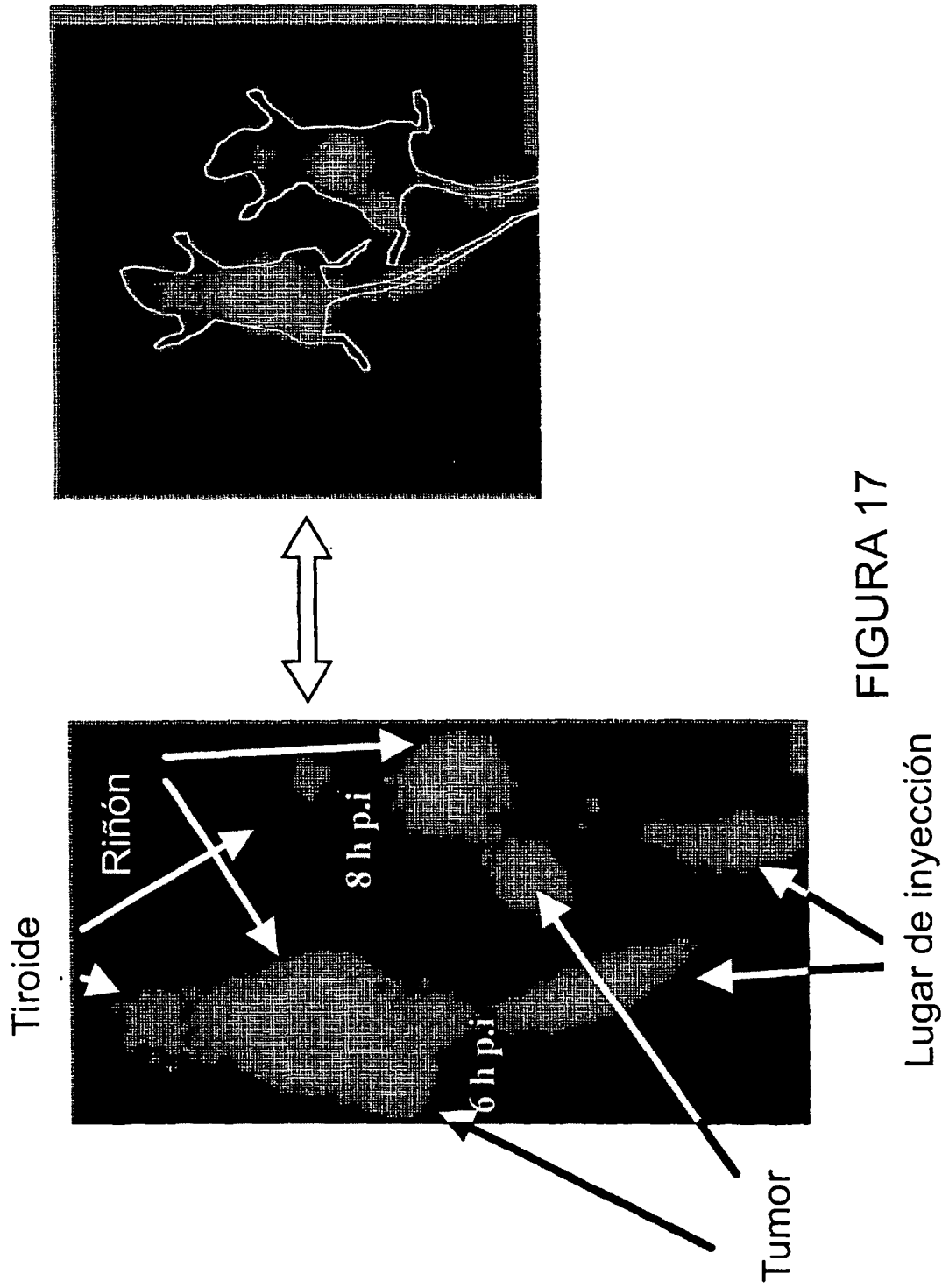


FIGURA 16



Biodistribución de Z_{HER2}A, 4 horas

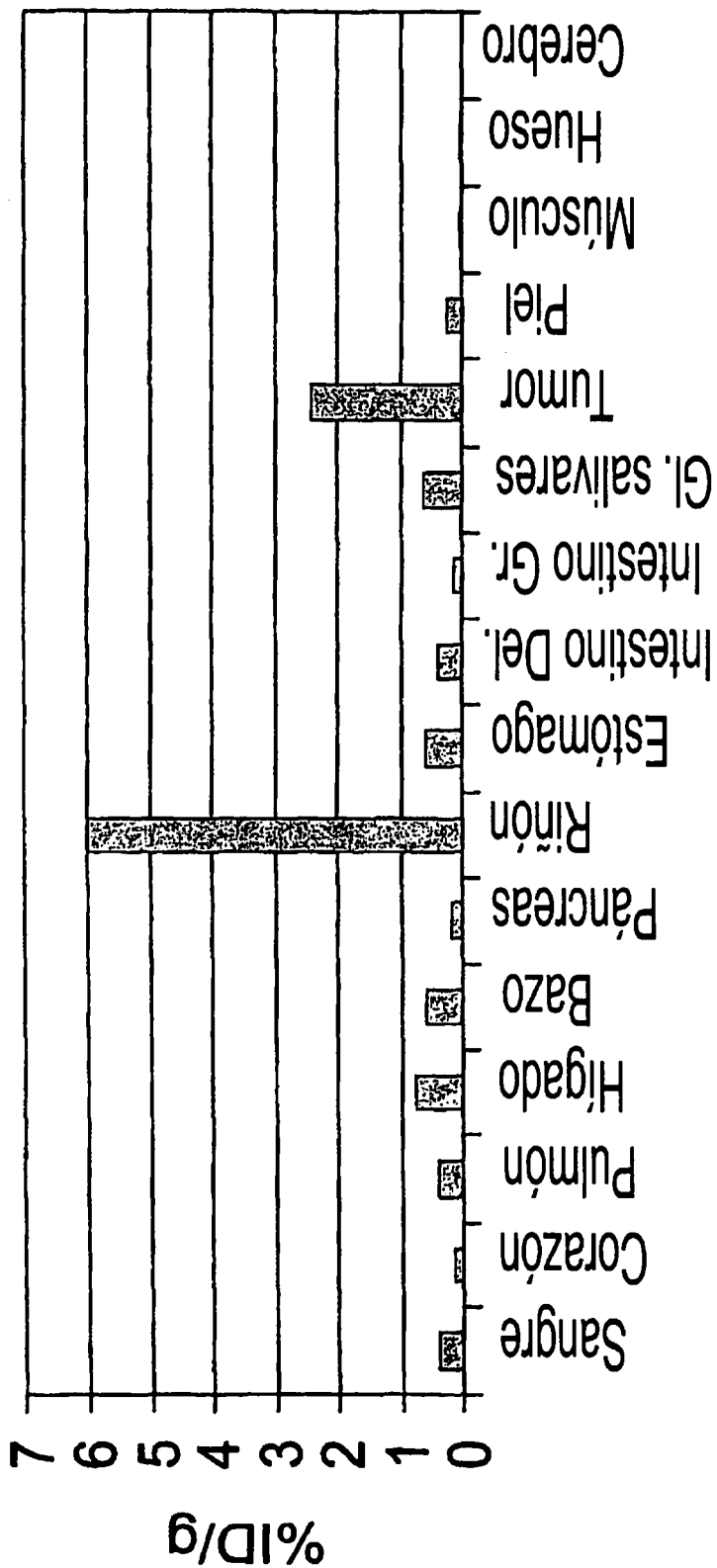


