

(19)



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA



(11) Número de publicación: **2 440 919**

(51) Int. Cl.:

**C07K 16/32** (2006.01)  
**A61K 38/18** (2006.01)  
**A61K 51/08** (2006.01)  
**A61P 35/00** (2006.01)

(12)

## TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **22.12.2008 E 08864430 (7)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **09.10.2013 EP 2235044**

---

(54) Título: **Nuevos polipéptidos con afinidad por HER2**

(30) Prioridad:

**21.12.2007 EP 07150395**

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

**31.01.2014**

(73) Titular/es:

**AFFIBODY AB (100.0%)  
BOX 20137  
161 02 BROMMA, SE**

(72) Inventor/es:

**ABRAHMSÉN, LARS;  
HERNE, NINA;  
FELDWISCH, JOACHIM;  
LENDEL, CHRISTOFER y  
TOLMACHEV, VLADIMIR**

(74) Agente/Representante:

**DE ELZABURU MÁRQUEZ, Alberto**

**ES 2 440 919 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

Nuevos polipéptidos con afinidad por HER2

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere a nuevos polipéptidos que se unen a Receptor 2 de Factor de Crecimiento Epidérmico Humano (a partir de aquí referido como HER2, del inglés "Human Epidermal Growth Factor Receptor 2"). La presente invención también se refiere al uso de dicho polipéptido de unión a HER2 como agente diagnóstico y/o como medicamento, más particularmente a su uso como agente diagnóstico y/o como medicamento para la diagnosis y/o para el tratamiento de formas de cáncer que se caracterizan por la sobre-expresión de HER2.

Antecedentes

10 *HER2 y su función en enfermedades de cáncer*

El proto-oncogén de HER2 codifica la producción de una proteína receptora de superficie celular de 185 kDa conocida como proteína o receptor HER2 (Hynes NE *et al.* (1994) *Biochem Biophys Acta* 1198: 165-184). Este gen también se denomina a veces *neu*, *HER2/neu* ó *c-erbB-2*. El *neu* se descubrió por primera vez en ratas que habían sido tratados con etilnitrosourea, y presentaban una mutación en este gen (Shih C *et al.* (1981) *Nature* 290: 261-264). La versión mutada de *neu* da como resultado la producción de una forma constitutivamente activa del receptor, y constituye un potente oncogén que puede transformar células con un bajo número de copia (Hynes NE *et al.*, ver anterior).

20 Las células normales expresan una pequeña cantidad de proteína HER2 sobre sus membranas plasmáticas en una estructura específica de tejido. No se ha determinado ningún ligando conocido de HER2; sin embargo, se ha demostrado que HER2 forma heterodímeros con HER1 (el receptor de factor de crecimiento epidérmico, EGFR, del inglés "epidermal growth factor receptor"), HER3 y HER4 en complejo con los ligandos de estos receptores. Dicha formación de heterodímero conduce a que el receptor HER2 activado transmita señales de crecimiento desde el exterior de la célula hasta el núcleo, controlando de este modo aspectos de crecimiento y división celular normales (Sundaresan S *et al.* (1999) *Curr Oncol Rep* 1: 16-22).

25 En células tumorales, los errores en el sistema de replicación de ADN pueden dar como resultado la existencia de múltiples copias de un gen en un único cromosoma, lo que es un fenómeno conocido como amplificación génica. La amplificación del gen de HER2 conduce a un aumento de la transcripción de dicho gen. Esto eleva los niveles de ARNm de HER2 y aumenta la síntesis concomitante de proteína HER2, lo que da como resultado la sobre-expresión de proteína HER2 sobre la superficie de dichas células tumorales. Esta sobre-expresión puede dar como resultado niveles de proteína HER2 que son entre 10 y 100 veces superiores a los observados en las células adyacentes normales. Esto a su vez produce un aumento de la división celular y una mayor tasa concomitante de crecimiento celular. La amplificación del gen de HER2 está implicada en la transformación de células normales en el fenotipo de cáncer (Hynes NE *et al.*, ver anterior; Sundaresan S *et al.*, ver anterior).

35 Se cree que la sobreexpresión de proteína HER2 da como resultado la formación de homodímeros de HER2, lo que a su vez produce un receptor constitutivamente activa (Sliwkowski MX *et al.* (1999) *Semin Oncol* 26 (4, Supl. 12): 60-70). En estas condiciones, las señales promotoras de crecimiento pueden transmitirse continuamente en las células en ausencia de ligandos. Consecuentemente, se activan múltiples mecanismos de transducción de señal intracelular, lo que da como resultado un crecimiento celular no regulado y en algunos casos una transformación oncogénica (Hynes NE *et al.*, ver anterior). Por tanto, los mecanismos de transducción de señal mediados por receptores de factor de crecimiento son importantes dianas para inhibir la replicación celular y el crecimiento tumoral.

