



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 334 895**

51 Int. Cl.:

C07K 16/32 (2006.01) **C07K 19/00** (2006.01)
C12N 15/13 (2006.01) **C12N 15/62** (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01) **C12N 7/00** (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01) **A61K 39/395** (2006.01)
G01N 33/577 (2006.01) **C12Q 1/68** (2006.01)
A61K 31/7088 (2006.01) **A61K 35/76** (2006.01)
A61K 38/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **02784853 .0**

96 Fecha de presentación : **10.07.2002**

97 Número de publicación de la solicitud: **1432737**

97 Fecha de publicación de la solicitud: **30.06.2004**

54 Título: **Mini-anticuerpo humano citotóxico para las células tumorales que expresan el receptor ErbB2.**

30 Prioridad: **10.07.2001 IT RM01A0408**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
17.03.2010

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
17.03.2010

73 Titular/es: **Biotecnol S.A.**
Lagoas Park, Edificio 7 - 1 Piso Norte
2741-901 Porto Salvo, PT

72 Inventor/es: **D'Alessio, Giuseppe;**
Piccoli, Renata;
De Lorenzo, Claudia;
Palmer, Donald Balfour y
Ritter, Mary Alice

74 Agente: **Elzaburu Márquez, Alberto**

ES 2 334 895 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

Mini-anticuerpo humano citotóxico para las células tumorales que expresan el receptor ErbB2.

5 Campo de la invención

La presente invención se refiere a un mini-anticuerpo humano citotóxico para las células tumorales que expresan el receptor ErbB2, su secuencia correspondiente, el procedimiento para aislarlo, y su uso en terapia.

10 Estado de la técnica

El receptor de tirosina quinasa transmembrana (RTK) ErbB2, homólogo al receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) (1, 2), se expresa de forma elevada en carcinomas de mama, ovario y pulmón (3, 4), así como en líneas celulares derivadas de tumores de glándulas salivales y tumores gástricos (5, 6). Su sobreexpresión, que se da habitualmente por medio de amplificación génica, puede alcanzar hasta 2×10^6 moléculas por célula. En los tejidos normales se expresa a niveles bajos solamente en ciertos tipos de células epiteliales (7). ErbB2 desempeña un papel fundamental en la progresión tumoral, ya que potencia y prolonga las cascadas de transducción de señales provocadas por la activación mediante ligandos de otros receptores RTK ErbB (8). La sobreexpresión de ErbB2 puede incrementar también la resistencia de las células tumorales a las defensas del hospedador permitiendo que eviten la vigilancia inmunológica contra el crecimiento neoplásico ejercida por los macrófagos activados (9). La accesibilidad de ErbB2 en la superficie celular, y su implicación en el desarrollo de la malignidad de estos tumores, hace que sea un objetivo atractivo para la inmunoterapia.

Varios grupos de investigación han aislado anticuerpos monoclonales (mAbs) de ratón y rata dirigidos contra el dominio extracelular de ErbB2 (10-12). Se ha demostrado que algunos de estos mAbs de roedores están dotados de efectos antiproliferativos sobre las células tumorales (10-14). Sin embargo, como consecuencia de su origen no humano, el uso de estos mAbs como fármacos inmunoterápicos es limitado.

Un avance evidente en esta área de investigación consistió en el desarrollo de la técnica de humanización de anticuerpos, con la producción de versiones humanizadas de anticuerpos de roedores (15). Estos mAbs mantienen su especificidad y su afinidad de unión, pero muestran una inmunogenicidad reducida. En particular, se está utilizando una versión humanizada de un anticuerpo murino anti-receptor ErbB2 (Herceptina) como fármaco para el tratamiento del cáncer de mama (16, 17).

Se han aislado fragmentos de anticuerpos (scFv - fragmento variable de cadena simple) de bibliotecas combinatorias expresadas en fagos, usando para la selección antígenos o péptidos purificados inmovilizados en superficies artificiales. La desventaja de este tipo de aproximación es que puede conducir a la selección de anticuerpos que no reconozcan el antígeno en su estado nativo, es decir, en su contexto fisiológico (37). Por ejemplo, un scFv anti-ErbB2 aislado mediante el uso del dominio extracelular de ErbB2 purificado no fue capaz de unirse a ErbB2 en la superficie de células SKBR3 (21).

Al contrario, se ha demostrado que la inmunoadsorción directa (selección mediante afinidad con el antígeno) de un repertorio de scFv con células vivas es esencial para el aislamiento de anticuerpos que reconozcan los antígenos de la superficie celular en su configuración nativa (38). Además, esta estrategia permite la identificación de nuevos antígenos de la superficie celular, que pueden ser útiles en el diagnóstico o la terapia (22, 38-40).

Recientemente ha sido posible aislar scFv completamente humanos mediante la técnica de expresión en fagos. Esta se basa en la expresión de grandes repertorios de dominios de anticuerpos en las cápsidas de fagos filamentosos, tras su fusión a la proteína pIII de la cubierta del fago (18, 19). Esta metodología proporciona varias ventajas con respecto a la técnica de hibridomas, que se pueden resumir como sigue: (i) la naturaleza completamente humana de los anticuerpos; (ii) la posibilidad de evitar la inmunización de animales; (iii) el aislamiento rápido de scFv mediante métodos de afinidad a partir de bibliotecas muy grandes de hasta 10^{13} clones diferentes; (iv) la disponibilidad de scFv estables tras la selección de los fagos, con rendimientos elevados mediante la expresión en bacterias de los cADNs seleccionados; (v) la posibilidad de obtener anticuerpos cuando las metodologías clásicas pueden no ser eficaces, como con los antígenos tóxicos o sumamente conservados en diversas especies.

El método de expresión en fagos ya se ha aplicado a la producción de scFv humanos específicos de ErbB2, usando para la selección su dominio extracelular recombinante aislado (20, 21), o más recientemente células de tumores de mama (22). Dada su elevada afinidad por el receptor, estos inmunorreactivos se pueden considerar herramientas valiosas como vehículos de administración para dirigir de manera específica agentes citotóxicos hacia células tumorales que albergan antígenos. Sin embargo, ninguno de ellos tiene actividad antitumoral.

Resumen de la invención

En un aspecto, la presente invención proporciona un anticuerpo anti-ErbB2 recombinante de cadena simple de origen humano capaz de inhibir el crecimiento de células que expresan el receptor ErbB2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:2 (región VH) y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:12 (región VL).

Otros aspectos y características preferidas de la invención se exponen en las reivindicaciones.

El objetivo de la presente invención es un scFv completamente humano, denominado Erbicina, específico para el receptor ErbB2, con actividad farmacológica, en particular antitumoral. Se ha aislado Erbicina de una biblioteca de fagómidos muy grande (biblioteca Griffin.1) (19) de scFv sintéticos humanos mediante inmunoadsorción (selección por afinidad con el antígeno) llevada a cabo con células vivas que expresan diferentes niveles de ErbB2. Se ha descubierto que el fragmento de cadena simple de un anticuerpo anti-ErbB2 humano, denominado Erbicina, muestra propiedades biológicas que no se han descrito para otros scFv anti-ErbB2 aislados hasta ahora. De hecho, Erbicina se une específicamente al receptor ErbB2, es interiorizada por las células objetivo, inhibe intensamente la fosforilación del receptor, y exhibe una intensa inhibición del crecimiento de todas las líneas celulares ErbB2-positivas analizadas. Además, se puso de manifiesto un efecto citotóxico evidente hacia las células SKBR3 que sobreexpresaban ErbB2, en las que se indujo la muerte apoptótica. Estas características están presentes tanto en Erbicina soluble como en su formato en fagos (Ph-Erbicina).

Otro objetivo de la invención son las composiciones farmacéuticas que comprenden como principio activo Erbicina propiamente dicha en su formato en fagos (Ph-Erbicina), o Erbicina fusionada a las regiones constantes de anticuerpos humanos, o toxinas, o moléculas con potencial citotóxico, tales como enzimas con actividad de ribonucleasa o proteasa (muy conocidas para el experto en este campo). Otro objetivo de la invención es el uso de scFv según la invención en terapia, en particular como agente antitumoral, más en particular para el tratamiento de tumores en los que las células expresan el receptor ErbB2, tales como las células de carcinomas de mama, ovario o pulmón.

Los objetivos adicionales de la invención serán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada de la invención.

25 Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Análisis mediante transferencia de Western de extractos celulares preparados a partir de células SKBR3. Los extractos se sometieron a análisis con: scFv expresados en fagos (Ph-Erbicina) (carril 1); mAb MgR6 anti-ErbB2 (carril 2); scFv anti-tiroglobulina expresado en fagos (carril 3). En el carril 4, se sometió a análisis un extracto de células SKBR3, previamente inmunoprecipitado con mAb MgR6 anti-ErbB2, con Ph-Erbicina.

Figs. 2A, 2B, 2C, 2D, 2E y 2F. Análisis mediante citometría de flujo de la unión de Ph-Erbicina a líneas celulares que expresan ErbB2: MDA-MB453 (la Fig. 2A y la Fig. 2B corresponden a los paneles A y B, respectivamente); BT-474 (la Fig. 2C y la Fig. 2D corresponden a los paneles C y D, respectivamente); SK-OV-3 (la Fig. 2E y la Fig. 2F corresponden a los paneles E y F, respectivamente). Las células se sometieron a análisis con Ph-Erbicina (la Fig. 2A, Fig. 2C y Fig. 2E corresponden a los paneles A, C y E, respectivamente, picos sombreados) o con un scFv anti-NIP de control expresado en fagos (picos sin sombrear). En la Fig. 2B, Fig. 2D y Fig. 2F (que corresponden a los paneles B, D y F, respectivamente) las células se sometieron a análisis con mAb MgR6 anti-ErbB2 (picos sombreados), o con OKT3, un control, mAb anti-CD3 no relacionado (picos sin sombrear).

Fig. 3. Electroforesis con SDS-gel y análisis mediante transferencia de Western de Erbicina. Carriles 1 y 2: Tinción de Coomassie de Erbicina y scFv soluble anti-NIP de control, respectivamente. En los carriles 3 a 6 se muestran los análisis mediante transferencia de Western de Erbicina (carriles 3 y 5) y scFv anti-NIP (carriles 4 y 6) sometidos a análisis con mAb 9E10 anti-myc (carriles 3 y 4) o con mAb anti-His (carriles 5 y 6).

Fig. 4A, 4B, 4C, 4D, 4E y 4F. Interiorización de Ph-Erbicina y Erbicina en células SKBR3 visualizada mediante microscopia confocal. Las células se incubaron durante 16 horas con Ph-Erbicina (la Fig. 4A corresponde al panel A), o con Erbicina durante 2 h (la Fig. 4B corresponde al panel B) o 16 h (la Fig. 4C corresponde al panel C). Se usó en paralelo como controles scFv Anti-NIP expresado en fagos (la Fig. 4D corresponde al panel D) o scFv anti-NIP soluble (la Fig. 4E y la Fig. 4F corresponden a los paneles E y F, respectivamente). Aumento 1:1000.

Fig. 5. Efecto de Erbicina-A7 sobre la fosforilación de ErbB2. Se informa el nivel de la fosforilación de ErbB2 en extractos de células SKBR3, tratadas durante los tiempos indicados con Erbicina (12 $\mu\text{g/ml}$), como los porcentajes del nivel de fosforilación detectado en las células sin tratar. En el inserto, se muestra el efecto de: un tratamiento de 2 h con Erbicina (12 $\mu\text{g/ml}$); un tratamiento de 15 min con EGF (100 ng/ml); el mismo tratamiento con EGF en células previamente tratadas durante 2 h con Erbicina-A7. El control consistió en células sin tratar.

Fig. 6A, 6B, 6C y 6D. Efecto de Ph-Erbicina (la Fig. 6A y la Fig. 6B corresponden a los paneles A y B, respectivamente) y Erbicina (la Fig. 6C y la Fig. 6D corresponden a los paneles C y D, respectivamente) sobre la proliferación de líneas celulares SKBR3 (los símbolos claros en la Fig. 6A y la Fig. 6C corresponden a los paneles A y C, respectivamente) y A431 (los símbolos negros en la Fig. 6A y la Fig. 6C corresponden a los paneles A y C, respectivamente). En las curvas de respuesta a dosis, la supervivencia celular después de 72 h se expresa como porcentaje de células vivas con respecto a las células sin tratar (alrededor de 3×10^4 células). En la Fig. 6B y la Fig. 6D (que corresponden a los paneles B y D, respectivamente), se expresa el efecto anti-proliferativo de Ph-Erbicina (2×10^{10} ufc/ml, la Fig. 6B corresponde al panel B) y Erbicina (20 $\mu\text{g/ml}$, la Fig. 6D corresponde al panel D) sobre células SKBR3 como porcentaje de la síntesis de ADN en las células tratadas respecto de las células de control. En las células de control, se incorporaron $1,2 \times 10^3$ cpm de [^3H]timidina. Se analizaron scFv no relacionados (anti-NIP, anti-gp200-MR6), en su formato en fagos (Ph-) o soluble, y fagos que carecían del resto de scFv (tn-fago) como controles.

Fig. 7A y 7B. Efecto de Ph-Erbicina sobre la morfología de las células SKBR3. Fig. 7A (que corresponde al Panel A), células de control; Fig. 7B (que corresponde al panel B), células tratadas durante 72 h con Ph-Erbicina (6×10^{10} ufc/ml).

5 Fig. 8A y 8B. Unión de hERB-RNasa a células ErbB2-positivas y ErbB2-negativas y su efecto sobre la supervivencia celular. Fig. 8A, ensayos de ELISA de hERB-RNasa en células SKBR3 (símbolos oscuros), que expresan niveles elevados del receptor, y en células A431 (símbolos claros), que expresan niveles muy bajos; Fig. 8B, efecto de la ERB-RNasa sobre la proliferación de células SKBR3 (símbolos oscuros) y A431 (símbolos claros). Las curvas de respuesta a dosis se refieren al porcentaje de células vivas tratadas durante 72 h con el inmunoadyuvante frente a las
10 células sin tratar (alrededor de 3×10^4).