FIGURA 18

Biodistribución de Z_{HER2}A, 24 horas

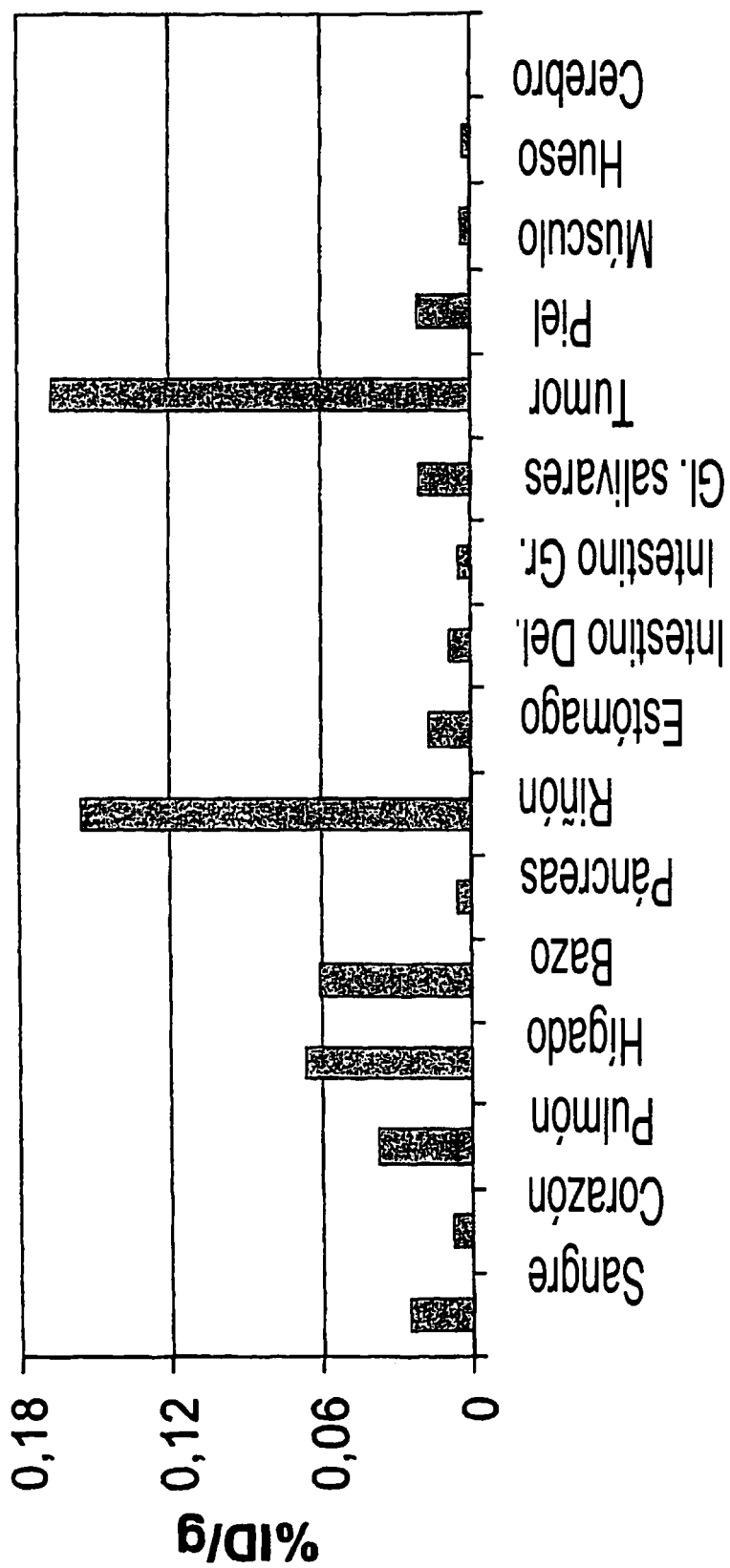


FIGURA 19