45 El cáncer de mama es la malignidad más común entre las mujeres en los Estados Unidos, con 192200 nuevos casos estimados en 2001 (Greenlee R *et al.* (2001) *CA Cancer J Clin* 51: 15-36). En aproximadamente el 25 % de todos los pacientes de cáncer de mama existe una sobreexpresión del gen de HER2 debido a su amplificación (Slamon DJ *et al.* (1989) *Science* 244: 707-712). Esta sobreexpresión de proteína de HER2 se correlaciona con varias variables prognósticas negativas, que incluyen estatus negativo de receptor de estrógeno, alta fracción de fase-S, estatus nodal positivo, p53 mutado y elevado grado nuclear (Sjogren S *et al.* (1998) *J Clin Oncol* 16 (2): 462-469). Según Slamon *et al.* (ver anterior), se observó que la amplificación del gen de HER2 se correlaciona estrechamente con una supervivencia libre de enfermedad más corta y una supervivencia general más corta de pacientes de nodos positivos.

50 Por estas razones, un objetivo importante ha sido, y sigue siendo, llevar a cabo investigaciones sobre la función del HER2 en la patogénesis y el tratamiento del cáncer de mama. La identificación de moléculas que interactúan con HER2 constituye una parte de este esfuerzo.

55 Estudios *in vitro* preclínicos han examinado si la inhibición de la actividad de HER2 podría afectar al crecimiento de células tumorales. El tratamiento de células de cáncer de mama SK-BR-3 que sobreexpresan proteína HER2 con 4D5, uno de varios anticuerpos monoclonales anti-HER2 murinos, inhibió efectivamente la proliferación de células

5 tumorales, en comparación con el tratamiento con un anticuerpo monoclonal de control. La administración de 4D5 a ratones que portaban cánceres de mama y de ovario humanos (xenoinjertos) que sobreexpresaban HER2 prolongó su tiempo de supervivencia libre de tumor. Estudios similares demostraron que la inhibición del crecimiento mediante anticuerpos monoclonales anti-HER2 en xenoinjertos de cáncer gástrico humano en ratones (Pietras RJ *et al.* (1994) *Oncogene* 9: 1829-1838).

10 Entre las estrategias para inhibir la proteína de HER2 presente de forma abundante sobre la superficie de células tumorales con un anticuerpo, una terapia ha alcanzado disponibilidad comercial en los últimos años. De este modo, la variante humanizada de anticuerpo monoclonal 4D5, o trastuzumab, se comercializa para este propósito en F Hoffmann-La Roche y Genentech bajo el nombre comercial de Herceptin®.

15 10 De este modo, la sobreexpresión de HER2 ha sido descrita para el cáncer de mama. También se ha conectado con cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de glándula salival, cáncer de pulmón (Holbro *et al.*, *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2004; 44: 195-217) y cáncer de esófago (Ekman *et al.*, *Oncologist* 2007; 12: 1165-1177, en particular véanse las páginas 1170-1171).

20 15 A pesar de las ventajas obvias mostradas por la terapia con anticuerpos frente a cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de la proteína HER2, se da la circunstancia de que sigue habiendo una variedad de factores que tienen el potencial de reducir la eficacia de los anticuerpos (véase, p. ej., Reilly RM *et al.* (1995) *Clin Pharmacokinet* 28: 126-142). Éstos incluyen los siguientes: (1) penetración limitada del anticuerpo en un tumor sólido grande o en regiones vitales tales como el cerebro; (2) extravasación limitada de los anticuerpos en localizaciones diana debido a una permeabilidad vascular reducida; (3) reactividad cruzada y unión no específica del anticuerpo con tejidos normales, lo que reduce el efecto diana; (4) captación tumoral heterogénea que da como resultado zonas no tratadas; y (6) formación rápida de HAMA y anticuerpos antihumanos humanos, que desactivan el anticuerpo terapéutico.

25 30 Adicionalmente, los efectos tóxicos han sido un obstáculo importante 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 provocar efectos secundarios sustanciales para anticuerpos no conjugados (desnudos), efectos secundarios que pueden verse potenciados al conjugarse los anticuerpos con toxinas o radioisótopos. Las complicaciones mediadas por efectos inmunes incluyen la dispnoea resultante de efectos tóxicos pulmonares, complicaciones ocasionales del sistema nervioso central y periférico, y una función hepática y renal reducida. Ocasionalmente, se pueden observar complicaciones tóxicas no esperadas, tales como efectos cardiotóxicos asociados al anticuerpo dirigido a HER2 trastuzumab (Schneider JW *et al.* (2002) *Semin Oncol* 29 (3, supl. 11): 22-28). La radioinmunoterapia con anticuerpos conjugados a isótopos también puede provocar una supresión de médula ósea.

35 35 Por lo tanto, a pesar del reciente éxito clínico y comercial de los anticuerpos anticancerígenos usados actualmente, sigue habiendo preocupación sobre un número sustancial de cuestiones importantes relativas al futuro del uso de anticuerpos. En consecuencia, la provisión continuada de agentes con una afinidad comparable por HER2 sigue siendo un asunto de interés sustancial dentro de este campo, así como la provisión de usos de dichas moléculas en la diagnosis y el tratamiento de la enfermedad.