Descripción detallada de la invención

15 La presente invención se refiere a un minianticuerpo de cadena simple (scFv) completamente humano, que se une específicamente a ErbB2, y por tanto se denomina scFv anti-ErbB2, según la nomenclatura usada para los anticuerpos, muy conocida para el experto en este campo. Este minianticuerpo tiene la propiedad de unirse al receptor ErbB2 y provocar la inhibición de su fosforilación. Esta inhibición es del orden del 65% como mínimo, medida en células SKBR3 mediante ensayos con anticuerpos anti-fosfotirosina llevados a cabo con extractos celulares pretratados a
20 intervalos de tiempo crecientes (de 1 a 7 horas) con Erbicina, para detectar la disminución del nivel de fosforilación del receptor. Esto se describe con detalle en los Ejemplos de la presente descripción. Dicho minianticuerpo tiene un efecto citostático y citotóxico sobre las células que expresan el receptor ErbB2.

Se debe indicar que en las secuencias enumeradas más adelante en la presente memoria, las secuencias subrayadas en negrita son relevantes para la presente invención. Corresponden a las CDRs, las regiones determinantes de la
25 complementariedad.

El minianticuerpo scFv descrito en la presente invención tiene la siguiente secuencia de aminoácidos, definida como SEQ ID N° 20 - Secuencia de aminoácidos del minianticuerpo (scFv):

30 **QVQLLQSAAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIYPG**
DSDTRYSPSFOGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAVYYCARWRDSPLWGQG
TLVTV-SSGGGGSGGGGSGGSAL-
35 **QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCLSSGSVSTSYYPWYQQTPGQAPRTLIIYSTNTR**
SSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESYYCVLYMGSGQYVFGGGTKLTVL
40 **G**

codificada por el ADN de SEQ ID N° 19 - Secuencia de ADN del minianticuerpo (scFv):

45 **5'-CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGCAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT**
CTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGG
CTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTAT
50 **CCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACC**
ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA
GGCCTCGGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATGGCGTGATTGCGCCTTG
55 **TGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTC-TCGAGTGGTGGAGGCGGTTACAGCG**
GAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCACCT-CAGGCTGTGGTGAAGTCAAGGAGCCATC
GTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCTTGAGCTCTG
60 **GCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAGCTGGTACCAGCAGACCCAGGCCA**
GGCTCCACGCACGCTCATCTACAGCACAAACACTCGCTCTTCTGGGGTCCCT
GATCGCTTCTCTGGCTCCATCCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCACCATCACGGGG
65 **GCCAGGCAGATGATGAATCTGATTACTGTGTGCTGTATATGGGTAGTG**
GCCAGTATGTATTTCGGCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT-3'

ES 2 334 895 T3

La presente invención comprende todas las secuencias de nucleótidos que, por la degeneración del código genético, pueden codificar la presente secuencia de aminoácidos.

Se hace referencia a las siguientes secuencias adicionales en este texto:

5 SEQ ID N° 1 - Secuencia de ADN de la región VH (región variable de la cadena pesada):

10 **5'-CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGCAGCAGAGGTGAAAAAGCCCGGGGAGTCT**
CTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGATACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGG
CTGGGTGCGCCAGATGCCCGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCTAT
15 **CCTGGTGA****CTCTGATACCAGATA****CAGCCCGTCCTTCCAAGGCCAGGTCACC**
ATCTCAGCCGACAAGTCCATCAGCACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAA
GGCCTCGACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATGGCGTGATT**CGCCTTTG**
20 **TGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTC-3'**

SEQ ID N° 11 - Secuencia de ADN de la región VL (región variable de la cadena ligera):

25 **5'-CAGGCTGTGGTGA****CTCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCCCTGGAGGGAC**
AGTCACACTCACTTGTGGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGT**ACTA**
30 **CCCCAGCTGGTACCAGCAGACCCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTAC**
AGCACA**AACTCGCTCTTCT****TGGGGTCCCTGATCGCTTCTCTGGCTCCATCC**
35 **TTGGGAACAAGCTGCCCTCACCATCACGGGGGCCAGGCAGATGATGAATC**
TGATTATTACTGTGTGCTGTATATGGGTAGTGGCCAGTATGTATT**CGGCGG**
40 **AGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT-3'**

40 SEQ ID N° 9 - Secuencia de ADN del "LIGADOR" (región que conecta VH y VL):

45 **5'-TCGAGTGGTGGAGGCGGTTCAAGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGTGCACCTT**
-3'

y las secuencias de aminoácidos correspondientes son, respectivamente, las siguientes:

50 SEQ ID N° 2: Secuencia de aminoácidos de la región VH (región variable de la cadena pesada):

55 **QVQLLQSAAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGIIYPG**
DSDIRYSPSFOGQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAVYYCARWRDSPLWGQG
TLVTV

60 SEQ ID N° 12 - Secuencia de aminoácidos de la región VL (región variable de la cadena ligera):

65 **QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYYP****SWYQQTPGQAPRTL****IYSTNTR**
SSGVPDRFSGSILGNKAALTTGAQADDES**DYYCVLYMG****SGOYVFGGGTKLTVL**
G

ES 2 334 895 T3

y SEQ ID N° 10 - Secuencia de aminoácidos de la región del “LIGADOR” (péptido que conecta VH y VL):

SSGGGSGGGGSGGSAL

5

Las regiones en negrita dentro de las secuencias SEQ ID N° 1 y SEQ ID N° 11 corresponden a las secuencias que codifican CDR-1, CDR-2 y CDR-3 de las cadenas VH y VL, y se indican respectivamente como:

SEQ ID N° 3 - Secuencia de ADN de la región CDR-1 de la cadena VH:

10

5'-AGCTACTGGATCGGC-3'

15

SEQ ID N° 5 - Secuencia de ADN de la región CDR-2 de la cadena VH:

20

**5'-ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGC-
3'**

25

SEQ ID N° 7 - Secuencia de ADN de la región CDR-3 de la cadena VH:

5'-TGGCGTGATTCGCCTTTG-3'

30

SEQ ID N° 13 - Secuencia de ADN de la región CDR-1 de la cadena VL:

35

**5'-GGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAG-
3'**

40

SEQ ID N° 15 - Secuencia de ADN de la región CDR-2 de la cadena VL:

5'-AGCACAAACACTCGCTCTTCT-3'

45

y SEQ ID N° 17 - Secuencia de ADN de la región CDR-3 de la cadena VL:

50

5'-GTGCTGTATATGGGTAGTGGCCAGTATGTA-3'

55

Tal como se publicó previamente (49), las regiones CDR (regiones determinantes de la complementariedad) corresponden a las regiones que concurren para definir el sitio de contacto entre el antígeno y el anticuerpo. Así, están específicamente implicadas en la especificidad de unión. Las secuencias de aminoácidos correspondientes se indican como:

SEQ ID N° 4 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-1 de la cadena VH: SYWIG

60

SYWIG

SEQ ID N° 6 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-2 de la cadena VH:

65

IYPGDSDTRYSPSFQG

ES 2 334 895 T3

SEQ ID N° 8 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-3 de la cadena VH:

WRDSPL

5

SEQ ID N° 14 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-1 de la cadena VL:

GLSSGSVSTSYYP

10

SEQ ID N° 16 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-2 de la cadena VL:

STNTRSS

15

SEQ ID N° 18 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-3 de la cadena VL:

VLYMGSGQYV

20

25 En particular, el ligador es un fragmento peptídico o péptido, por ejemplo de una longitud de alrededor de 15 residuos de aminoácidos, que preferiblemente comprende residuos de glicocola.

30 Un aspecto adicional de la invención es el uso de tales secuencias de ADN, en particular las que codifican VH; VL y CDR-1 -2 y -3 de VH y CDR-1, -2 y -3 de VL para la construcción de proteínas quiméricas y proteínas de fusión, de las cuales las anteriores secuencias de aminoácidos representan la porción dotada de especificidad de unión, o capaz de conferir tal especificidad.

Dentro del alcance de la presente invención están las proteínas de fusión que comprenden al menos dos regiones funcionales diferentes, tanto VH como VL, o SEQ ID N° 20.

35 Parte de la descripción describe el procedimiento para el aislamiento de scFv anti-ErbB2 humano a partir de una biblioteca de fagos de fragmentos de anticuerpos de origen humano (Griffin 1.). El minianticuerpo identificado muestra una actividad antiproliferativa intrínseca, intensa y selectiva sobre las células que sobreexpresan ErbB2. Se ha aislado por medio de una selección llevada a cabo en una biblioteca de fagos realizando una inmunoadsorción con el antígeno expresado *in vivo* en células vivas que sobreexpresan el antígeno ErbB2. La estrategia de selección se basó en el uso de dos combinaciones de líneas celulares, que comprendían una línea celular ErbB2-positiva y una ErbB2-negativa. Mediante esta aproximación se ha descubierto que el scFv expresado en fagos (denominado Ph-Erbicina) reconoció específicamente el receptor ErbB2, sin reactividad cruzada con el EGFR relacionado estructuralmente (ErbB1) expresado a niveles elevados en células A431 (Tabla I). Se debe subrayar que el scFv aislado pudo distinguir ErbB2 de todos los demás miembros de la familia ErbB, tales como ErbB3 y ErbB4, expresados a muy bajo nivel en las líneas celulares SK-OV-3 y SKBR3, respectivamente.

50 El scFv anti-ErbB2 (minianticuerpo) se ha obtenido también en forma soluble como una proteína pura a partir del extracto periplásmico de células bacterianas infectadas con el clon de fagos positivos. Se ha descubierto que el scFv anti-ErbB2 en su forma soluble, denominado Erbicina, mantiene su especificidad de unión al receptor.

55 Se ha descubierto que Ph-Erbicina y Erbicina se interiorizan rápidamente mediante endocitosis en las células que sobreexpresan ErbB2. Además, ambos inmunorreactivos muestran un efecto antiproliferativo intenso sobre las líneas celulares ErbB2-positivas, y el grado correspondiente de su actividad antitumoral se correlaciona con el nivel de expresión de ErbB2 en las superficies celulares (Tabla I). No se ha detectado ningún efecto sobre las líneas celulares ErbB2-negativas.

60 Se ha descubierto que Ph-Erbicina tiene un efecto antiproliferativo (citostático) sobre todas las células tumorales ErbB2-positivas, mientras su efecto sobre SKBR3 es citotóxico, con la inducción de la apoptosis. El mecanismo que es la base de esta elevada sensibilidad de las células SKBR3 hacia los inmunorreactivos anti-ErbB2 parece depender de un bucle de activación autocrino, a su vez dependiente de la sobreexpresión no solamente del receptor ErbB2, sino también de su ligando. Este bucle sería interrumpido por scFv anti-ErbB2.

65 Ph-Erbicina es el primer ejemplo de scFv humano expresado en fagos, con una acción citostática/citotóxica dependiente de la dosis. De hecho, se ha descubierto que el scFv anti-ErbB2 informado aquí es más activo como agente antitumoral cuando se expresa en un fago que en su formato soluble. Probablemente, el scFv expresado en el fago es más estable, y/o adquiere una conformación diferente que incrementa su efecto biológico. De manera alternativa, aunque la mayoría de los fagos expresan un único scFv, no se puede excluir la posibilidad de que ciertos fagos expresen

más copias de los fragmentos scFv. Este incremento de la valencia de anticuerpos puede explicar la eficacia superior del scFv en el formato en fagos.

En cualquier caso, el scFv anti-ErbB2 humano según la invención es capaz, tanto en su formato soluble como en fago, de ser interiorizado de manera eficaz por las células objetivo que sobreexpresan ErbB2, y de inhibir específicamente su crecimiento, o de generar un efecto citotóxico. Dado su origen completamente humano, la Erbicina soluble no sería inmunógena en pacientes humanos; por tanto, representa un principio activo ideal para la terapia antineoplásica en la que las células tumorales expresan el receptor ErbB2, tales como las células de los carcinomas de mama, ovario y pulmón.

Además, tanto Ph-Erbicina como Erbicina, por su interiorización eficaz en las células objetivo, se pueden usar como vehículos para dirigir fármacos o toxinas (conocidos para el experto) al citosol de las células tumorales seleccionadas como objetivo. Esto debería incrementar el potencial antitumoral de las moléculas transportadas, fusionadas en quimeras con el scFv, y debería disminuir su posible toxicidad sistémica.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden como principio activo una cantidad eficaz de Erbicina, soluble o en formato en fagos; Erbicina como proteína fusionada a las regiones constantes de anticuerpos humanos, o a toxinas o moléculas con potencial citotóxico, tales como enzimas con actividad ribonucleasa o proteasa.

A este respecto, ya se ha preparado: 1. una proteína de fusión completamente humana, denominada ERB-Ab, constituida por Erbicina fusionada a las regiones constantes de las inmunoglobulinas humanas G1; 2. una InmunoRNasa, es decir, una proteína de fusión completamente humana, denominada hERB-RNasa, constituida por Erbicina fusionada a una enzima humana con actividad de ribonucleasa (ribonucleasa pancreática humana).

Erb-Ab es prácticamente un anticuerpo completamente humano, capaz de reconocer específicamente células tumorales ErbB2-positivas y destruirlas de manera selectiva. Representa un fármaco anticanceroso potencialmente más eficaz que el fragmento de anticuerpo de cadena simple correspondiente (Erbicina). Debido a su tamaño mayor y a la presencia de una porción Fc, se espera que Erb-Ab tenga una semivida más larga en los fluidos corporales humanos, y un efecto citotóxico más intenso sobre las células objetivo, obtenido mediante la activación de las reacciones de ADCC (citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos) y de CDCC (citotoxicidad celular dependiente del complemento). La preparación de ERB-Ab se obtuvo por medio de las siguientes etapas básicas: (i) aislamiento del cADN que codifica Erbicina; (ii) fusión de dicho cADN a un cADN que codifica las regiones constantes (CH2 y CH3) y el péptido de la bisagra de las cadenas pesadas humanas de la inmunoglobulina G1, clonados en el vector de expresión pIgplus (Novagen). Se siguió la metodología estándar (50) descrita para reacciones de fusión similares de moléculas de scFv a regiones constantes de anticuerpos; (iii) expresión del cADN de fusión resultante en células eucarióticas (P3X de un mieloma murino).