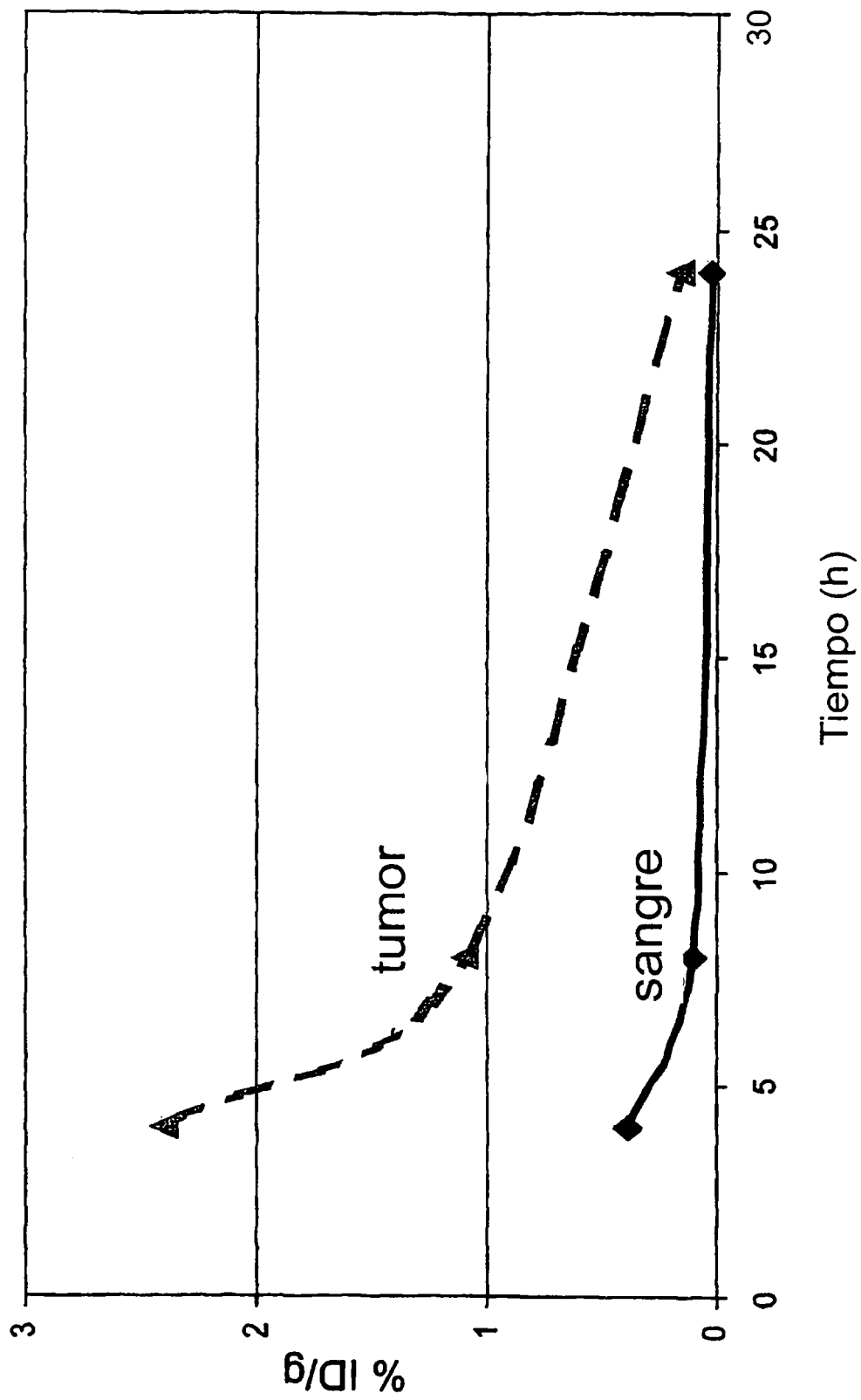


FIGURA 20

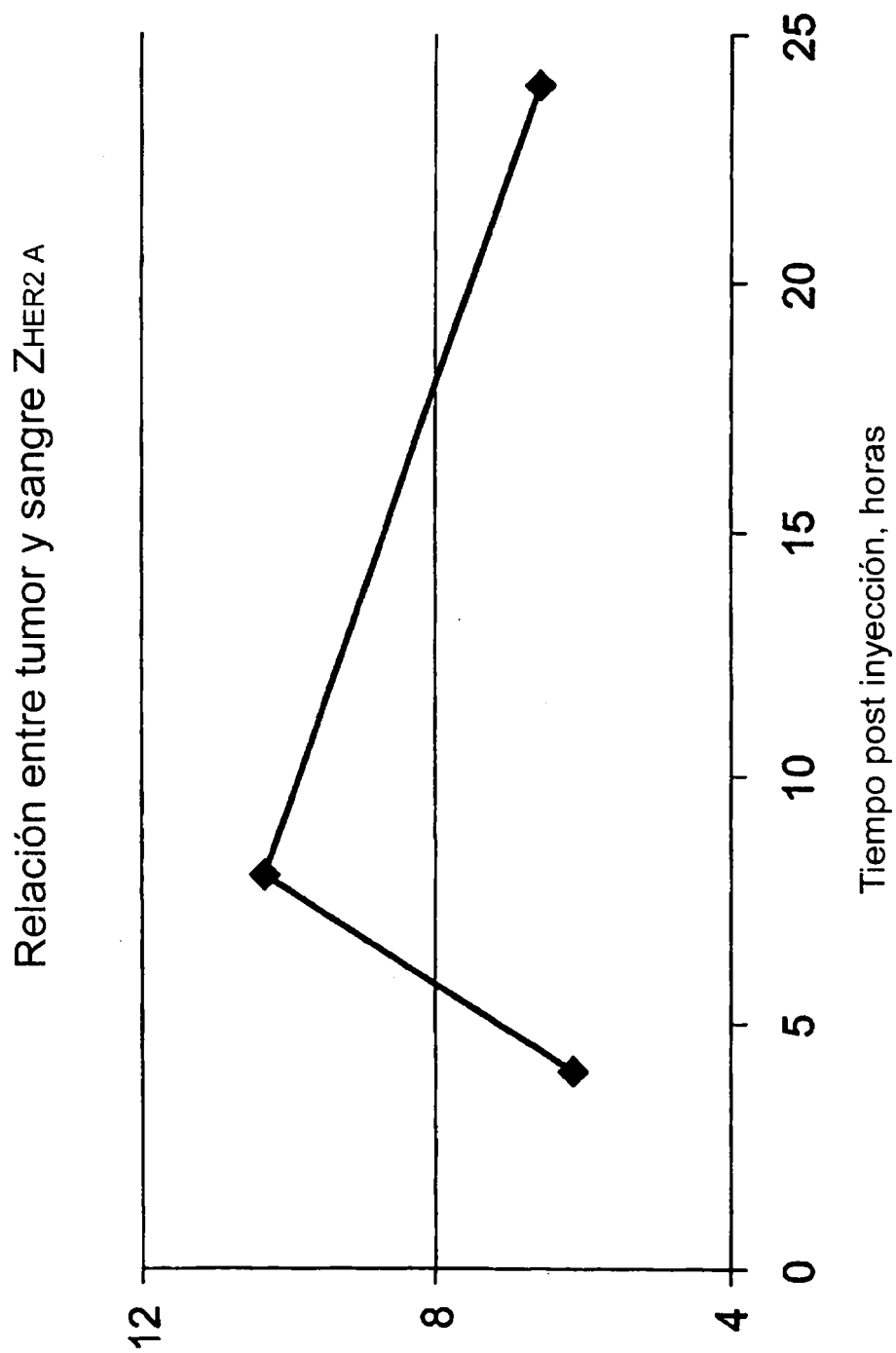


FIGURA 21



FIGURA 22