#### *Moléculas variantes Z de unión a HER2*

40 40 Se han seleccionado moléculas relacionadas con la proteína Z, derivada del dominio B de la proteína A estafilococal (SPA, del inglés "staphylococcal protein A") (Nilsson B *et al.* (1987) *Protein Engineering* 1, 107-133), de una biblioteca de dichas moléculas aleatorizadas usando diferentes dianas de interacción (véase, p. ej., el documento WO95/19374; Nord K *et al.* (1997) *Nature Biotechnology* 15, 772-777; WO2005/0008883; WO2005/075507; WO2006/092338; WO2007/065635).

En WO2005/003156 se describe un número sustancial de variantes Z con capacidad para interaccionar con HER2.

45 45 Descripción de la invención

Un objetivo de la presente invención es satisfacer el requisito de una provisión continuada de agentes con afinidad por HER2, a través de la provisión de un polipéptido que se caracteriza por una especificidad de unión a HER2.

Un objetivo relacionado de la invención es un polipéptido de unión a HER2 que presenta poca o ninguna especificidad de unión.

50 50 Otro objeto de la invención es proporcionar un polipéptido de unión a HER2 que pueda usarse fácilmente como resto en un polipéptido de fusión.

Otro objetivo es la provisión de un polipéptido de unión a HER2, que resuelva uno o más de los consabidos problemas experimentados con los reactivos de anticuerpos existentes.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un polipéptido de unión a HER2, que sea válido para uso en aplicaciones terapéuticas.

Un objetivo adicional de la invención es proporcionar un polipéptido de unión a HER2, que sea válido para uso en aplicaciones diagnósticas.

5 Un objetivo relacionado es encontrar nuevas formas para el tratamiento, inhibición y/o tratamiento de dianas en el desarrollo clínico de enfermedades de cáncer que se caracterizan por una sobreexpresión de proteína HER2.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un polipéptido de unión a HER2 que se sintetice fácilmente mediante síntesis química de péptidos.

10 Un objetivo relacionado es encontrar un polipéptido de unión a HER2 que exhiba una estabilidad mejorada respecto a agentes de unión a HER2 conocidos.

Otro objetivo adicional de la invención es obtener un polipéptido de unión a HER2 que exhiba una baja antigenicidad cuando se use *in vivo* en un mamífero.

Otro objetivo de la invención es proporcionar un polipéptido de unión a HER2 con una biodistribución tras ser administrado a un mamífero.

15 Estos y otros objetivos quedan cubiertos por los diferentes aspectos de la invención, según se reivindica en las reivindicaciones anexas. Por tanto, en un primer aspecto, la invención proporciona un polipéptido, que tiene la secuencia de aminoácidos que comprende

**EX<sub>1</sub>RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX<sub>2</sub>E AKKLNDSQ**

donde X<sub>1</sub> en la posición 2 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> en la posición 39 es S ó C

20 (SEQ ID NO: 1)

o en algunos casos más preferiblemente

**YAKEX<sub>1</sub>RNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL  
LX<sub>2</sub>EAKKLND S Q**

donde X<sub>1</sub> en la posición 5 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> en la posición 42 es S ó C

(SEQ ID NO: 2)

25 o en algunos casos más preferiblemente

**AEAKYAKEX<sub>1</sub>R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ  
SSELLX<sub>2</sub>EAKK LNDSQ**

donde X<sub>1</sub> en la posición 9 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> en la posición 46 es S ó C

(SEQ ID NO: 3)

o en algunos casos más preferiblemente

**ESEKYAKEX<sub>1</sub>R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ  
SSELLX<sub>2</sub>EAKK LNDSQ,**

donde X<sub>1</sub> en la posición 9 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> en la posición 46 es S ó C

(SEQ ID NO: 4)

35 Según la presente, los presente inventores han descubierto que un polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1-4 exhibe ventajas sorprendentes, por ejemplo en comparación con los polipéptidos de unión a HER2 descritos en la solicitud de patente WO2005/003156, a la vez que mantienen la capacidad de los polipéptidos descritos previamente para unirse a la diana de HER2. A continuación se muestran ejemplos no limitativos de dichas ventajas, mostradas por una o más realizaciones del polipéptido según la invención:

- El polipéptido de la invención comprende menos residuos de aminoácido potencialmente generadores de problemas, tal como un bajo rendimiento y una baja tasa de éxito, en la síntesis química de la secuencia de polipéptido, tal como asparagina, arginina, ácido aspártico y metionina.

- 5 • El polipéptido de la invención comprende menos residuos de aminoácido que podrían conferir hidrofobicidad superficial, y por tanto tener un perfil más hidrofílico de lo descrito previamente en relación a polipéptidos de unión a HER2. Esto implica menos problemas de baja solubilidad y agregación. Sin pretender establecer ninguna teoría, actualmente también se cree que las características más hidrofílicas actúan para desplazar la biodistribución del polipéptido tras su administración a un hospedante, desde un mecanismo hepatobiliar (excreción a través del hígado) hacia un más deseable mecanismo renal (excreción a través de los riñones).