La InmunoRNasa hERB-RNasa se obtuvo por medio de las siguientes etapas básicas: (i) fusión del cADN que codifica Erbicina al cADN que codifica la RNasa pancreática humana. Se interpuso un fragmento de ADN que codificaba un péptido espaciador de 11 residuos de aminoácidos (AAASGPEGGS, SEQ ID N° 24) entre las dos regiones codificantes; (ii) expresión del cADN de fusión resultante en *Escherichia coli*; (iii) aislamiento y caracterización de la proteína recombinante. Su caracterización estructural y funcional indicó que: (i) reconoce específicamente las células positivas para el receptor; (ii) está dotado de actividad enzimática (ribonucleolítica); (iii) se analiza con líneas celulares positivas y negativas para el receptor y destruye específicamente las células positivas para el receptor, y por lo tanto es capaz de distinguir entre las células objetivo y las que no lo son. La hERB-RNasa es la primera Inmuno-RNasa completamente humana, es decir, una proteína quimérica constituida por un resto de anticuerpo humano fusionado a una enzima humana ribonucleolítica.

Por su naturaleza humana, se espera que la hERB-RNasa se tolere bien en humanos, porque no es inmunógena y no es tóxica, ya que la ribonucleasa se hace tóxica solamente cuando se transporta a una célula objetivo. Debido a que contiene un resto de anticuerpo sumamente específico para las células tumorales que expresan el receptor ErbB2, la hERB-RNasa representa un nuevo fármaco anticanceroso prometedor para los carcinomas de mama, colon, ovario y otros carcinomas. Hasta la fecha, se usa un fármaco anticanceroso basado en un único anticuerpo en la terapia, con el nombre comercial Herceptina. Esta, sin embargo, es una molécula murina "humanizada". La inmunoRNasa basada en Erbicina, sin embargo, es completamente humana, y, de hecho, es el primer agente anticanceroso basado en un anticuerpo completamente humano.

Las composiciones farmacéuticas según la invención comprenden además aditivos, diluyentes, adyuvantes y excipientes conocidos para el experto en este campo. Además, las dosis y los protocolos de administración son funcionales para el sujeto y el tipo de enfermedad a tratar.

Se deben considerar dentro del alcance de la presente invención los vectores de expresión y de clonación tal como se exponen en las reivindicaciones, útiles para transfectar células procarióticas o eucarióticas con el fin de obtener la expresión del ADN o de secuencias de aminoácidos tal como se reivindican. Para optimizar o facilitar la purificación de los minianticuerpos recombinantes o de las secuencias proteicas descritas en la presente invención, éstas pueden contener regiones "marcadoras", p.ej. obtenidas mediante la expresión de las secuencias de ADN correspondientes fusionadas en el marco de lectura con las proteínas descritas. Un ejemplo de secuencia "marcadora" es la secuencia

ES 2 334 895 T3

de polihistidina (HHHHHH, SEQ ID N° 21), que permite la purificación de traducciones recombinantes en columnas de afinidad con metales pesados.

5 Los anticuerpos y las proteínas, así como los vectores según la presente invención, se pueden preparar convenientemente en forma de equipos, y usarlos para el diagnóstico o la terapia.

La presente invención se ilustrará en la presente memoria mediante ejemplos descriptivos no limitantes con referencia a las Figuras adjuntas.

10

Ejemplo 1

Selección Paralela en Diferentes Líneas Celulares para Aislar un scFv Humano Específico de ErbB2

15 La estrategia ideada para el aislamiento de un scFv anti-ErbB2 a partir de la biblioteca Griffin.1 (19) consistió en una selección doble, con el uso de dos combinaciones diferentes de líneas celulares “positivas”, es decir, que albergaban el antígeno, y “negativas”. En la primera combinación, se usaron células NIH 3T3 transfectadas con ADN que codifica ErbB2 humano (23) como células positivas para el antígeno, y células NIH 3T3 sin transfectar como células negativas para el antígeno. En la segunda combinación, se usó una línea celular de cáncer de mama humano, 20 que expresa de manera natural niveles elevados del receptor ErbB2 (células SKBR3), y una línea celular de carcinoma epidermoide humano (células A431), que expresa el receptor a niveles muy bajos, como células positivas y negativas para el antígeno, respectivamente. La estrategia de usar dos combinaciones de líneas celulares positivas y negativas se ideó para garantizar una selección eficaz de los clones anti-ErbB2.

25 En cada ronda de selección, se incubó una mezcla de células “positivas” (alrededor del 10%), marcadas previamente con un fluorocromo, y células “negativas” sin marcar (90%) con la biblioteca de expresión en fagos de anticuerpos (10^{13} ufc por selección). Las células negativas se usaron para reducir en la biblioteca de fagos los anticuerpos que se unen a antígenos comunes. Después de 16 h de incubación a 4°C, las células se lavaron, y las marcadas (alrededor de 1×10^6 células) se aislaron mediante separación de células activada por fluorescencia (FACS). Los fagos unidos a la 30 superficie celular se desplazaron (1×10^7 ufc) y se usaron para infectar la cepa bacteriana TG1 de *E. coli*. Inicialmente, se llevaron a cabo dos rondas de selección con las líneas celulares SKBR3 y A431. Los fagos positivos, que se unieron selectivamente a la línea celular ErbB2-positiva, se sometieron a dos rondas de selección adicionales, mediante el uso de la misma combinación de células (estrategia 1), o las líneas celulares NIH 3T3 transfectadas y sin transfectar (estrategia 2). La estrategia 2 se implementó para verificar la posibilidad de incorporar fagos con una afinidad de unión 35 superior mediante el uso de células que expresan niveles más bajos de ErbB2.

A partir de la última ronda de selección de las estrategias 1 y 2, se aisló un total de cuarenta clones, y se identificaron como clones ErbB2-positivos mediante cribado con ELISA, llevado a cabo con ambas combinaciones de células.

40 El ADN que codifica las regiones variables de estos clones positivos se amplificó mediante PCR, y después se analizó mediante digestión con las enzimas de restricción BstNI y BsaJI. Se obtuvieron dos patrones de digestión diferentes (denominados tipo A y B); éstos se observaron en clones aislados mediante la estrategia 1 o la estrategia 2. El análisis de la secuencia del ADN que codificaba las regiones variables de los múltiples clones seleccionados, representativos de cada patrón de restricción, identificó dos secuencias de cADN diferentes, que codificaban dos scFv 45 humanos nuevos. El descubrimiento de que estos scFv se seleccionaban independientemente mediante el uso de dos combinaciones diferentes de líneas celulares positivas y negativas para el antígeno llevó a considerarlos posibles candidatos de scFv específico de ErbB2.

50 Los análisis de la secuencia de los múltiples clones positivos de tipo A y B indicaron que la región variable de la cadena pesada (VH) del scFv de tipo A perteneció a la familia VH5 (derivada del gen DP-73 de la línea germinal de VH), mientras la región VH del scFv de tipo B perteneció a la familia VH3 (derivada del gen DP-38). Se descubrió que la región variable de la cadena ligera (VL) del scFv de tipo A y B perteneció a las familias VL8 (derivada del gen DPL-21 de la línea germinal de VL) y VL1 (gen DPL-3), respectivamente.

55 Se usaron clones representativos de tipo A y B para los análisis adicionales.

Ejemplo 2

Caracterización de la Especificidad de los Anticuerpos de Fagos

60 Para verificar si estos clones eran realmente específicos para ErbB2, se analizaron en su formato en fagos mediante transferencia de Western llevada a cabo con extractos celulares ricos en antígeno preparados a partir de la línea celular SKBR3. Tal como se muestra en la Fig. 1, los fagos que expresaban scFv positivos (N.B.: del clon A7) reconocieron una proteína de aproximadamente 185 kDa, el peso molecular esperado para el antígeno ErbB2. En el mismo experimento, se reconoció una proteína que correspondía al mismo tamaño molecular mediante el mAb MgR6 murino (24), que se sabe que se dirige contra ErbB2 (25, 26). No se detectaron bandas positivas cuando se usó una preparación de fagos con un scFv anti-tiroglobulina como control negativo (véase la Fig. 1). De manera notable, también

ES 2 334 895 T3

se obtuvo una banda positiva del peso molecular esperado (véase la Fig. 1) cuando la transferencia de Western se llevó a cabo con el clon de fagos de tipo A con ErbB2 previamente aislado de extractos de células SKBR3 mediante inmunoprecipitación con el mAb MgR6 anti-ErbB2.

5 Estos resultados confirman de manera inequívoca que los scFv del clon de tipo A se unieron específicamente a ErbB2. Debido a que el clon de tipo B reconoció la banda de la proteína ErbB2, pero también proteínas adicionales en el lisado celular (datos no mostrados), se llevaron a cabo análisis adicionales con el clon A, denominado Ph-Erbicina (scFv en su formato en fagos).

10 Se analizó Ph-Erbicina mediante citometría de flujo en función de su capacidad de unirse a un panel de líneas celulares tumorales humanas que expresan niveles elevados de ErbB2. Se eligieron las líneas celulares que no se habían usado previamente en el procedimiento de aislamiento de fagos. Las células se incubaron con Ph-Erbicina, se lavaron dos veces con PBS, y se trataron con un mAb murino dirigido contra el fago M13. Para la detección se usó IgG anti-ratón de conejo marcado con fluorescencia.

15 Tal como se muestra en la Fig. 2 (paneles A, C y E) y en la Tabla I, Ph-Erbicina proporcionó un marcaje intenso de las células MDA-MB453 y BT-474 de carcinoma de mama, y de las células SK-OV-3 de adenocarcinoma ovárico. Al contrario, no se detectó fluorescencia cuando las mismas células se incubaron con un fago-scFv anti-NIP irrelevante (27). La intensidad de marcaje producida mediante Ph-Erbicina fue comparable a la obtenida con el mAb MgR6 murino anti-ErbB2 (Fig. 2, paneles B, D y F).

También se obtuvieron resultados positivos con células SKBR3 y células NIH 3T3 transfectadas con ErbB2 sometidas a análisis con Ph-Erbicina, mientras no se detectó unión a células NIH 3T3 sin transfectar con ErbB2 o a la línea celular A431 (véase la Tabla I) que expresaban ErbB2 a niveles bajos (28, 29). Se debería observar que las células 25 A431 expresan el receptor de EGF homólogo a un nivel elevado (2×10^6 receptores por célula) (30, 31).

Estos resultados demuestran que Ph-Erbicina: (i) puede distinguir entre las líneas celulares que expresan ErbB2 y las que no lo expresan; (ii) reconoce específicamente del dominio extracelular de ErbB2; y (iii) distingue entre los 30 receptores ErbB2 y EGFR a pesar de su gran identidad de secuencias.

Además, los datos sugieren una correlación positiva entre el grado de unión de Ph-Erbicina a las células ErbB2-positivas y el nivel de expresión de ErbB2 en estas líneas celulares. Esto se determinó mediante los resultados obtenidos con el mAb MgR6 anti-ErbB2 (véase la Tabla I). Ya que MgR6 titula de manera eficaz ErbB2 en la superficie celular, los datos de fluorescencia obtenidos con este mAb representan una medida de los niveles de expresión del receptor en 35 las líneas celulares analizadas.

Ejemplo 3

40 *Expresión y Caracterización de Erbicina Soluble*

Para preparar scFv anti-ErbB2 humano a partir del clon de tipo A en forma de una molécula soluble, se usó el vector de fagómido pHEN2 (un derivado del vector pHEN1 (27)) que contenía el ADN que codifica Erbicina para transformar la cepa bacteriana SF110 (32). Tras la inducción con IPTG, se preparó un extracto periplásmico como se describió previamente (33). 45

Para verificar si el scFv anti-ErbB2 soluble conservó las propiedades de unión del scFv expresado en fagos, el extracto periplásmico se analizó mediante ELISA, así como mediante citometría de flujo con el uso de las líneas celulares analizadas con Ph-Erbicina. Los resultados de ambos análisis demostraron que el scFv anti-ErbB2 soluble se une selectivamente a las células que albergan el antígeno (datos no mostrados). En su formato soluble, el inmunorreactivo scFv se denominó Erbicina. 50

Debido a que el cADN que codifica el scFv se clonó en el vector pHEN2 fusionado a la secuencia C-terminal de hexahistidinas (SEQ ID N° 21), la Erbicina recombinante se purificó mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) mediante el uso de agarosa Ni-NTA, y después se analizó mediante electroforesis de SDS-PAGE. Se obtuvo una única banda del peso molecular esperado (alrededor de 27 kDa) mediante tinción con azul de Coomassie (Fig. 3). La Erbicina purificada se analizó también mediante transferencia de Western con un mAb anti-marcador de His, o con el mAb 9E10 anti-myc (dirigido contra el péptido de 11 residuos de la proteína myc fusionado en el extremo C-terminal del scFv). Mediante ambos análisis, se visualizó una banda del tamaño esperado, 60 de aproximadamente 27 kDa (Fig. 3).

Ejemplo 4

65 *Interiorización de Ph-Erbicina y Erbicina por las Células SKBR3*

Después se analizó el scFv anti-ErbB2 humano nuevo, tanto en el formato en fagos como en el formato soluble, en función de su capacidad de experimentar la endocitosis mediada por receptores en las células SKBR3. Para analizar el

ES 2 334 895 T3

inmunorreactivo en el formato en fagos, se incubaron células cultivadas en cubreobjetos con Ph-Erbicina (10^{11} ufc/ml) durante 16 horas a 37°C . Después se lavaron las células exhaustivamente con PBS para eliminar la unión inespecífica, seguido de cuatro lavados con un tampón de separación de glicocola de concentración salina elevada y pH bajo para retirar los fagos unidos específicamente a la superficie celular (34). Después, las células se fijaron y se permeabilizaron, y los fagos interiorizados se visualizaron con un mAb anti-M13, seguido de un anticuerpo de conejo anti-IgG de ratón conjugado con FITC. Como control, se usó una preparación de fago-scFv anti-NIP (10^{12} ufc/ml).

Se observó una tinción intracelular intensa mediante microscopia confocal para Ph-Erbicina, mientras no se detectó tinción con el fago-scFv anti-NIP (véase la Fig. 4, paneles A y D). Para determinar si las partículas infecciosas de fagos equipados con anticuerpos se podrían recuperar del interior de las células, se repitió el experimento con células cultivadas en placas de 6 pocillos, incubadas después con los fagos que portaban los anticuerpos durante 2 horas a 37°C . Después del último lavado de separación, las células se disociaron de las placas de cultivo mediante tripsinización, se lavaron tres veces con PBS y después se lisaron con trietilamina 100 mM (TEA). Las partículas de fagos, recuperadas de los lisados celulares, se titularon mediante la infección de la cepa TG1 de *E. coli*, tal como se describió previamente (34). El título de Ph-Erbicina en la fracción de TEA fue mucho mayor (al menos un orden de magnitud) que el obtenido mediante el uso de un fago-scFv anti-tiroglobulina como control (datos no mostrados).