Biodistribución ABD (Z_{HER2A})₂, 12 y 24 horas

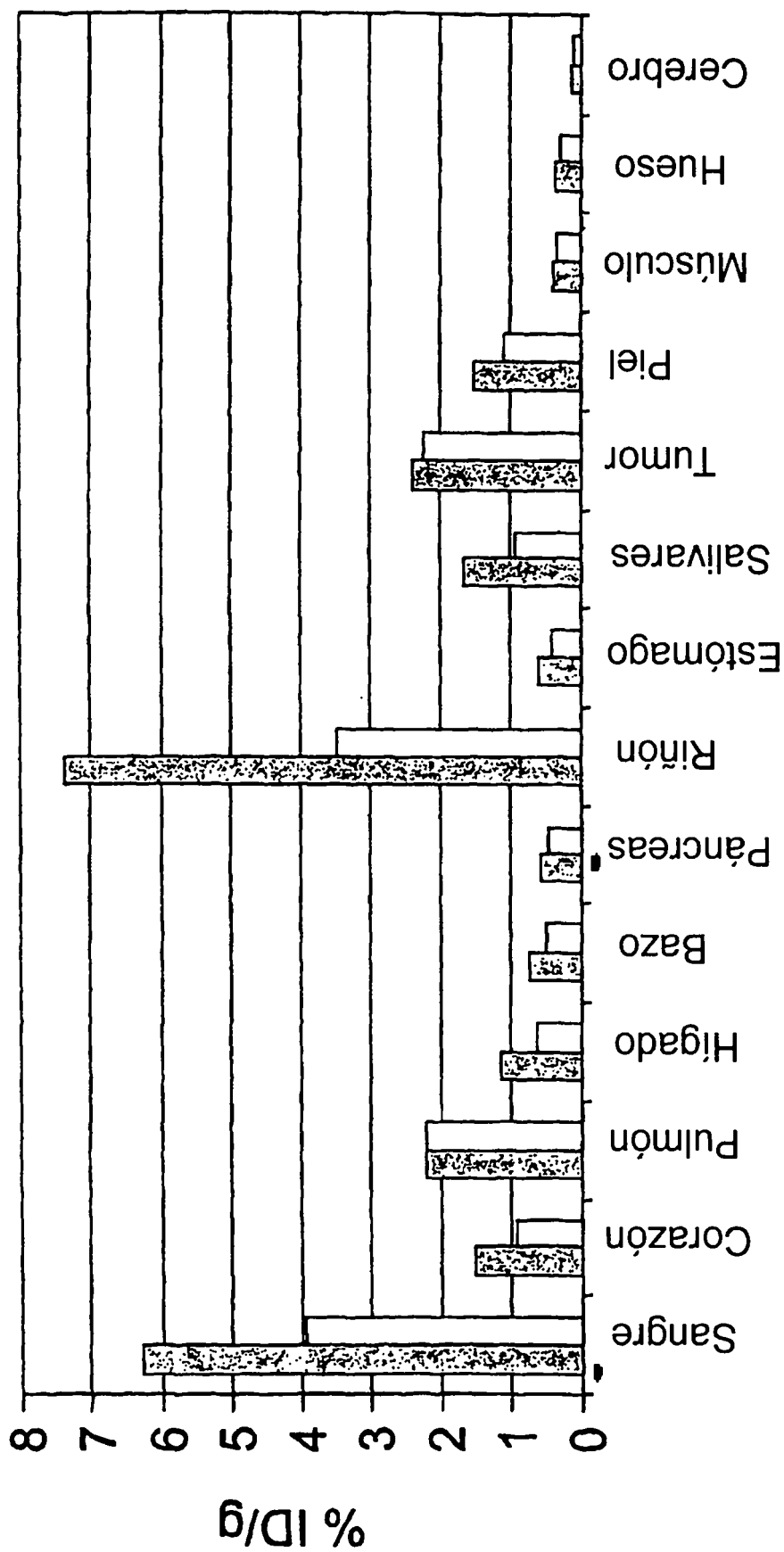


FIGURA 23

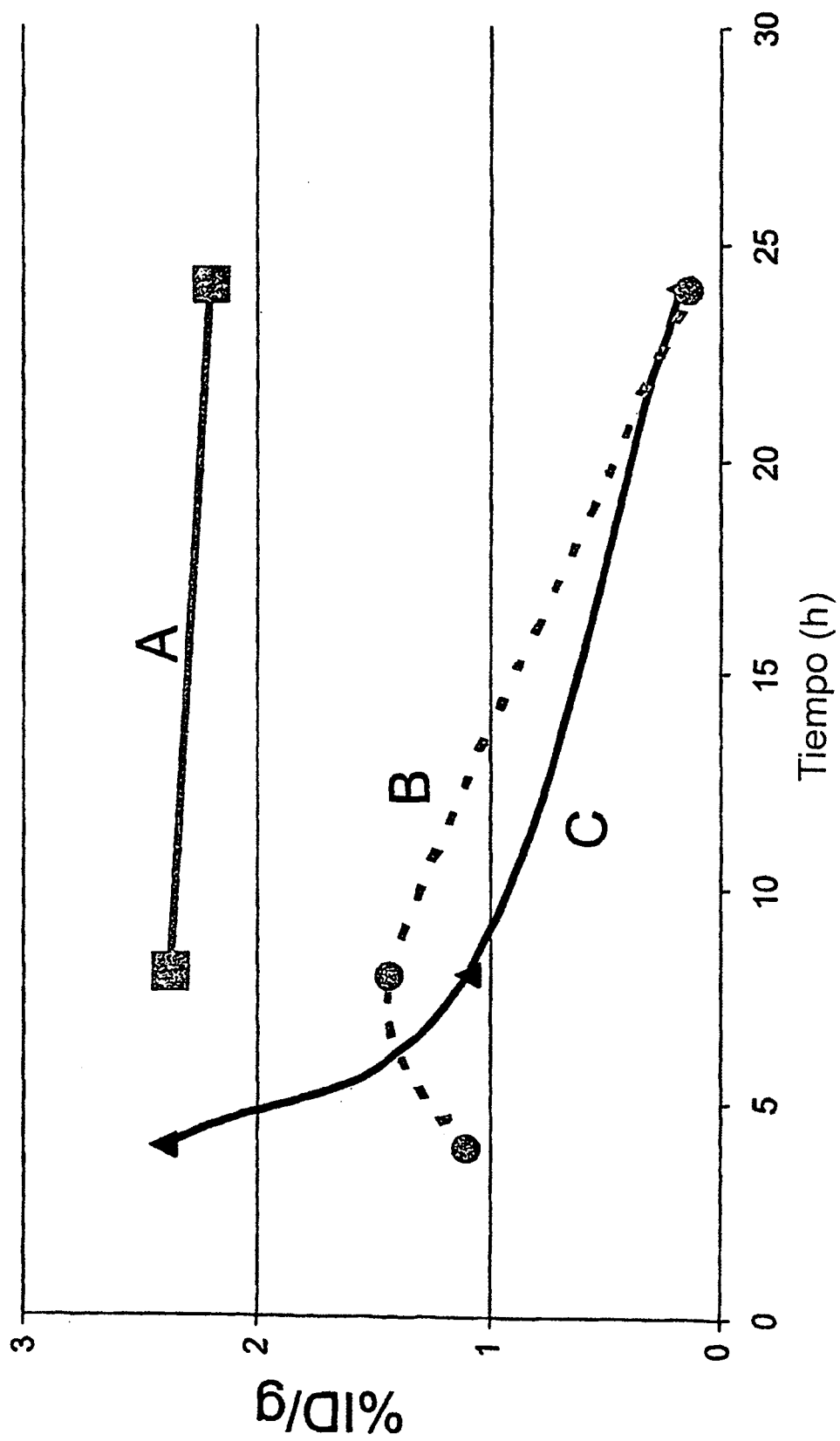