- 10 • El polipéptido de la invención comprende menos residuos de aminoácido asociados a problemas de estabilidad de polipéptidos, tal como metionina, asparagina y el dipéptido asparagina-prolina. La metionina es susceptible a la oxidación, la asparagina es susceptible a la desamidación y el enlace asparagina-prolina es susceptible de ruptura, y por lo tanto contribuyen a la no homogeneidad del producto final.

- 15 • El polipéptido de la invención carece de residuos de aminoácido que se ha observado que, en un contexto de secuencia similar, aumentan la interacción con inmunoglobulinas que contienen un dominio variable de cadena pesada procedente de VH3 (Silverman G.J., Int. Rev. Immunol. 1992; 9(1): 57-78). Sin pretender establecer ninguna teoría, actualmente se cree que la sustitución de dichos residuos de aminoácido en los polipéptidos según la invención reduce la antigenicidad del polipéptido tras administrárselo a un hospedante.

20 El polipéptido de la invención tiene aplicación como alternativa a anticuerpos contra HER2 en diversas aplicaciones. Como ejemplos no limitantes, son útiles en el tratamiento de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de HER2, para inhibir la señalización celular mediante la unión al HER2 sobre la superficie de una célula, en la diagnosis de cánceres que se caracterizan por la sobreexpresión de HER2 tanto *in vivo* como *in vitro*, en dirigir 25 agentes a células que sobreexpresan HER2, en métodos histoquímicos para la detección de HER2, en métodos de separación y otras aplicaciones. El polipéptido según la invención puede demostrar ser útil en cualquier método que se base en la afinidad de un reactivo por HER2. Así, el polipéptido se puede usar como reactivo de detección, reactivo de captura o reactivo de separación en dichos métodos, como agente de diagnosis o como medio para dirigir otros agentes terapéuticos o diagnósticos a la proteína HER2. Los métodos que emplean el polipéptido según 30 la invención *in vitro* pueden llevarse a cabo en diferentes formatos, tal como en placas de microtitulación, en sistemas agrupados de proteínas, sobre superficies de biosensor, sobre secciones de tejido, y similares.

35 Se pueden realizar diferentes modificaciones, y/o adiciones, en el polipéptido según la invención con el fin de ajustar el polipéptido al uso específico pretendido, sin alejarse del alcance de la presente invención. Dichas modificaciones y adiciones se describen en más detalle a continuación, y pueden comprender aminoácidos adicionales comprendidos en la misma cadena de polipéptido, o etiquetas y/o agentes terapéuticos que están conjugados químicamente, o si no ligados, al polipéptido según la invención.

40 Expresiones tales como "afinidad de unión a HER2", "unión a HER2" y similares se refieren a una propiedad de un polipéptido que puede ser evaluada, p. ej., mediante el uso de tecnología de resonancia de plasmón superficial, tal como en un instrumento Biacore® (GE Healthcare). Se puede evaluar la afinidad de unión a HER2 en un experimento en el que se inmoviliza HER2, o un fragmento del mismo, p. ej. el dominio extracelular, o una proteína de fusión del mismo, sobre un chip sensor del instrumento, y se hace pasar sobre el chip una muestra que contenga el polipéptido que va a ser evaluado. Alternativamente, el polipéptido a evaluar se inmoviliza sobre un chip sensor del instrumento, y se hace pasar sobre el chip una muestra que contenga HER2, o un fragmento del mismo, p. ej. el dominio extracelular. El especialista puede interpretar después los sensogramas obtenidos para establecer una medida al menos cualitativa de la afinidad de unión del polipéptido a HER2. Si se busca una medida cuantitativa, p. ej., con el propósito de establecer un determinado valor  $K_D$  para la interacción, de nuevo es posible usar métodos de resonancia de plasmón superficial. Por ejemplo, los valores de unión pueden definirse en un instrumento Biacore® 2000 (GE Healthcare). Se inmoviliza HER2, o un fragmento del mismo, p. ej. el dominio extracelular, sobre un chip sensor del instrumento, y se preparan muestras del polipéptido del cual se va a determinar la afinidad mediante dilución en serie y se inyectan en un orden aleatorio. Entonces se pueden calcular los valores de  $K_D$  a partir de los resultados, usando, p. ej., el modelo de unión de Langmuir 1:1 del software de BIAevaluation 3.2 suministrado por el fabricante del instrumento.

45 La invención también abarca polipéptidos en los que el polipéptido de unión a HER2 descrito anteriormente está presente como un dominio de unión a HER2, al cual se han añadido residuos de aminoácido adicionales sobre cualquier extremo. Estos residuos de aminoácido adicionales pueden desempeñar una función en la unión de HER2 y el polipéptido, pero sirven igualmente para otros propósitos, relacionados por ejemplo con uno o más de los siguientes, producción, purificación, estabilización, acoplamiento o detección del polipéptido. Dichos residuos de aminoácido adicionales pueden comprender uno o más residuos de aminoácido añadidos con fines de acoplamiento químico. Un ejemplo de esto es la adición de un residuo de cisteína en la primerísima o en la última posición de la

5 cadena del polipéptido, es decir en el extremo N ó C. También se puede introducir un residuo de cisteína para ser usado en acoplamiento químico mediante sustitución de otro aminoácido sobre la superficie del dominio de la proteína, preferiblemente sobre una porción de la superficie que no esté implicada en la unión de diana. Dichos residuos de aminoácido adicionales pueden comprender también una "etiqueta" para la purificación o detección del polipéptido, tal como una etiqueta de hexahistidilo (His<sub>6</sub>), o una etiqueta "myc" o una etiqueta "FLAG" para la interacción con anticuerpos específicos de la etiqueta. El especialista es consciente de otras alternativas.