Estos resultados indican que existe una correlación estrecha entre la endocitosis de las partículas de fagos y la elevada especificidad por el antígeno del scFv expresado en los fagos.

Para determinar si la Erbicina-A7 soluble también se interiorizó de manera eficaz, el scFv se incubó con las células SKBR3 cultivadas en cubreobjetos durante 2 ó 16 horas a 37°C . El scFv intracelular se identificó mediante microscopia confocal mediante el uso del mAb 9E10 anti-myc, seguido de anticuerpo de conejo anti-ratón conjugado con FITC. Cuando se incubó con Erbicina, se visualizó una fluorescencia intracelular intensa (Fig. 4, paneles B y C), mientras no se detectó tinción tras la incubación durante los mismos periodos de tiempo con un scFv soluble anti-NIP irrelevante (Fig. 4, paneles E y F), expresado y purificado como se describió para Erbicina.

Ejemplo 5

Efecto sobre la Fosforilación de Tirosinas de ErbB2

Ya que los receptores de tirosina quinasa se activan por la unión del ligando con un incremento de la fosforilación de tirosina en el dominio C-terminal, se analizó el efecto de Erbicina sobre la fosforilación de ErbB2. Se trataron células SKBR3, privadas de nutrientes durante 16 h, durante periodos de tiempo crecientes a 37°C con Erbicina ($12\ \mu\text{g/ml}$). Las células se lisaron y se analizaron alícuotas equivalentes de los extractos mediante transferencias de Western en paralelo, mediante el uso de un mAb específico para fosfotirosina (mAb P-Tyr), o mAb MgR6 anti-ErbB2. Ambos análisis se llevaron a cabo en presencia de un mAb anti-actina para comparar directamente los niveles de receptor ErbB2 con los de fosforilación de tirosinas. La intensidad de la señal de las bandas positivas se estimó mediante autorradiografía. En la Fig. 5 se muestra el efecto de Erbicina sobre la fosforilación de ErbB2. Después de 1 h de tratamiento ya fue detectable un efecto inhibitorio intenso de la fosforilación, y después de 7 h la inhibición alcanzó un 74% en comparación con las células sin tratar. En el mismo experimento, EGF, usado como control positivo, estimuló de manera eficaz la fosforilación de ErbB2 (véase el inserto de la Fig. 5). Este efecto estimulador de EFG se redujo significativamente cuando las células se incubaron previamente con Erbicina (véase el inserto de la Fig. 5).

Ejemplo 6

Efecto sobre la Proliferación de Células Tumorales

Se ha demostrado que ciertos mAbs anti-ErbB2 son interiorizados e inhiben la expresión de ErbB2, lo que podría dar como resultado la inhibición del crecimiento celular (4, 35). Debido a que tanto Ph-Erbicina como Erbicina-A7 son interiorizados, se analizó su efecto sobre la proliferación de las células objetivo.

Las células se colocaron en placas en presencia o en ausencia de concentraciones crecientes de Ph-Erbicina. Después de intervalos de tiempo adecuados, se midió el grado de proliferación celular mediante recuentos celulares (Fig. 6A) o síntesis de ADN (Fig. 6B). Como control, se repitió el experimento con preparaciones de fagos que carecían del resto de Erbicina, o que expresaban scFv irrelevantes, tales como anti-NIP o anti-gp200-MR6 (36). Cuando se analizaron con células SKBR3 durante 72 horas, se descubrió que Ph-Erbicina inhibía intensamente su proliferación, con un efecto citotóxico dependiente de la dosis (Fig 6A). Se calculó el valor de CI_{50} , es decir, la concentración capaz de inhibir la proliferación celular un 50%, de $2,8 \times 10^{10}$ ufc/ml. No se detectó ningún efecto sobre la proliferación celular con los fagos de control (Fig 6B). Además, Ph-Erbicina no tuvo efecto sobre la proliferación de las células A431 (véase la Fig. 6A), lo que indica la naturaleza selectiva de la actividad de este reactivo.

Cuando el scFv anti-ErbB2 se analizó con células SKBR3 en su formato soluble, es decir, como Erbicina (véase la Fig. 6C y D), se descubrió que mantenía su capacidad de inhibir intensamente la proliferación celular, y de reducir el número de células viables de una manera dependiente de la dosis, con un valor de CI_{50} de $6,4\ \mu\text{g/ml}$ (Fig. 6C). No se detectó ningún efecto con el scFv anti-NIP de control; de manera similar, se descubrió que Erbicina era ineficaz

ES 2 334 895 T3

sobre las células A431. Además, el efecto de Erbicina se analizó también con fibroblastos NIH 3T3 transfectados con ErbB2. En este caso, dado el nivel más bajo de ErbB2 en las células transfectadas en comparación con las células SKBR3 (véase la Tabla I), las células se privaron de nutrientes antes del tratamiento, para incrementar el efecto del inmunorreactivo (15 $\mu\text{g/ml}$). En estas condiciones, sobrevivieron menos de un 50% de las células, mientras las células sin transfectar, analizadas en paralelo, no se vieron afectadas por Erbicina (datos no mostrados).

Estos resultados indican que el nuevo scFv anti-ErbB2 humano exhibe su capacidad de inhibir la proliferación de las células objetivo tanto en su formato soluble (Erbicina) como en su formato en fagos (Ph-Erbicina).

Para comparar directamente la potencia de las actividades citotóxicas de Erbicina y Ph-Erbicina sobre las células SKBR3, se expresó el valor de CI_{50} de $2,8 \times 10^{10}$ ufc/ml calculado para Ph-Erbicina (véase anteriormente) también en cuanto a la concentración de scFv (1,3 ng/ml) en la preparación de fagos, suponiendo que hay presente una molécula de scFv por partícula de fago. Comparando este valor con el obtenido con Erbicina (6,4 $\mu\text{g/ml}$, véase la Fig. 6C), el scFv en el formato en fagos pareció ser de alrededor de 5000 veces más activo como agente antitumoral que el scFv soluble.

La capacidad de Ph-Erbicina de inhibir la proliferación celular se analizó también con otras células tumorales humanas que expresan niveles elevados de ErbB2, tales como células MDA-MB453, BT-474, y SK-OV-3, y con fibroblastos NIH 3T3 murinos transfectados con ErbB2 humano. La proliferación de todas estas líneas celulares ErbB2-positivas se inhibió intensamente mediante Ph-Erbicina, mientras no se detectó ningún defecto antiproliferativo en las células A431 ErbB2-negativas y en los fibroblastos NIH 3T3 sin transfectar (véase la Tabla I). Los valores de CI_{50} obtenidos con estas células ErbB2-positivas están en el intervalo de 10^{11} ufc/ml, es decir, un orden de magnitud mayor que el valor determinado para las células SKBR3. También se debería indicar que el efecto de Ph-Erbicina sobre estas cuatro líneas celulares pareció ser citostático, más que citotóxico, ya que en ningún momento se observó que el número de células supervivientes fuera menor que el número de células sembradas en las placas. La sensibilidad mayor de las células SKBR3 hacia Ph-Erbicina se confirma adicionalmente por la observación de que la incubación de las células SKBR3 con Ph-Erbicina conduce a un cambio drástico en la morfología celular y la aparición de restos celulares; no se observaron tales cambios con las otras líneas celulares ErbB2-positivas analizadas en este estudio (Fig. 7). Estos datos indican que la reducción drástica de las células viables observada para las células SKBR3 tratadas con los reactivos de Erbicina se debe a la inducción de la muerte celular.

Para determinar si el mecanismo de la muerte celular se da por medio de la inducción de la apoptosis, se usó anexina V para medir la aparición de fosfatidilserina, un marcador de la apoptosis, en la lámina externa de la membrana plasmática de las células SKBR3. Se descubrió que las células tratadas con Ph-Erbicina o Erbicina unían el doble de anexina V conjugada con FITC que las células sin tratar o las células tratadas con un scFv anti-NIP de control, en su formato en fagos o en su formato soluble (Tabla II). Esto indica que la muerte celular inducida por Erbicina es la de la apoptosis.

TABLA I

Análisis mediante FACS de la unión de Ph-Erbicina a una serie de líneas celulares que expresan diferentes niveles de ErbB2

La unión se midió a partir de la intensidad de fluorescencia media (MFI). Se midieron los niveles de expresión de receptores con el mAb murino MgR6 como anticuerpo anti-ErbB2 específico. También se tabuló el efecto de Ph-Erbicina sobre la proliferación celular tras 96 h de tratamiento, expresado en forma de valores de CI_{50} .

<u>Línea celular</u>	<u>Inhibición del crecimiento</u>	<u>Unión de ErbB2</u>	
	(CI_{50} , ufc/ml)	(MFI) ^a	
	Ph-Erbicina	Ph-Erbicina	mAb MgR6
SKBR3	$1,2 \times 10^{10}$	423	260
MDA-MB453	$1,4 \times 10^{11}$	260	160
BT-474	$2,5 \times 10^{11}$	100	145
NIH 3T3	$3,5 \times 10^{11}$	161	120
(transf. con ErbB2)			

ES 2 334 895 T3

SK-OV-3	4,0 x 10 ¹¹	90	92
NIH 3T3	-- ^b	30	10
A431	-- ^b	0	0

^a Los valores tabulados se obtuvieron restando de los valores de MFI el nivel de fluorescencia basal determinado con inmunorreactivos de control adecuados del mismo isotipo; éstos fueron el mAb OKT3 y el scFv anti-NIP, para los datos obtenidos con el mAb MgR6 y Ph-Erbicina, respectivamente.

^b No se observó ningún efecto sobre la proliferación celular hasta 4,0 x 10¹¹ ufc/ml de Ph-Erbicina.

TABLA II

Apoptosis de células SKBR3 tratadas durante 24 h con Ph-Erbicina, Erbicina o inmunorreactivos irrelevantes

	<u>% de células apoptóticas</u>	Proporción MFI ^a (células tratadas / células de referencia)
células de referencia	16	1
Ph-anti-NIP	16	1
Ph-Erbicina	30	2
scFv anti-NIP	19	1
Erbicina	34	2
puromicina ^b	35,6	1,7

^a MFI es la intensidad media de fluorescencia medida por FACS tras el tratamiento de las células SKBR3 con Anexina V conjugada con FITC.

^b El efecto de puromicina sobre las células SKBR3 se determinó después de una incubación de 4 h.

Ejemplo 7

Cultivos celulares

La línea celular de tumor de mama humano SKBR3 y la línea celular de carcinoma epidermoide humano A431 (amablemente proporcionadas por Menarini Research, Pomezia, Italia) se cultivaron en RPMI 1640 (Gibco BRL, Life Technologies, Paisley, R.U.). Las líneas celulares de tumor de mama humano BT-474 y MDA-MB453 (una amable donación de H. C. Hurst, ICRF, Londres), la línea celular de ovario humano SK-OV-3 (una amable donación de I. McNeish, ICRF, Londres), y los fibroblastos murinos NIH-3T3 (American Type Culture Collection, Rockville, MD, EE.UU., código n° CRL-1658) se cultivaron en DMEM (Gibco BRL). La línea de fibroblastos NIH-3T3 transfectados con ErbB2 humano, amablemente proporcionada por N. E. Hynes (*Friederick Miescher Institute*, Suiza), se cultivó en DMEM que contenía 1 mg/ml de G418 (Gibco BRL). Los medios se complementaron con un 10% de suero bovino fetal, 50 unidades/ml de penicilina, y 50 µg/ml de estreptomycin (todos de Gibco BRL).

ES 2 334 895 T3

Ejemplo 8

Anticuerpos

5 Se usaron los siguientes anticuerpos en el presente estudio: mAb anti-M13 murino (Amersham Pharmacia Biotech, Little Chalfont, R.U.); mAb murino 9E10 dirigido contra la proteína marcadora myc (45); mAb murino anti-marcador de His (Qiagen, West Sussex, R.U.); mAb MgR6 murino anti-ErbB2 (donación de Menarini Research, Pomezia, Italia) (24); anticuerpo de conejo anti-inmunoglobulina de ratón conjugado con FITC, e inmunoglobulinas de conejo anti-ratón conjugadas con HRP (ambos de Dako, Cambridgeshire, R.U.); mAb P-Tyr murino anti-fosfotirosina (PY99) (Santa Cruz Biotechnology Inc., Santa Cruz, CA); el scFv anti-gp200-MR6 se aisló como se describe en (36); mAb
10 murino anti-actina (Sigma, St. Louis, MO, EE.UU.). Los scFv anti-NIP (4-hidroxi-3-nitro-5-yodofenilacetilo) (27) y anti-tiroglobulina fueron amablemente proporcionados por el Dr. G. Winter.

15 Ejemplo 9

Selecciones de scFv-fago con células vivas

Las células ErbB2-positivas se marcaron como sigue. La línea de células SKBR3 de tumor de mama humano, que expresan de manera natural niveles elevados de ErbB2, y los fibroblastos NIH-3T3, transfectados con ErbB2 humano, cultivados en matraces de 250 ml (Becton Dickinson, Oxford, R.U.) hasta un 70-80% de confluencia, se separaron con la disolución de disociación celular, adquirida de Sigma, y se lavaron dos veces con PBS. Las células se resuspendieron después en 1 ml de PBS precalentado, que contenía 15 μ M de 5(6)-CFDA, SE (diacetato de 5-(y 6)-carboxifluoresceína, isómeros mezclados de éster de succinimidilo) (Molecular Probes, Eugene, OR), y se incubaron
20 durante 30 min a 37°C. Después de tres lavados con PBS frío, las células se resuspendieron (1×10^6 células/ml), y se analizó el nivel de fluorescencia mediante citometría de flujo antes de cada ronda de selección de fagos.