FIGURA 24

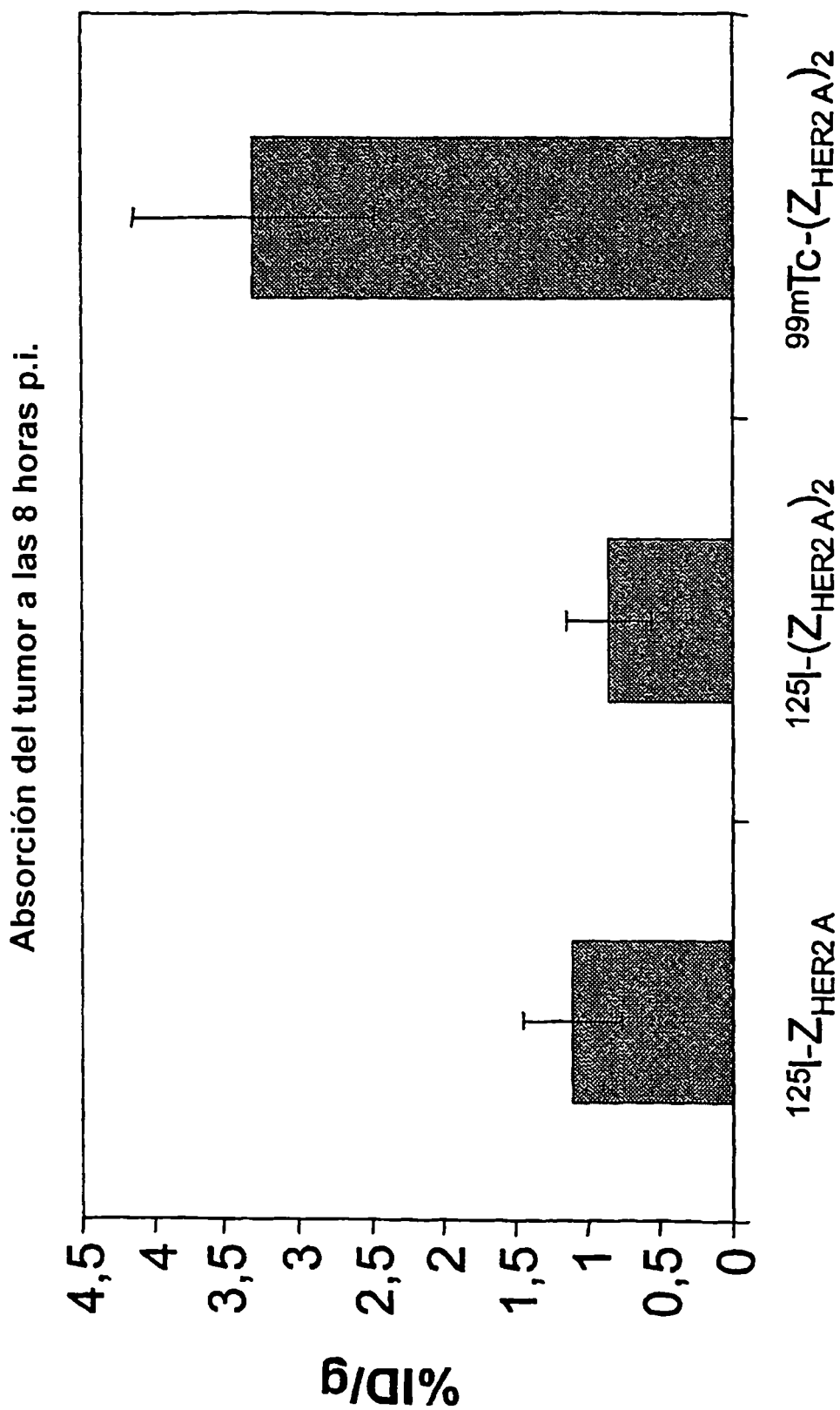


FIGURA 25

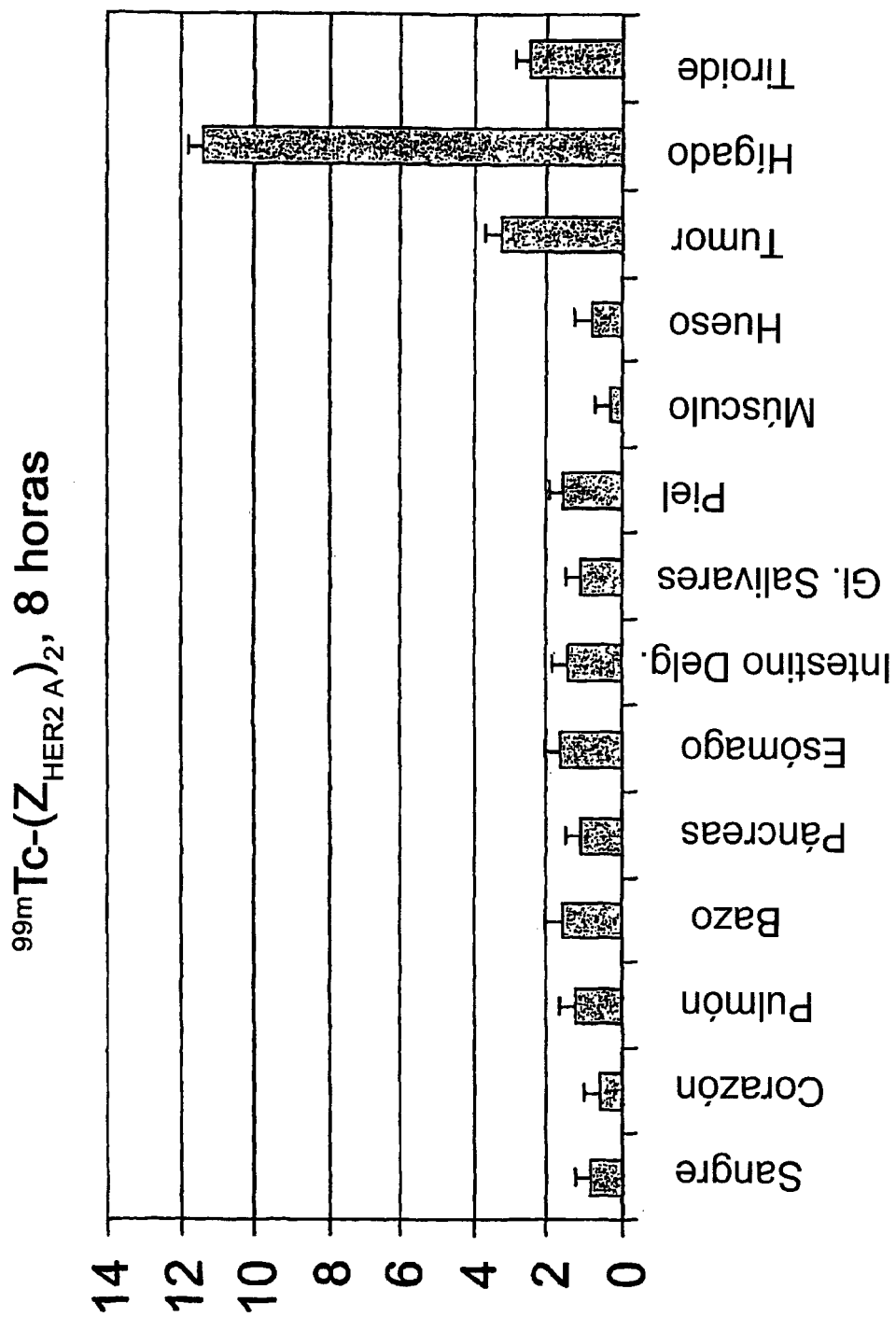


FIGURA 26