En una realización específica de un polipéptido que tiene residuos de aminoácido adicionales, la invención proporciona un polipéptido de unión a HER2 que comprende la secuencia de aminoácido

**AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK  
LNDSQAPKVD C**  
(SEQ ID NO:5).

10 En otra realización específica de un polipéptido que tiene residuos de aminoácido adicionales, la invención proporciona un polipéptido de unión a HER2 que comprende la secuencia de aminoácido

**ESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK  
LNDSQAPK**  
(SEQ ID NO:6).

15 Los "residuos de aminoácido adicionales" discutidos antes también pueden constituir uno o más dominios de polipéptido con cualquier función deseada, tal como la misma función de unión que el primer dominio de unión a HER2, u otra función de unión, o una función enzimática, o una función fluorescente, o mezclas de las mismas.

20 Por tanto, la invención abarca multímeros del polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias de SEQ ID NO: 1-6. Por ejemplo, puede ser de interés cuando se usa el polipéptido según la invención para diagnóstico o tratamiento de cáncer o en un método de purificación de HER2, para obtener una unión a HER2 incluso más fuerte de lo que es posible con un polipéptido según la invención. En este caso, la provisión de un multímero, tal como un dímero, trímero o tetrámero, del polipéptido puede proporcionar los efectos de avidez necesarios. El multímero puede consistir en un número adecuado de polipéptidos según la invención. Las "unidades" de polipéptido ligadas en un multímero según la invención pueden estar conectadas mediante un acoplamiento covalente usando métodos de química orgánica conocidos, o se pueden expresar como uno o más polipéptidos de fusión en un sistema para la expresión recombinante de polipéptidos, o unirse de cualquier otra manera, bien directamente o a través de un ligando, por ejemplo un ligando de aminoácido.

25 Adicionalmente, también se contemplan polipéptidos de fusión "heterogénicos", en los que el polipéptido que comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1-6 constituye un primer dominio, o un primer resto, y el segundo y demás restos tienen otras funciones distintas de la unión a HER2, y entran dentro del ámbito de la presente invención. El segundo y demás resto/restos del polipéptido de fusión pueden comprender un dominio de unión con afinidad hacia otra molécula diana distinta de HER2. Entonces el resultado es un polipéptido de fusión que tiene al menos un dominio de unión a HER2 y al menos un dominio con afinidad por dicha otra molécula diana. Esto hace posible crear reactivos multiespecíficos que se pueden usar en diversas aplicaciones biotecnológicas, tal como usarse como agentes terapéuticos o como reactivos de captura, detección o separación. La preparación de dichos multímeros multiespecíficos de polipéptidos, en los que al menos un dominio de polipéptido comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1-6, puede efectuarse como se ha descrito antes para el multímero de varias "unidades" de unión a HER2. El segundo y demás resto o restos pueden ser una variante de un dominio derivado de la proteína A de *Staphylococcus aureus*, tal como una variante del "dominio Z" o de la "proteína Z" (Nilsson B et al. (1987), ver anterior), o comprender una proteína no relacionada, natural o recombinante (o un fragmento de la misma que retenga la capacidad de unión de la proteína natural o recombinante) que presente una afinidad de unión por una diana. Un ejemplo de dicha proteína de unión, que presenta una afinidad por albúmina de suero humana y que puede usarse como pareja de fusión con el polipéptido según la invención, es uno de los dominios de unión de albúmina de la proteína G de la cepa G148 de *Streptococcus* (Nygren P-Å et al. (1988) Mol Recogn 1: 69-74), tal como el dominio GA1, GA2 ó GA3. El dominio GA3 de la proteína G también se denomina ABD, es decir, dominio de unión a albúmina (del inglés "albumin binding domain"). Por lo tanto, un polipéptido de fusión entre el polipéptido de unión a HER2 que comprende cualquiera de las secuencias SEQ ID NO: 1-6 y un dominio de unión a albúmina de la proteína G estreptococcal entra dentro del alcance de la presente invención. Cuando el polipéptido según la invención se administra a un sujeto humano como un agente de diagnóstico, un agente terapéutico o un agente dirigido, su fusión con un resto que se une a albúmina de suero puede ser beneficiosa, ya que es probable que la vida media *in vivo* de dicha proteína de fusión sea más larga que la vida media del resto de unión a HER2 aislado (este principio se ha descrito, p. ej., en el documento WO91/01743). Del mismo modo, es probable que el polipéptido de fusión exhiba una menor inmunogenicidad que el resto de unión a HER2 aislado, cumpliendo los principios elucidados en WO2005/097202.