Las partículas de fagómidos se recuperaron con M13-K07 de la biblioteca Griffin, tal como se ha descrito previamente (18). Para cada ronda de inmunoadsorción, los fagos (10^{13} ufc) se bloquearon con un 5% de leche en polvo (Marvel) en PBS durante 15 min. Los fagos bloqueados se incubaron durante 16 horas a 4°C con células marcadas "positivas" (1×10^6) en presencia de células sin marcar "negativas" (9×10^6) con rotación suave, en un volumen final de 5 ml que contenía un 2% de Marvel. Las células se centrifugaron después a 600 x g durante 5 min a 4°C, y se lavaron dos veces en 50 ml de PBS. Las células marcadas "positivas" se separaron mediante FACS. Para eluir los fagos de las células "positivas", éstas se incubaron con 0,5 ml de PBS que contenía ácido cítrico 50 mM (pH 2,5) durante 5 min,
35 y después se neutralizaron con 0,4 ml de Tris-HCl 1 M de pH 7,4. Los fagos recuperados se amplificaron infectando células *E. coli* TG1, para preparar los fagos para la siguiente ronda de selección. El cribado de los fagos se llevó a cabo mediante ensayos de ELISA con células tal como se ha descrito previamente (46).

40 Ejemplo 10

Análisis de diversidad de clones

Para determinar el número de clones individuales seleccionados, se llevó a cabo un análisis de huella del ADN con la endonucleasa de restricción BstNI o BsaJI (New England Biolabs, Hertfordshire, R.U.), tal como se ha descrito (18). Se amplificó el ADN que codificaba la región variable de los clones positivos mediante PCR del plásmido pHEN2, mediante el uso de los cebadores 5'-CAGTCTATGCGCCCAT TCA-3', SEQ ID N° 22 (complementario a la secuencia localizada entre el gen III y el marcador peptídico *c-myc*) y 5'-ATGAAATACCT ATGCCTACG-3', SEQ ID N° 23 (secuencia líder de pel B).
50

Las reacciones se llevaron a cabo con la ADN polimerasa Taq (Promega, Southampton, R.U.) en un volumen de 20 μ l durante 30 ciclos con las siguientes condiciones: 30 segundos de desnaturalización a 94°C, 30 segundos de renaturalización a 55°C, y 1 min de extensión a 72°C. Los productos amplificados, analizados mediante electroforesis en un gel de un 1% de agarosa, se usaron para los análisis de huella del ADN y de secuencia. Las secuencias de nucleótidos que codifican scFv se determinaron mediante el uso del secuenciador automatizado ABI (Perkin Elmer, Warrington, R.U.) y se analizaron con el programa de alineación de secuencias V-BASE [Tomlinson I.M., Williams S.C., Corbett S.J., Cox J.P.L. y Winter G. (1996). The V BASE Directory of Human Variable Gene Sequences. MRC Centre for Protein Engineering, Hills Road, Cambridge, CB2 2QH, R.U. (<http://www.mrc-cpe.cam.ac.uk/imt-doc/vbase-home-page.html>)].
60

Ejemplo 11

Lisis celular, inmunoprecipitación y análisis mediante transferencia de Western

65 Se prepararon lisados celulares de SKBR3 resuspendiendo en 0,5 ml de tampón de lisis (Tris-HCl 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, 0,5% de Nonidet P-40) que contenía inhibidores de proteasas (inhibidor de proteasas Complete™, Boehringer Mannheim, Alemania) alrededor de $7,5 \times 10^6$ células, previamente separadas con la disolución de disocia-

ES 2 334 895 T3

ción (Sigma), y se lavaron 3 veces con PBS. Después de 20 min a 0°C, los extractos se aclararon mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 10 min. La inmunoprecipitación de ErbB2 se llevó a cabo incubando el mAb MgR6 anti-ErbB2 con los lisados celulares durante 3 horas a 4°C. El inmunocomplejo se recogió después mediante adsorción con proteína G-Sepharose (Sigma) durante 1 hora a 4°C. Después de cuatro lavados, las proteínas, liberadas mediante
5 ebullición en tampón de carga (47), se fraccionaron mediante electroforesis en gel del 7,5% con SDS (SDS-PAGE) y se electrotransfirieron a membranas de PVDF (Millipore Corporation, Bedford, MA, EE.UU.). La proteína ErbB2 se detectó mediante el uso de preparaciones de mAbs anti-ErbB2 o scFv-fagos, tal como se ha descrito previamente (36).

10 Ejemplo 12

Preparación de anticuerpos monoclonales en fagos para los ensayos funcionales

Los fagos que portaban scFv se prepararon a partir de colonias individuales resistentes a ampicilina cultivadas en
15 100 ml de medio 2xTY, se purificaron mediante precipitación con polietilenglicol (PEG) (48) y se lavaron con 20 ml de agua estéril. Tras una etapa adicional de precipitación con PEG, los fagos se resuspendieron en PBS, se centrifugaron a 12.000 rpm durante 15 min y se almacenaron a 4°C hasta su uso posterior.

20 Ejemplo 13

Expresión y purificación de scFv soluble

Los cultivos de *E. coli* SF110, previamente infectados con Ph-Erbicina o con fago-scFv anti-NIP, se cultivaron a
25 37°C en medios 2xTY que contenían 100 µg/ml de ampicilina y un 1% de glucosa, hasta que se alcanzó una absorbancia de 1 a 600 nm. Las células se centrifugaron a 6.000 rpm durante 15 min y se resuspendieron en medio exento de glucosa. La expresión de scFv soluble se indujo después mediante la adición de IPTG (Alexis, Nottingham, R.U.) hasta una concentración final de 1 mM en el cultivo celular, que después se cultivó a temperatura ambiente durante la noche. Las células se recogieron mediante centrifugación a 6.000 rpm durante 15 min, y se obtuvo un extracto
30 periplásmico resuspendiendo las células en Tris-HCl helado 50 mM, pH 7,4, EDTA 1 mM, 20% de sacarosa. Tras una incubación de 1 hora en hielo, el extracto periplásmico, obtenido mediante centrifugación a 12.000 rpm durante 30 min a 4°C, se dializó en PBS. De manera alternativa, se aislaron las proteínas periplásmicas solubles mediante el uso del tampón B-PER (Pierce, Rockford, IL) según las recomendaciones del fabricante.

El scFv soluble se purificó mediante cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC), incubando el extracto periplásmico con agarosa Ni-NTA (Qiagen, West Sussex, R.U.) durante la noche a 4°C. Tras lavados exhaustivos con PBS, que contenía imidazol 20 mM, la proteína se eluyó con NaH₂PO₄ 50 mM, pH 8,0, que contenía NaCl 0,3 M e imidazol 250 mM. Se llevó a cabo una purificación adicional mediante filtración en gel con una columna Superdex 75 Hi-Load 10/30 (FPLC) (Pharmacia Biotech, Upsala, Suecia) equilibrada con PBS que contenía NaCl 0,16 M, llevada
40 a cabo a un caudal de 0,3 ml/min. La pureza de la preparación final se determinó mediante SDS-PAGE. Las bandas de proteínas se detectaron mediante tinción de Coomassie. El scFv purificado, analizado mediante transferencia de Western, se detectó mediante el uso del mAb 9E10 o del mAb anti-marcador de His, seguido de mAb de conejo anti-ratón conjugado a HRP, tal como se describió previamente (36).

45 Ejemplo 14

Determinación de la fosforilación de tirosinas

Se cultivaron células SKBR3 durante 24 h en medio RPMI sin suero, y después se trataron con EGF (Collaborative Research Inc., Waltham, MA), o Erbicina soluble, a una concentración de 100 ng/ml y 12 µg/ml, respectivamente, en medio fresco sin suero. En los momentos indicados las células se lavaron con PBS, se recogieron y se lisaron en presencia de ortovanadato sódico 1 mM. Se llevaron a cabo análisis de transferencia de Western con un mAb anti-fosfotirosina. Se cuantificó la intensidad de la señal de las bandas reactivas con un Phosphorimager (GS710, Biorad,
55 Hercules, CA).

Ejemplo 15

Interiorización de anticuerpos de fagos y scFv nativo

Se incubaron células cultivadas en cubreobjetos hasta una confluencia del 60% con fagos (10¹¹ ufc/ml) o scFv nativo (20 µg/ml) durante 2 ó 16 horas a 37°C. Después las células se lavaron, se fijaron y se permeabilizaron como se describe en otra parte (34). Se detectaron los fagos intracelulares o scFv con mAb anti-M13 o mAb 9E10, respectivamente, seguido de inmunoglobulina de conejo anti-ratón conjugada con FITC. Se tomaron cortes ópticos confocales
65 mediante el uso de un microscopio confocal (Zeiss, Axiovert S100TV).

Ejemplo 16

Citometría de flujo

5 Se incubaron aproximadamente 1×10^6 células con $100 \mu\text{l}$ de partículas de fagos (10^{12} ufc/ml), y se mezclaron con $25 \mu\text{l}$ de 10% de Marvel/PBS (36). Las partículas de fagos unidas se detectaron mediante el uso de un mAb anti-M13 murino, seguido de inmunoglobulina de conejo anti-ratón conjugada con FITC (Dako). El mAb MgR6 anti-ErbB2 se usó a concentraciones saturantes en PBS que contenía un 2% de suero humano normal, y se detectó mediante el uso de la inmunoglobulina de conejo anti-ratón conjugada con FITC (Dako). Los controles comprendieron células incubadas con los anticuerpos correspondientes a los isotipos apropiados. Para la inmunofluorescencia con Anexina V, las células se resuspendieron en tampón de unión (HEPES 10 mM, pH 7,4; NaCl 140 mM, CaCl_2 2,5 mM) y después se tiñeron con Anexina V-FITC y 7-amino-actinomicina D (7-AAD) según las recomendaciones del fabricante (PharMingen, Oxford, R.U.). Las células marcadas se analizaron mediante el uso del citómetro de flujo FACS Calibur (Becton Dickinson, Oxford, R.U.); los datos se procesaron mediante el uso del soporte informático CellQuest (Becton Dickinson).

Ejemplo 17

20 *Ensayos de inhibición del crecimiento celular*

Las células se sembraron en placas de 96 pocillos; las células SKBR3, BT-474 y MDA-MB453 a una densidad de $1,5 \times 10^4$ /pocillo en $150 \mu\text{l}$; las células A431, NIH-3T3 y NIH-3T3 transfectadas con ErbB2 humano, a una densidad de 5×10^3 /pocillo. Se añadieron fagos (10^{10} - 10^{11} ufc/ml) o scFv purificado soluble (1 - $20 \mu\text{g/ml}$), y se realizaron recuentos de las células supervivientes a intervalos de tiempo adecuados. Los recuentos celulares se determinaron por triplicado mediante el análisis de exclusión de azul tripán. En experimentos paralelos, las células se expusieron durante 8 h a [^3H]timidina (Amersham-Pharmacia Biotech, Little Chalfont, R.U.) antes de la recogida, y se midió la radiactividad incorporada.

30 Para analizar la muerte apoptótica, se sembraron células SKBR3 en placas de 6 pocillos a una densidad de 3×10^5 /pocillo, en ausencia o en presencia de Ph-Erbicina (10^{11} ufc/ml) o Erbicina ($15 \mu\text{g/ml}$). El scFv anti-NIP irrelevante se analizó en su formato en fagos o en su formato soluble como control. Tras 24 horas, las células se recogieron, se lavaron con PBS, y se trataron con Anexina V como se describió anteriormente. Se usó el inductor apoptótico puromicina ($10 \mu\text{g/ml}$) como control positivo.

Ejemplo 18

Preparación de hERB-RNasa

40 Se preparó la inmunoRNasa completamente humana hERB-RNasa como sigue: Se clonó el cADN que codifica la RNasa de páncreas humano, que contiene una secuencia espaciadora en el extremo 5' y un sitio de reconocimiento para Not I en ambos extremos, en el vector de expresión pHEN2 (27) en dirección 3' respecto de la secuencia que codifica Erbicina, insertada previamente en los sitios NcoI/NotI. Se transformaron células SF110 de *E. coli* con el vector recombinante, y se indujeron con IPTG. La hERB-RNasa se aisló a partir de un extracto periplásmico bacteriano mediante "cromatografía de afinidad con metal inmovilizado" (IMAC) en una resina Talon, seguida de una cromatografía de afinidad en una resina de uridina-2'-5',3'-5'-difosfato-agarosa. La proteína recombinante se analizó mediante tinción con azul de Coomassie y transferencias de Western llevadas a cabo con un anticuerpo anti-RNasa de páncreas humano. La actividad ribonucleolítica se analizó mediante un zimograma desarrollado con ARN de levadura como sustrato para la RNasa. La especificidad de unión se analizó mediante ensayos de Elisa con células SKBR3 y A431. El efecto de la hERB-RNasa sobre la proliferación celular se analizó como se describió en el Ejemplo 6. Tras una incubación de 72 h con concentraciones crecientes de hERB-RNasa, la proliferación de las células SKBR3 se inhibió intensamente, con un valor de CI_{50} de aproximadamente 20 nM (véase la Fig. 8). Cuando en su lugar se analizaron las células A431 como células no seleccionadas como objetivo, no se observó ningún efecto sobre su proliferación. Estos resultados indican que la inmunoRNasa completamente humana hERB-RNasa es capaz de distinguir entre las células objetivo y las que no lo son, y de inducir específicamente la muerte de las células objetivo.

Bibliografía

- 60 1. Yamamoto, T. *et al.*, *Nature* 319, 230-234 (1986).
2. King, C.R. *et al.*, *Science* 229, 974-976 (1985).
3. Slamon, D.J. *et al.*, *Science* 244, 707-712 (1989).
- 65 4. Tagliabue, E. *et al.*, *Int. J. Cancer* 47, 933-937 (1991).
5. Fukushige, S. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 6, 955-958 (1986).