$^{99m}\text{Tc}-(\text{Z}_{\text{HER2}}\text{A})_2$, 8 h pi

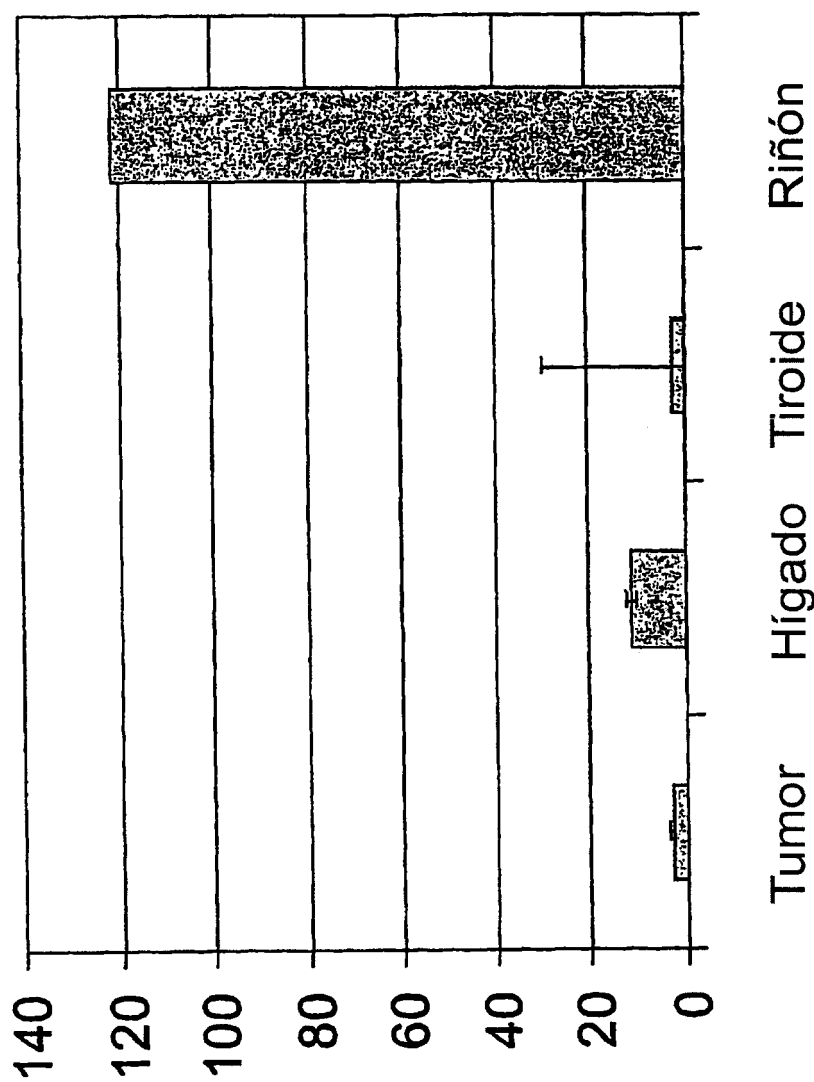


FIGURA 27