50 También se contemplan otras posibilidades para la creación de polipéptidos de fusión. Así, el polipéptido según el primer aspecto de la invención puede acoplarse covalentemente a un segundo o demás resto o restos, que además

de, o en lugar de, unión a la diana presenta otras funciones. Un ejemplo es una fusión entre uno o más polipéptido(s) que comprenden una cualquiera de las secuencias con SEQ ID NO: 1-6 y un polipéptido enzimáticamente activo que actúa como resto indicador o efector. Los ejemplos de enzimas indicadoras, que pueden acoplarse al polipéptido que comprende una cualquiera de las secuencias con SEQ ID NO: 1-6 para formar una proteína de fusión, son conocidos por los especialistas e incluyen enzimas tales como  $\beta$ -galactosidasa, fosfatasa alcalina, peroxidasa de rábano, carboxipeptidasa. Otras opciones para el segundo y demás resto o restos de un polipéptido de fusión según la invención incluyen polipéptidos fluorescente, tales como proteína fluorescente verde, proteína fluorescente roja, luciferasa y variantes de las mismas.

5 Otras opciones para el segundo y demás resto o restos de un polipéptido de fusión según la invención incluyen un resto o restos para aplicaciones terapéuticas. En las aplicaciones terapéuticas, también se pueden acoplar otras 10 moléculas, covalentemente o no covalentemente, al polipéptido de la invención por otros medios. Los ejemplos no limitantes incluyen enzimas para aplicaciones ADEPT (terapia de profármaco de enzima dirigido a anticuerpo, del inglés "antibody-directed enzyme prodrug therapy") usando el polipéptido según la invención para la dirección de la 15 enzima efectora (p. ej., carboxipeptidasa); proteínas para el reclutamiento de células efectoras y otros componentes del sistema inmune; citocinas, tales como IL-2, IL-12, TNF $\alpha$ , IP-10; factores pro-coagulantes, tales como factor de tejido, factor de von Willebrand; toxinas, tales como ricino A, exotoxina de *Pseudomonas*, calqueamicina, maytansinoid; moléculas pequeñas tóxicas, tales como análogos de auristatina, doxorrubicina.

20 Con respecto a la descripción anterior sobre proteínas de fusión que incorporan el polipéptido de unión a HER2 según la invención, cabe destacar que la designación del primer, segundo y demás restos se realiza con fines de 25 aclaratorios para distinguir entre el resto o restos de unión a HER2 por un lado, y los restos que presentan otras funciones por otro lado. Estas designaciones no pretenden referirse al orden real de los diferentes dominios de la cadena de polipéptido de la proteína de fusión. Por tanto, por ejemplo, dicho primer resto puede aparecer sin restricción en el extremo N-terminal, en el medio, o en el extremo C-terminal de la proteína de fusión.

25 La invención abarca polipéptidos en los que al polipéptido de unión a HER2 descrito anteriormente se le ha provisto con un grupo marcador, tal como al menos un fluoróforo, biotina o un isótopo radiactivo, por ejemplo con fines de 30 detección del polipéptido. En particular, la invención abarca un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 como el descrito anteriormente y un radionucleido, tal como un metal radiactivo.

35 La mayoría de los radionúclidos tienen naturaleza metálica y los metales típicamente son incapaces de formar 30 enlaces covalentes estables con los elementos presentes en proteínas y péptidos. Por esta razón, el marcado de proteínas dirigidas con metales radiactivos se lleva a cabo mediante el uso de quelantes, ligandos multidentados, que forman compuestos no covalentes, denominados quelatos, con el metal. En una realización del polipéptido según la invención, la incorporación de un radionucleido se consigue mediante la provisión de un entorno quelante, a través del cual el radionucleido puede coordinarse, quelarse o complejarse con el polipéptido.

40 Un quelante N<sub>3</sub>S puede proporcionarse a través de una selección adecuada de residuos de aminoácido en la 40 secuencia de aminoácidos del polipéptido.

45 Por ejemplo, se puede proporcionar un entorno quelante N<sub>3</sub>S a través del acoplamiento de mercaptoacetilo al extremo N del polipéptido según la invención. En esta realización, el mercaptoacetilo proporciona el átomo de S necesario, mientras que los primeros tres átomos de N de la cadena del péptido constituyen los tres átomos de N del quelante tetradentado. Preferiblemente, el mercaptoacetilo se acopla a un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 como la secuencia de aminoácidos más N-terminal, dando como resultado un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos

**maESEKYAKEX<sub>1</sub>R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ**

**SSELLX<sub>2</sub>EAKK LNDSQ,**

donde ma es mercaptoacetilo, X<sub>1</sub> de la posición 9 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> de la posición 46 es S ó C. En una realización particularmente preferida de esto el polipéptido tiene la secuencia:

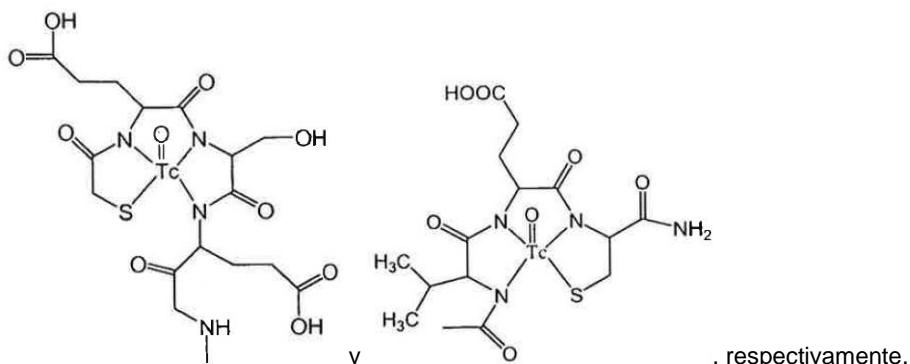
**maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ**

**SSELLSEAKK LNDSQAPK,**

donde ma es mercaptoacetilo

(SEQ ID NO: 7)

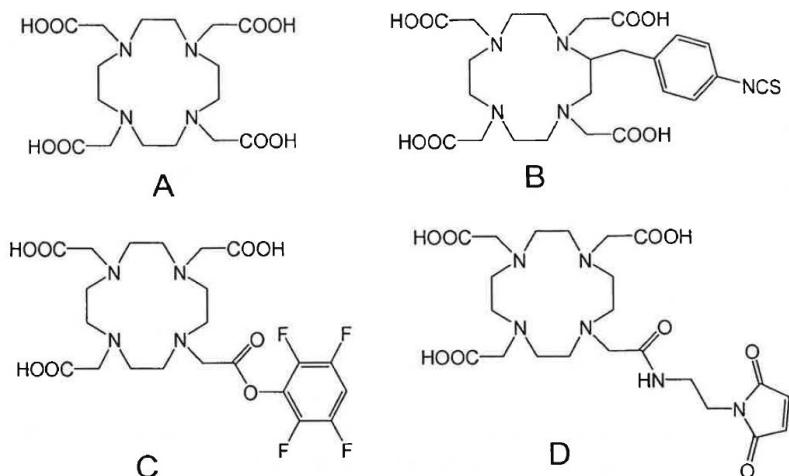
- En una realización alternativa, los tres grupos N pueden ser proporcionados por los átomos de N de tres enlaces peptídicos consecutivos de la cadena de polipéptido, de los cuales el último es un residuo de cisteína, que comprende un grupo SH en su cadena lateral. El átomo de S de la cadena lateral de la cisteína constituye el átomo de S del quelante N<sub>3</sub>S. O visto de otro modo, el quelante N<sub>3</sub>S es proporcionado en forma de una secuencia 5 tripeptídica XXC, donde X es cualquier residuo de aminoácido. Dicha secuencia de tres péptidos puede estar comprendida en el polipéptido según la invención inicialmente o puede añadirse como uno o más aminoácidos adicionales. Se prefiere que el residuo de cisteína sea uno situado en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 5, o que una cisteína adicional se sitúe inmediatamente en el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 ó 6-7. El residuo de cisteína también puede venir seguido de uno o más residuo(s) de aminoácido.
- 10 Un polipéptido según la invención que comprende un entorno quelante tetracentrado que se caracteriza como un quelante N<sub>3</sub>S, proporcionado por un mercaptoacetilo acoplado al extremo N y los tres átomos de nitrógeno de tres enlaces peptídicos consecutivos, o por los átomos de nitrógeno de tres enlaces peptídicos consecutivos y un residuo de cisteína en el extremo C del polipéptido, puede usarse para proporcionar un polipéptido radiomarcado que consista en un radioquelato del polipéptido de unión de HER2 y un radionucleido adecuado para estudios de imagen 15 médica, siendo dicho radionucleido <sup>99m</sup>Tc (Engfeldt *et al.* (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34 (5): 722-22; Engfeldt *et al.* (2007) Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging 34 (11): 1843-53), o con un radionucleido adecuado para terapia, seleccionándose dicho radionucleido del grupo que consiste en <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re. En algunas realizaciones, el radionucleido está acomplejado con el polipéptido de unión a HER2 a través de un entorno quelante.
- 20 Cuando el polipéptido según la invención comprende dos, tres o más tripéptidos XXC, es preferible que el terminal se use para acomplejar el radionucleido. Cuando el polipéptido es radiomarcado de este modo, el(los) otro(s) tripéptido(s) XXC preferiblemente está(n) protegidos.
- Una realización particularmente preferida de un polipéptido radiomarcado según la invención es un radioquelato de 25 un polipéptido de unión a HER2 que tiene la secuencia de aminoácidos maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK, donde ma es mercaptoacetilo (SEQ ID NO: 7) y <sup>99m</sup>Tc.
- 25 Las estructuras hipotéticas de quelatos de quelatos de <sup>99m</sup>Tc usando maESE- en el extremo N o -VDC en el extremo C del polipéptido son:



- En una realización alternativa de un polipéptido según la invención, se usa un quelante de poliaminopolícarboxilato 30 para incorporar el radionucleido. Preferiblemente, el polipéptido comprende entonces al menos una cisteína, y más preferiblemente comprende solo una cisteína. La(s) cisteína(s) puede(n) estar presente(s) en el polipéptido según la invención inicialmente o puede(n) añadirse en una etapa posterior como uno o más aminoácidos adicionales.