ES 2 334 895 T3

6. **Semba, K. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82, 6497-6501 (1985).
7. **Press, M.F. et al.**, *Oncogene* 5, 953-962 (1990).
- 5 8. **Graus-Porta, D. et al.**, *Embo J.* 16, 1647-1655 (1997).
9. **Hudziak, R.M. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85, 5102-5106 (1988).
- 10 10. **Hudziak, R.M. et al.**, *Mol. Cell. Biol.* 9, 1165-1172 (1989).
11. **Harwerth, I.M. et al.**, *J. Biol. Chem.* 267, 15160-15167 (1992).
12. **Kita, Y. et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 226, 59-69 (1996).
- 15 13. **Harwerth, I.M. et al.**, *Br. J. Cancer* 68, 1140-1145. (1993).
14. **Park, J.W. et al.**, en *Genes, Oncogenes and Hormones: Advances in Cellular and Molecular Biology of Breast Cancer* (eds Dickinson, R.B. & Lippman, M.E.) 193-211, Kluwer, Boston, (1992).
- 20 15. **Carter, P. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 4285-4289 (1992).
16. **Holliger, P. et al.**, *Nat. Biotechnol.* 16, 1015-1016 (1998).
17. **Carter, P. et al.**, *Breast Disease* 11, 103-111 (2000).
- 25 18. **Marks, J.D. et al.**, *J. Mol. Biol.* 222, 581-597 (1991).
19. **Griffiths, A.D. et al.**, *EMBO J.* 13, 3245-3260 (1994).
- 30 20. **Schier, R. et al.**, *Immunotechnology* 1, 73-81 (1995).
21. **Sheets, M.D. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95, 6157-6162 (1998).
22. **Poul, M.A. et al.**, *J. Mol. Biol.* 301, 1149-1161 (2000).
- 35 23. **Olayioye, M.A. et al.**, *Mol. Cell. Biol.* 18, 5042-5051 (1998).
24. **Centis, F. et al.**, *Hybridoma* 11, 267-276 (1992).
- 40 25. **Orlandi, R. et al.**, *Biol. Chem.* 378, 1387-1392 (1997).
26. **Parente, D. et al.**, *J. Biochem.* 239, 272-280 (1996).
27. **Nissim, A. et al.**, *EMBO J.* 13, 692-698 (1994).
- 45 28. **Coussens, L. et al.**, *Science* 230, 1132-1139 (1985).
29. **Hynes, N.E. et al.**, *J. Cell. Biochem.* 39, 167-173 (1989).
- 50 30. **Haigler, H. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 75, 3317-3321 (1978).
31. **Fabricant, R.N. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 74, 565-569 (1977).
32. **Meerman, H.J. et al.**, *Biotechnology (NY)* 12, 1107-1110 (1994).
- 55 33. **Kipriyanov, S.M. et al.**, *J. Immunol. Methods* 196, 51-62 (1996).
34. **Becerril, B. et al.**, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 255, 386-393 (1999).
- 60 35. **Sarup, J.C. et al.**, *Growth Regul.* 1, 72-82 (1991).
36. **Palmer, D.B. et al.**, *Immunology* 96, 236-245 (1999).
37. de **Kruif, J. et al.**, *Immunol. Today* 17, 453-455 (1996).
- 65 38. **Palmer, D.B. et al.**, *Immunology* 91, 473-478 (1997).
39. de **Kruif, J. et al.**, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92, 3938-3942 (1995).

ES 2 334 895 T3

40. **Huls**, G.A. *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 17, 276-281 (1999).

41. **Daly**, J.M. *et al.*, *Cancer Res.* 57, 3804-3811 (1997).

5 42. **Srinivas**, U. *et al.*, *Cancer Immunol. Immunother.* 36, 397-402 (1993).

43. **Marks**, J.D. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 267, 16007-16010 (1992).

44. de **Kruif**, J. *et al.*, *J. Biol. Chem.* 271, 7630-7634 (1996).

10

45. **Evan**, G.I. *et al.*, *Mol. Cell. Biol.* 5, 3610-3616 (1985).

46. **Ridgway**, J.B. *et al.*, *Cancer Res.* 59, 2718-2723 (1999).

15

47. **Laemmli**, U. *Nature* 227, 680-685 (1970).

48. **Sambrook**, J. *et al.*, *T. Molecular cloning: a laboratory manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Arbor, NY, 1990).

20

49. **Mariuzza**, R.A. *et al.*, *Annual. Rev. Biophys. Chem.* Vol. 16, 139-159 (1978).

50. **Powers**, D.B. *et al.*, *J. Immunol. Methods* 251, 123-135 (2001).

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 334 895 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un anticuerpo anti-ErbB2 de cadena simple recombinante de origen humano capaz de inhibir el crecimiento de células que expresan el receptor ErbB2, que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:2 (región VH) y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:12 (región VL).
2. Un anticuerpo recombinante según la reivindicación 1, en el que la región VH de SEQ ID N°:2 y la región VL de SEQ ID N°:12 están unidas de manera covalente mediante un espaciador proteico.
- 10 3. Una proteína de fusión **caracterizada** porque comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:2 (región VH) y la secuencia de aminoácidos de SEQ ID N°:12 (región VL).
- 15 4. Una proteína de fusión según la reivindicación 3, en la que dichas secuencias de aminoácidos están fusionadas a regiones constantes de anticuerpos humanos, o a toxinas o moléculas con efecto citotóxico.
5. Una proteína de fusión según la reivindicación 4, en la que dichas regiones constantes de anticuerpos humanos son de inmunoglobulinas G1.
- 20 6. Una proteína de fusión según la reivindicación 4 ó 5, cuya proteína es capaz de reconocer específicamente las células tumorales ErbB2-positivas y destruirlas de manera selectiva.
7. Una proteína de fusión según la reivindicación 3, en la que al menos una de las secuencias está fusionada a una enzima humana con actividad de ribonucleasa.
- 25 8. Una proteína de fusión según la reivindicación 7, en la que dicha enzima humana es la ribonucleasa pancreática humana.
9. Las secuencias de nucleótidos que codifican un anticuerpo recombinante como se expuso en cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, o que codifican la proteína de fusión de cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.
- 30 10. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9, que comprende SEQ ID N°:1 y SEQ ID N°:11.
11. Un vector que comprende al menos una de las secuencias de nucleótidos según la reivindicación 9 ó 10.
- 35 12. Un vector según la reivindicación 11 que es un vector de expresión.
13. Un vector de bacteriófago que comprende una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 ó 10.
- 40 14. Un vector de bacteriófago según la reivindicación 13, **caracterizado** porque expresa en su superficie al menos una copia del anticuerpo recombinante según cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2.
15. Una célula que está transformada con un vector según la reivindicación 11 ó 12.
- 45 16. Un anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 2, o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, para uso farmacéutico.
17. Un anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 2, o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, para uso diagnóstico.
- 50 18. Un anticuerpo, según la reivindicación 1 ó 2, o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, para el uso como un agente antitumoral.
19. Un anticuerpo o una proteína para el uso según la reivindicación 18, en el que el agente antitumoral es antitumoral contra carcinomas de mama, ovario, colon, pulmón, tumores de las glándulas salivales o tumores gástricos.
- 55 20. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 ó 10 para uso farmacéutico.
21. Una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 ó 10 para uso diagnóstico.
- 60 22. Un vector de bacteriófago según la reivindicación 13 ó 14 para uso farmacéutico.
23. Un vector de bacteriófago según la reivindicación 13 ó 14 para uso como un agente antitumoral.
- 65 24. Un vector de bacteriófago para el uso según la reivindicación 23, en el que el agente antitumoral es antitumoral contra carcinomas de mama, ovario, colon, pulmón, tumores de las glándulas salivales o tumores gástricos.

ES 2 334 895 T3

25. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8.

26. Una composición farmacéutica que comprende como principio activo un vector según la reivindicación 11 ó 12 o un vector de bacteriófago según la reivindicación 13 ó 14.

27. Una composición farmacéutica según la reivindicación 25 ó 26 que comprende un diluyente y/o excipiente y/o adyuvante.

28. El uso de un anticuerpo según la reivindicación 1 ó 2 o una proteína según cualquiera de las reivindicaciones 3 a 8, para la preparación de un fármaco antiproliferativo o antitumoral.

29. El uso de una secuencia de nucleótidos según la reivindicación 9 ó 10 para la preparación de un fármaco antiproliferativo o antitumoral.

30. El uso de un vector de bacteriófago según la reivindicación 13 ó 14 para la preparación de un fármaco antiproliferativo o antitumoral.

31. Un procedimiento para la preparación de un anticuerpo recombinante según la reivindicación 1 ó 2, a partir de un vector según la reivindicación 11 ó 12.

32. Un procedimiento para la preparación de una proteína de fusión según la reivindicación 5 que comprende las siguientes etapas:

(i) aislamiento de al menos una de las secuencias de nucleótidos según cualquiera de las reivindicaciones 9 a 11;

(ii) fusión de dicha secuencia de ADN a un cADN que codifica las regiones constantes (CH2 y CH3) y el péptido de la bisagra de las cadenas pesadas humanas de inmunoglobulina G1;

(iii) expresión del cADN de fusión resultante en células eucarióticas.

33. Un procedimiento para la preparación de una proteína de fusión según cualquiera de las reivindicaciones 4, 7 ó 8 que comprende las siguientes etapas:

(i) fusión de las secuencias de ADN según cualquiera de las reivindicaciones 10 a 12 al cADN que codifica la RNasa pancreática humana, y dicha fusión se lleva a cabo preferiblemente interponiendo un fragmento de ADN que codifica un péptido espaciador según la SEQ ID N° 24;

(ii) expresión del cADN de fusión resultante en *Escherichia coli*;

(iii) aislamiento y caracterización de la proteína recombinante.

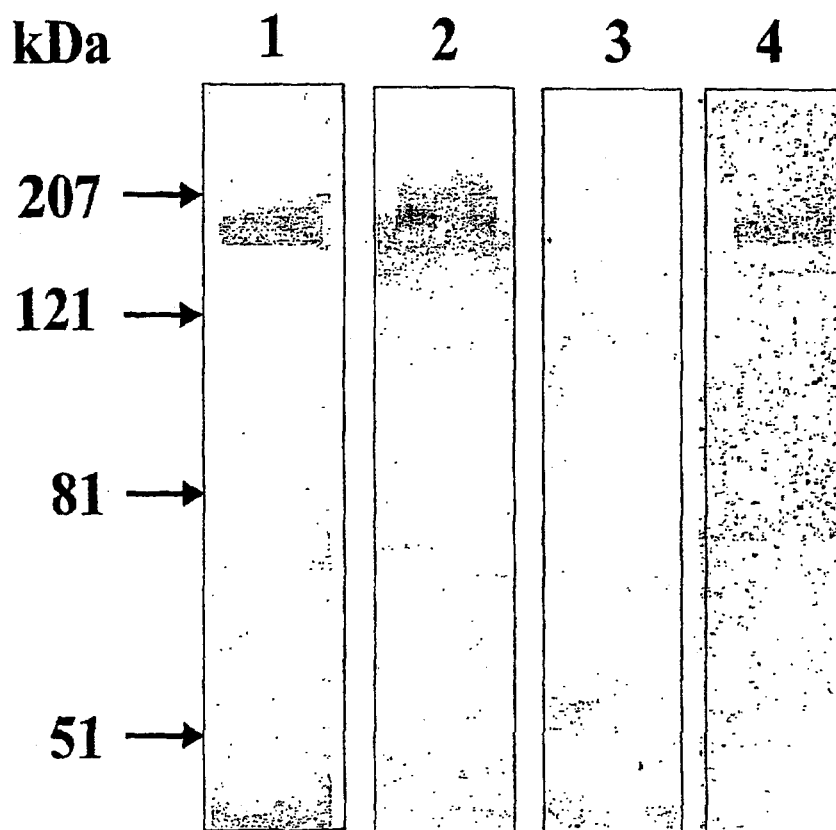
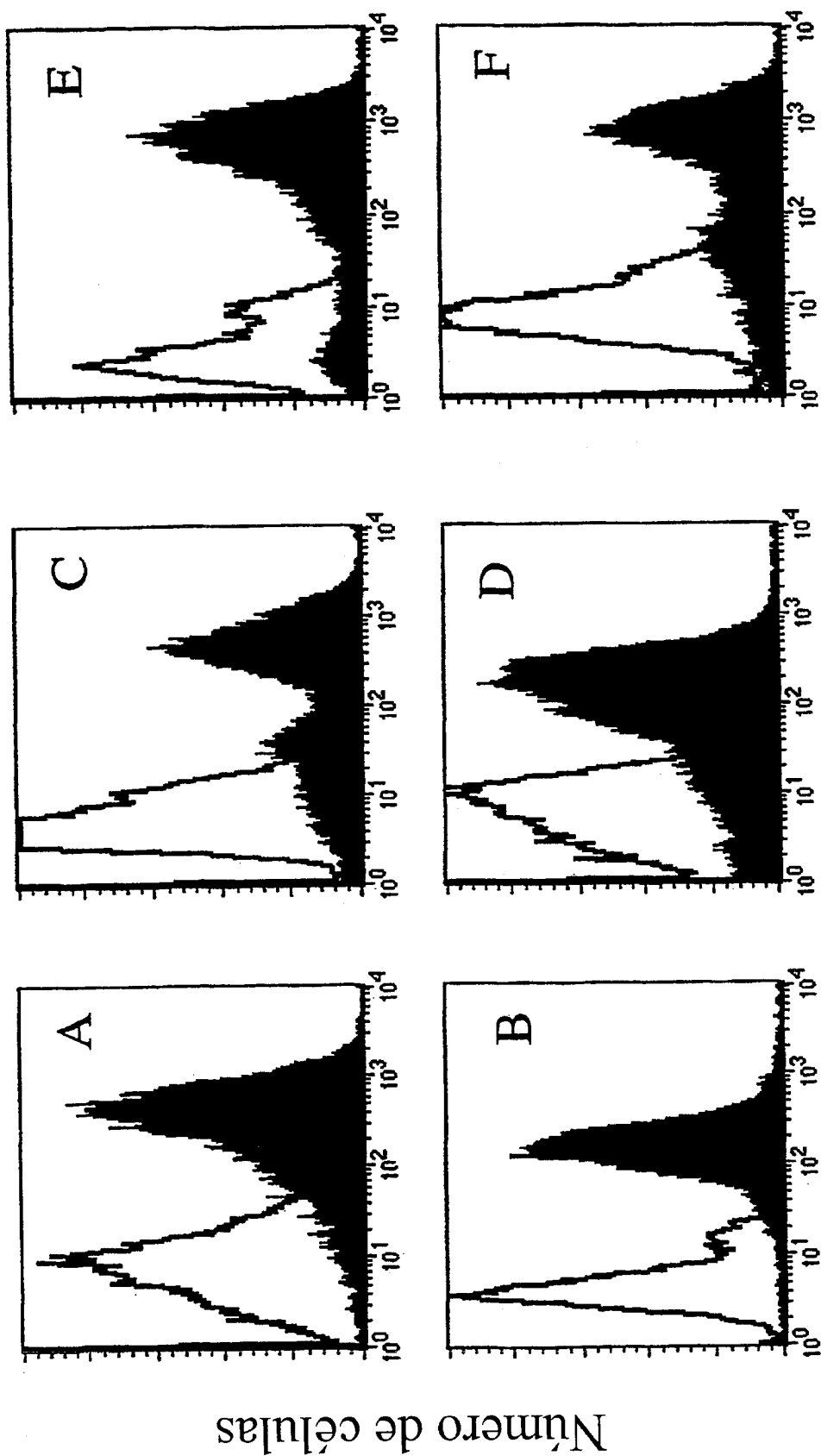