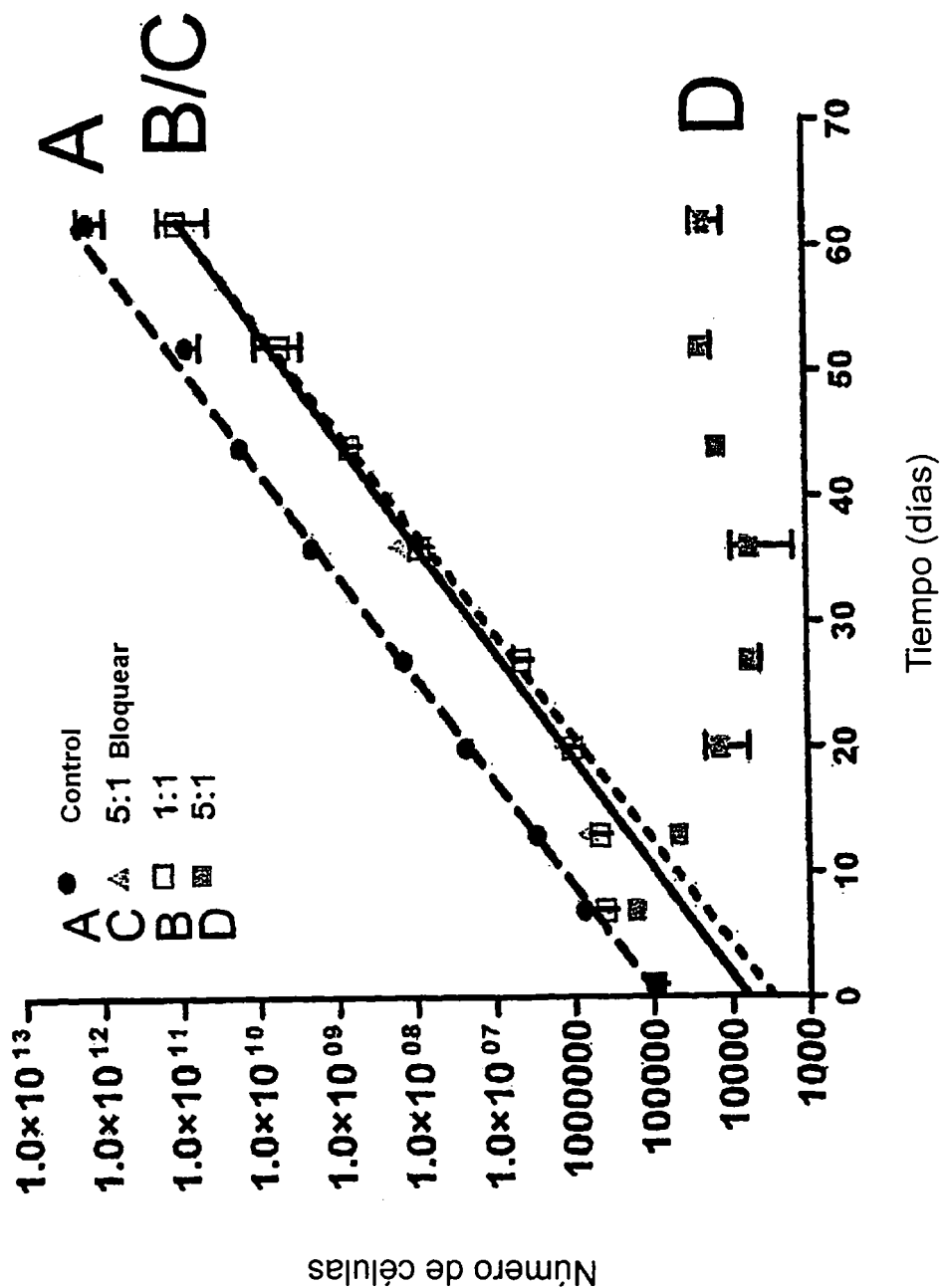


FIGURA 28

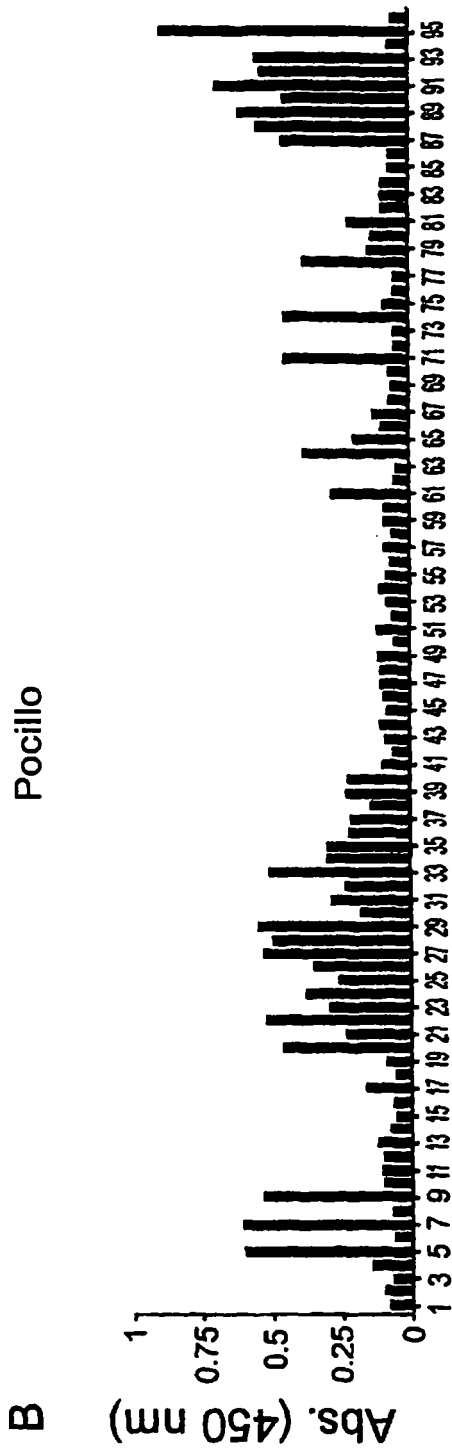
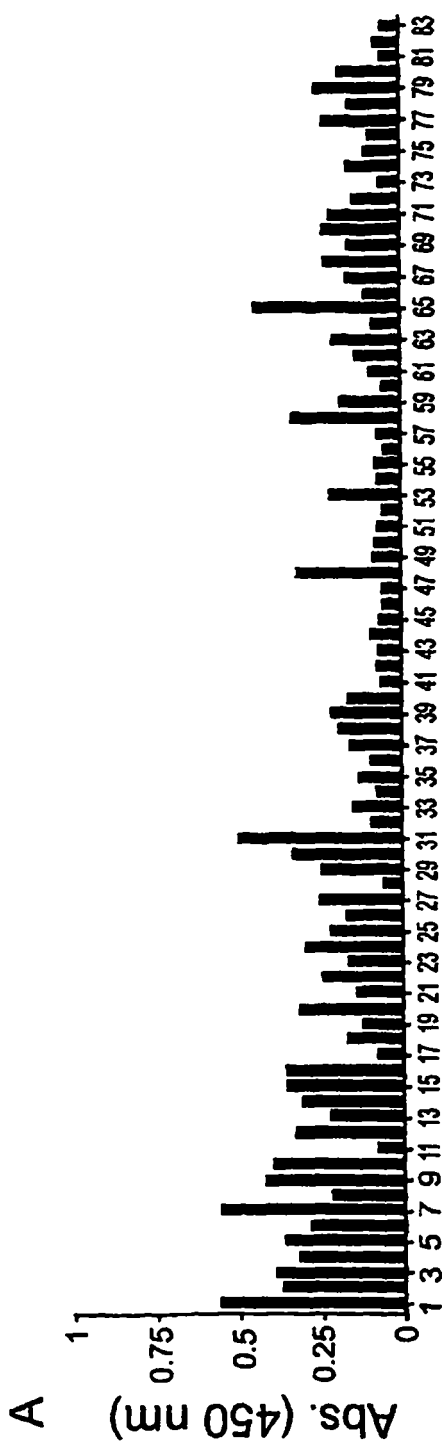