FIGURA 1



Fluorescencia

FIGURA 2

Número de células

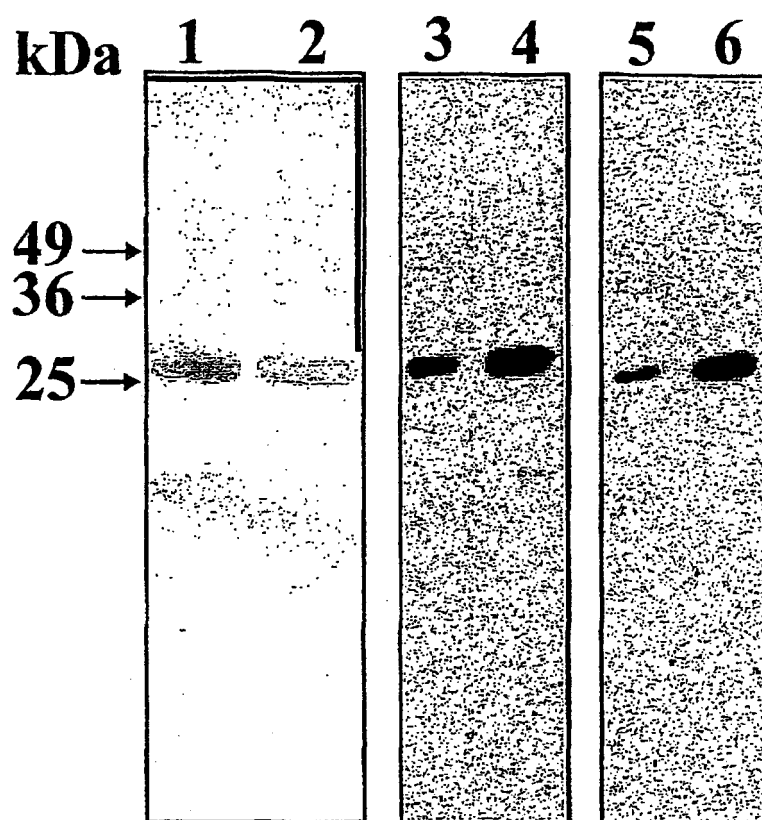


FIGURA 3

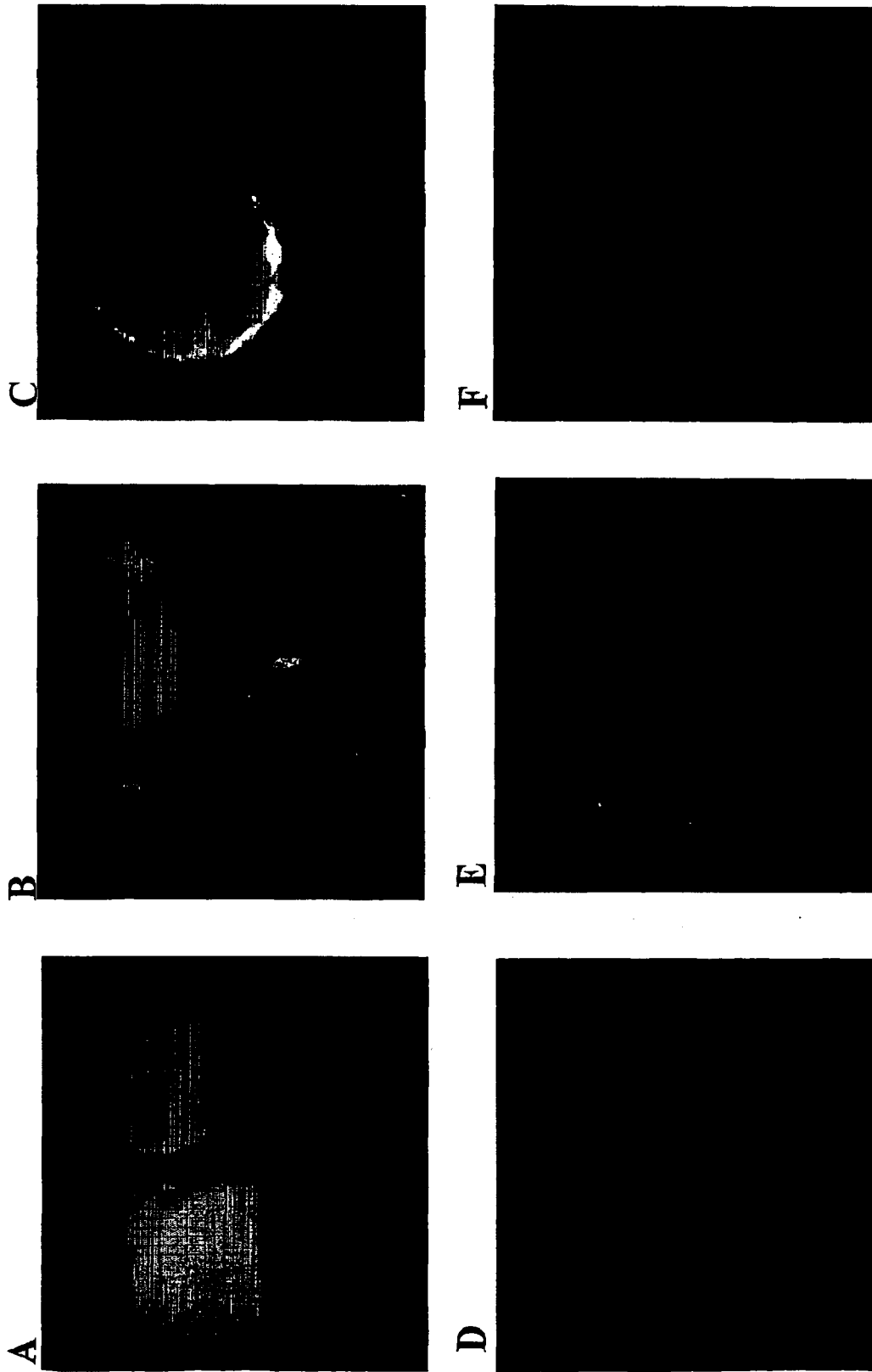


FIG. 4

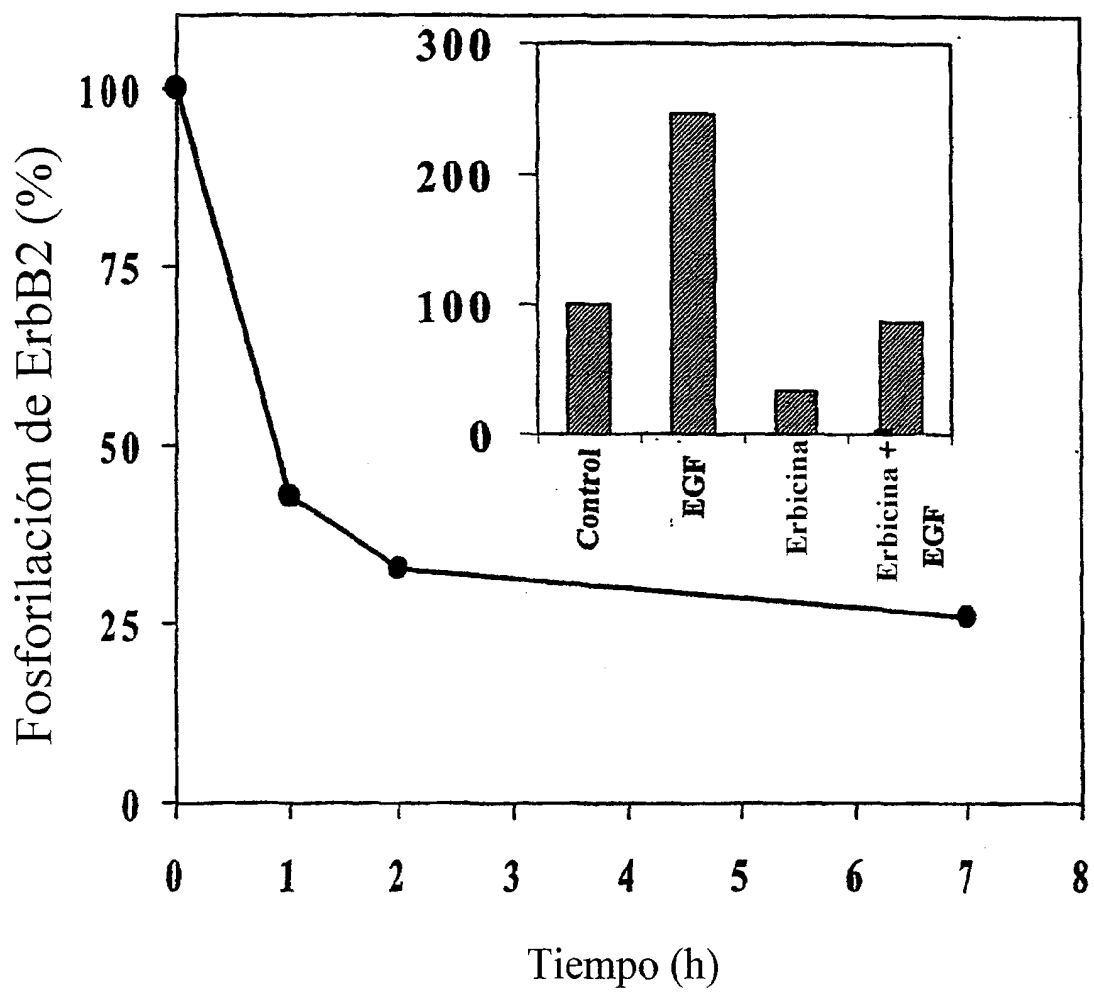


FIGURA 5

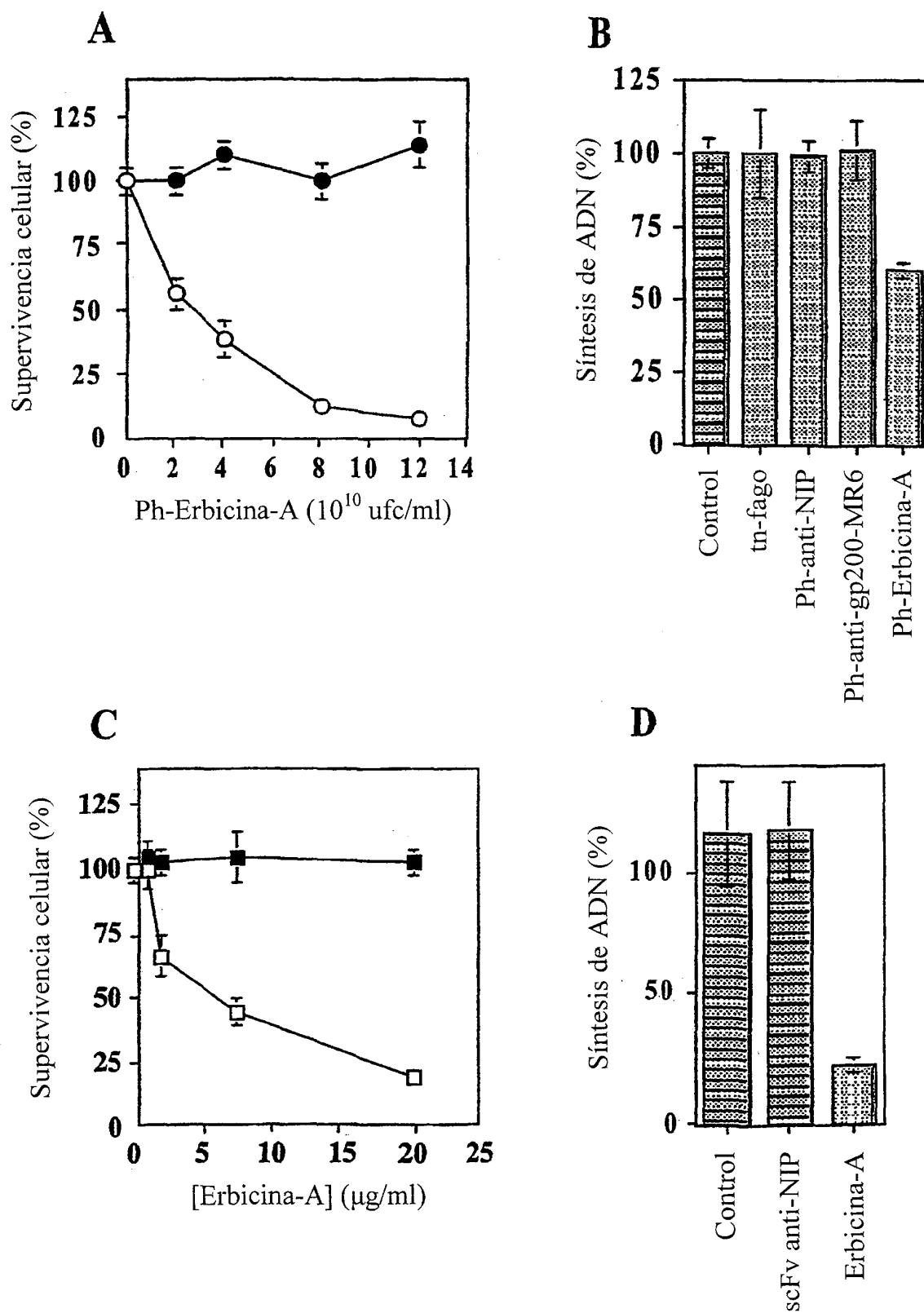
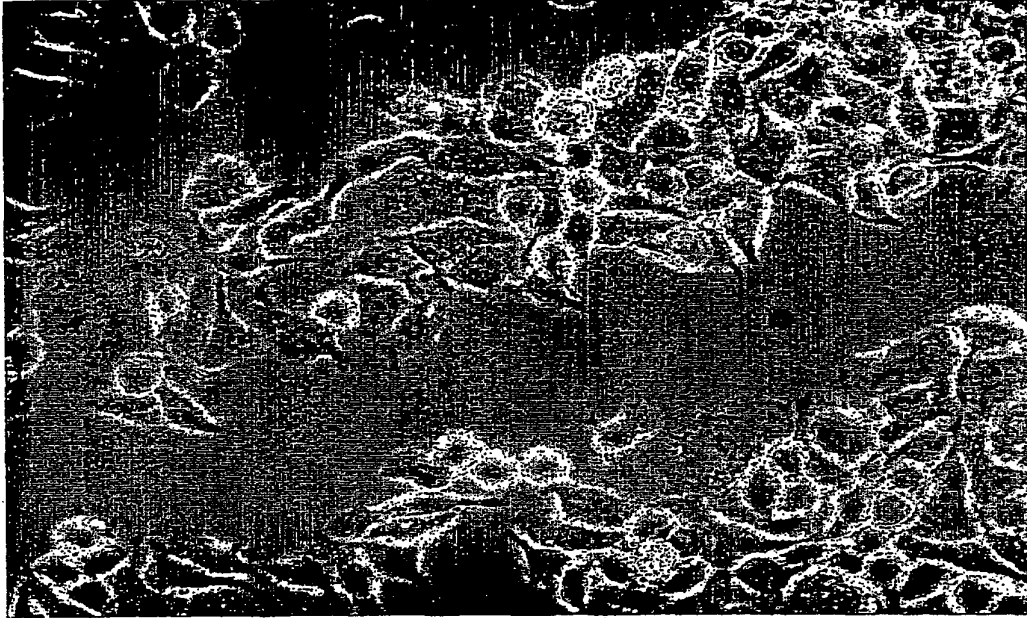


FIGURA 6

A



B

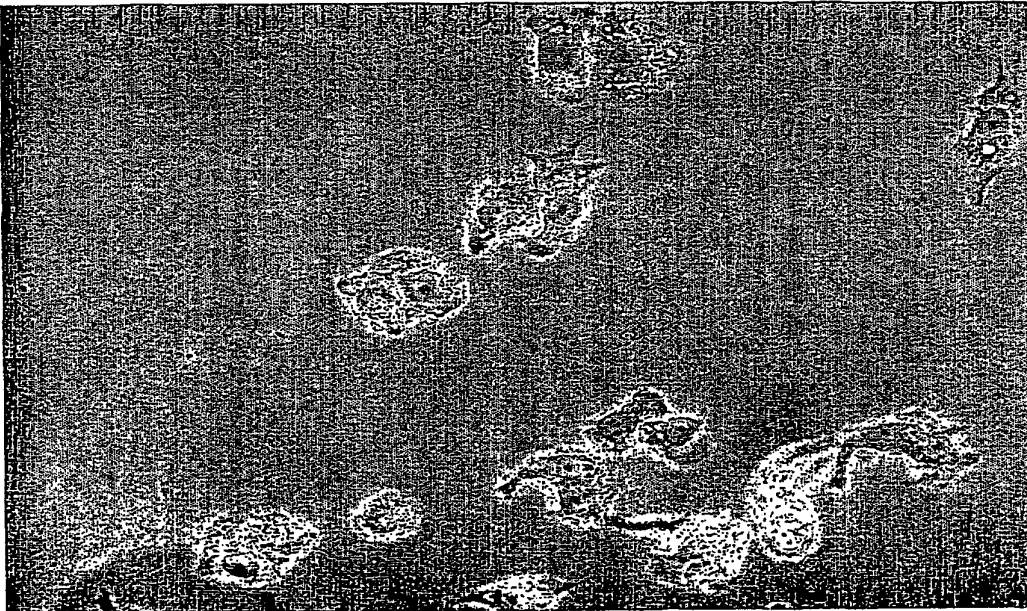


FIGURA 7

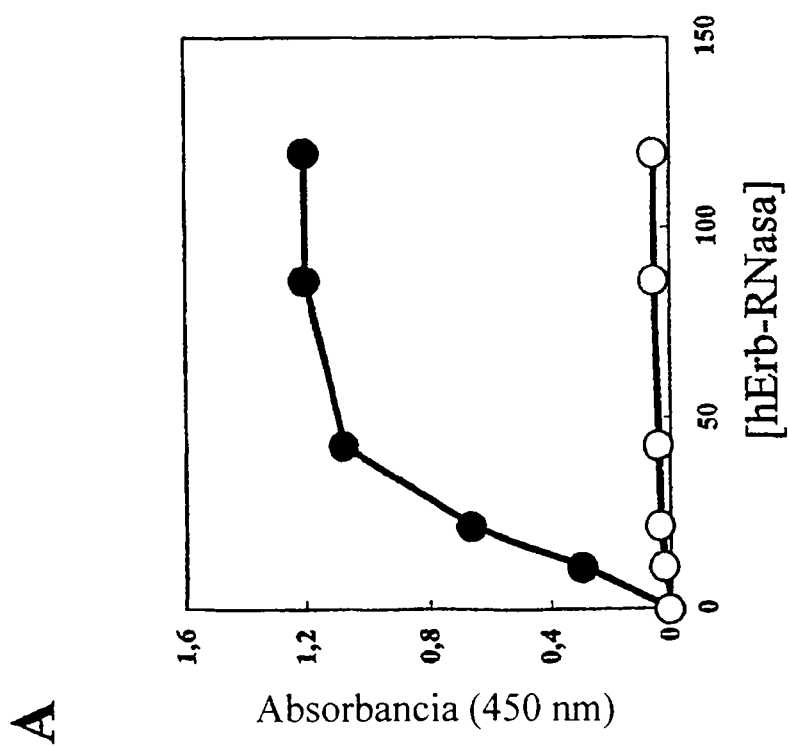
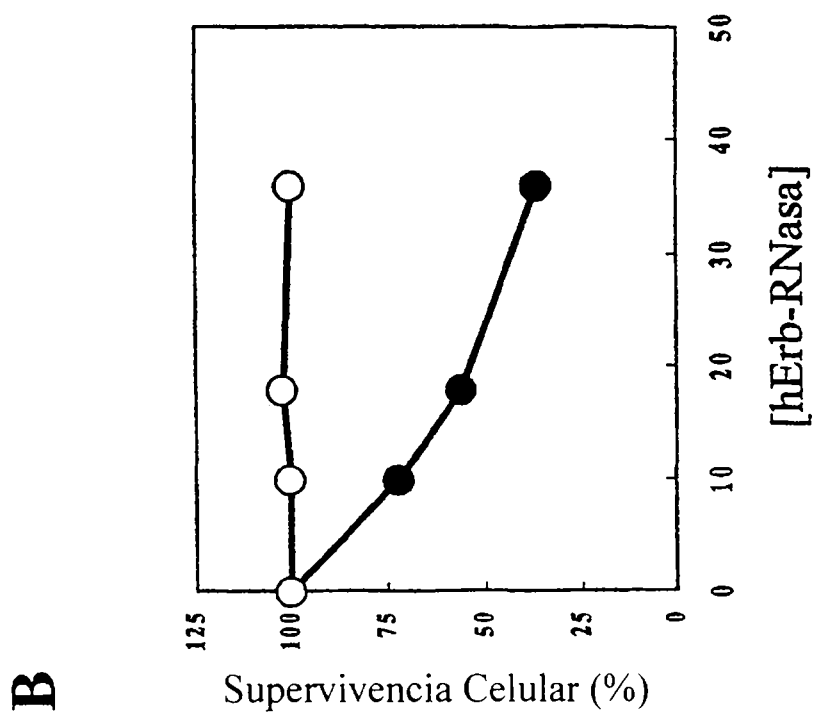


FIGURA 8

ES 2 334 895 T3

LISTA DE SECUENCIAS

SEQ ID N° 1 - Secuencia de ADN de la región VH (región variable de la cadena pesada):

5 **5'-CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGCAGCAGAGGTGAAAAAG**
CCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGA
TACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
10 **GATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCT**
ATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTT
15 **CCAAGGCCCAGGTACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAG**
CACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGA
CACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGATTGGCGTGATTCGC
20 **CTTTGTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTC-3'**

SEQ ID N° 2: Secuencia de aminoácidos de la región VH (región variable de la cadena pesada):

25 **QVQLLQSAAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM**
PGKGLEWMGIYPGDSDRYSPSFQGV
30 **QWSSLKASDTAVYYCARWRDSPLWGQGLVTV**

SEQ ID N° 3 - Secuencia de ADN de la región CDR-1 de la cadena VH:

35 **5'-AGCTACTGGATCGGC-3'**

SEQ ID N° 4 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-1 de la cadena VH:

SYWIG

SEQ ID N° 5 - Secuencia de ADN de la región CDR-2 de la cadena VH:

45 **5'-ATCATCTATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTTCCAAGGC-**
50 **3'**

SEQ ID N° 6 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-2 de la cadena VH:

55 **IYPGDSDRYSPSFQ**

SEQ ID N° 7 - Secuencia de ADN de la región CDR-3 de la cadena VH:

60 **5'-TGGCGTGATTTCGCCTTTG-3'**

SEQ ID N° 8 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-3 de la cadena VH:

WRDSPL

ES 2 334 895 T3

SEQ ID N° 9 - Secuencia de ADN del "LIGADOR" (región que conecta VH y VL):

5'–TCGAGTGGTGGAGGCGGTTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGC
5 GGTAGTGCACCTT–3'

SEQ ID N° 10 - Secuencia de aminoácidos de la región del "LIGADOR" (péptido que conecta VH y VL):

10 SSGGGGSGGGGSGGSAL

SEQ ID N° 11 - Secuencia de ADN de la región VL (región variable de la cadena ligera):

15 5'–CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCATCGTTCTCAGTGTCCC
CTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCTTGAGCTCT
GGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAGCTGGTACCA
20 GCAGACCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCATCTACAG
CACAAACACTCGCTCTTCTGGGGTCCCTGATCGCTTCTC
TGGCTCCATCCTGGGAACAAAGCTGCCCTCACCATCAC
25 GGGGGCCAGGCAGATGATGAATCTGATTATTACTGTGT
GCTGTATATGGGTAGTGGCCAGTATGTATTTCGGCGGA
30 GGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT–3'

SEQ ID N° 12 - Secuencia de aminoácidos de la región VL (región variable de la cadena ligera):

35 QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTGLSSGSVSTSYYPSWYQQT
PGQAPRTLIVSTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTTGAQAD
40 DESDYVCVLYMGSGQYVFGGGTKLTVLG

SEQ ID N° 13 - Secuencia de ADN de la región CDR-1 de la cadena VL:

45 5'- GGCTTGAGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCC
AG-3'

SEQ ID N° 14 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-1 de la cadena VL:

50 GLSSGSVSTSYYP

SEQ ID N° 15 - Secuencia de ADN de la región CDR-2 de la cadena VL:

55 5'-AGCACAAACACTCGCTCTTCT-3'

SEQ ID N° 16 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-2 de la cadena VL:

60 STNTRSS

SEQ ID N° 17 - Secuencia de ADN de la región CDR-3 de la cadena VL:

65 5'-GTGCTGTATATGGGTAGTGGCCAGTATGTA-3'

ES 2 334 895 T3

SEQ ID N° 18 - Secuencia de aminoácidos de la región CDR-3 de la cadena VL:

VLYMGSGQYV

5

SEQ ID N° 19 - Secuencia de ADN del minianticuerpo (scFv):

5'-CAGGTGCAGCTGTTGCAGTCTGCAGCAGAGGTGAAAAAG
10 CCCGGGGAGTCTCTGAAGATCTCCTGTAAGGGTTCTGGA
TACAGCTTTACCAGCTACTGGATCGGCTGGGTGCGCCA
GATGCCCGGGAAAGGCCTGGAGTGGATGGGGATCATCT
15 ATCCTGGTGACTCTGATACCAGATACAGCCCGTCCTT
CCAAGGCCAGGTCACCATCTCAGCCGACAAGTCCATCAG
20 CACCGCCTACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCTCGGA
CACGGCCGTGTACTACTGTGCAAGATTGGCGTGATTCCG
CTTTGTGGGGCCAAGGTACCCTGGTCACCGTC-TCGAGT
25 GGTGGAGGCGGTTCAGGCGGAGGTGGCTCTGGCGGTAGT
GCACTT-CAGGCTGTGGTGACTCAGGAGCCATCGTTCTCA
30 GTGTCCCCTGGAGGGACAGTCACACTCACTTGTGGCTTG
AGCTCTGGCTCAGTCTCTACTAGTTACTACCCAGCTG
GTACCAGCAGACCCAGGCCAGGCTCCACGCACGCTCAT
35 CTACAGCACAAACACTCGCTCTTCTGGGGTCCCTGATC
GCTTCTCTGGCTCCATCCTTGGGAACAAAGCTGCCCTCAC
40 CATCACGGGGGCCAGGCAGATGATGAATCTGATTATTA
CTGTTGCTGTATATGGGTAGTGGCCAGTATGTATTCG
45 GCGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCTAGGT-3'

SEQ ID N° 20 - Secuencia de aminoácidos del minianticuerpo (scFv):

50 QVQLLQSAAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQM
PGKLEWMGIYPGDSTRYSPSFOGQVTISADKSISTAYL
QWSSLKASDTAVYYCARWRDSPLWGQGLVTV-
55 SSGGGSGGGGSGGSAL-
QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSYPSWYQQT
60 PGQAPRTLIYSTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQAD
DESDYYCVLYMGSGQYVFGGGTKLTVLG

65 SEQ ID N° 21 - polihistidina HHHHHH

SEQ ID N° 22: 5'-CAGTCTATGCGGCCCCATTCA-3'

ES 2 334 895 T3

SEQ ID N° 23: 5'-ATGAAATACCT ATTGCCTACG-3'

SEQ ID N° 24: AAASGGPEGGS

5

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65