FIGURA 29

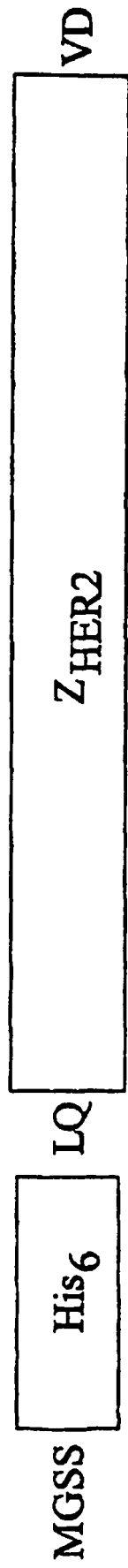


FIGURA 30

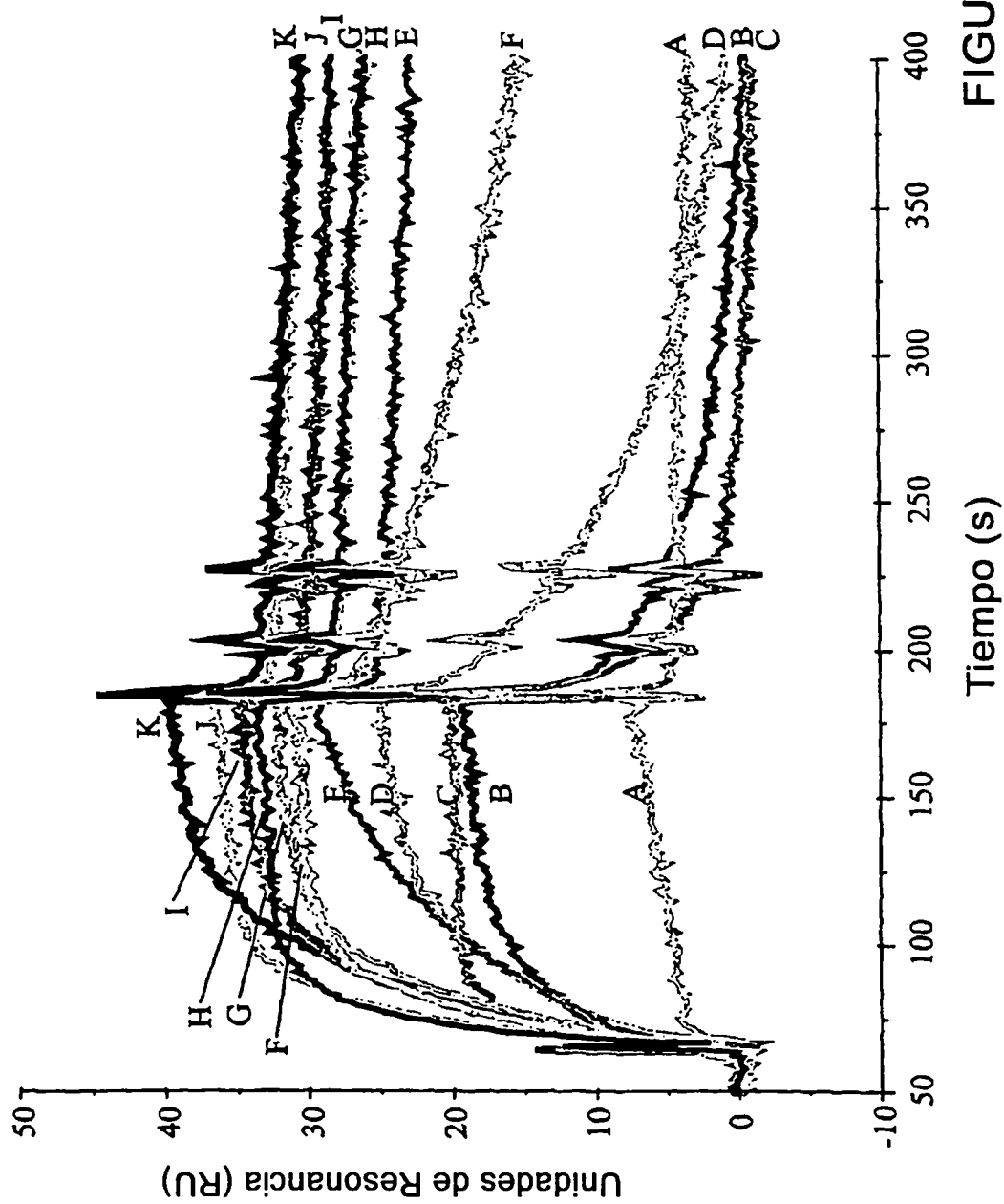


FIGURA 31

FIGURA 32