- El especialista también podría prever una serie de otros quelantes, capaces de quelar núcleos tales como Me “desnudo”, Me=O, O=Me=O, Me≡N, Me(CO)<sub>3</sub> ó núcleo de col-ligando(s) HYNIC-Me (donde Me es un isótopo 35 radiactivo de Tc ó Re), que puede estar unido en un sitio del polipéptido –específicamente durante la síntesis peptídica o conjugado a un polipéptido producido recombinantemente usando química de conjugación conocida para el radiomarcado. Preferiblemente, dichos quelantes tienen un carácter hidrofílico. Una buena revisión de dichos quelantes se puede encontrar en Liu S y Edwards DS (1999) Chem Rev. 99 (9): 2235-68.

- Se pueden distinguir dos clases de quelantes de poliaminopolícarboxilato: macrocíclicos y acíclicos.
- 40 Los quelantes macrocíclicos usados más habitualmente para radioisótopos de indio, galio, itrio, bismuto, radioactínidos y radiolantánidos son diferentes derivados de DOTA (ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético) (ver más adelante). Varios compuestos diferentes basados en DOTA adecuados para uso como quelantes con los polipéptidos según la invención se encuentran disponibles comercialmente, por ejemplo en Macrocylics Inc., EE.UU., y a continuación se muestran ejemplos.



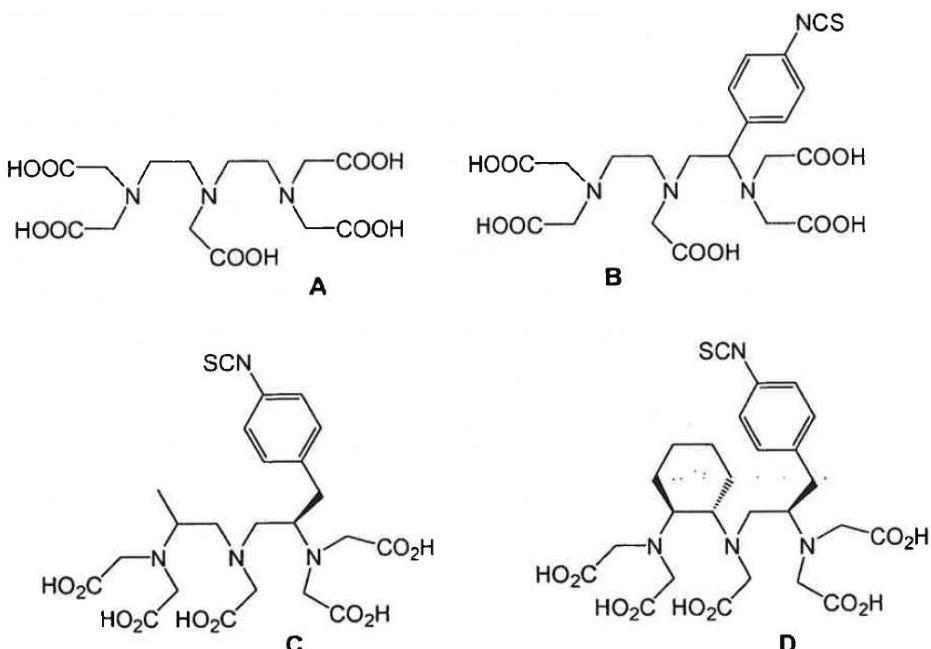
En esta figura, A es DOTA, B es 4-isothiocyanato-bencil-DOTA amino-reactivo, C es éster DOTA-TFP y D es maleimido-monoamida DOTA tiol-reactivo.

La elevada inertidad cinética, es decir la baja velocidad de disociación del metal del DOTA, favorece la unión estable de un radionucleido. Sin embargo, se necesitan temperaturas elevadas para el marcado debido a la baja velocidad de asociación. Por esta razón, los derivados de DOTA se usan ampliamente para el marcado de péptidos cortos, que son relativamente insensibles al calentamiento a 60-90°C.

Un derivado preferido para uso como quelante en la presente invención es la 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético.

Como se ha descrito anteriormente, el polipéptido según la invención puede comprender por ejemplo la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 5. En una realización más específica, el polipéptido comprende la SEQ ID NO: 5 y tiene el compuesto tetraazaciclo acoplado al residuo de aminoácido C61. En una realización particularmente preferida, el compuesto tetraazaciclo es 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético, que ha sido acoplada al polipéptido mediante reacción del grupo SH del residuo C61 con el resto maleimido del compuesto tetraazaciclo. Una realización particularmente preferida de la invención es, por tanto, un polipéptido de unión a HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQUAPKVD C (SEQ ID NO: 5) acoplada a 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético.

Los quelantes de poliaminopolícarboxilato acíclico usados más habitualmente son distintos derivados del DTPA (ácido dietilentriamina-pentaacético), tales como los mostrados en el esquema siguiente, donde A es DTPA, B es el derivado aminorreactivio isotiocianatobencil-DTPA, C es el derivado aminorreactivio semirrígido 2-(para-isotiocianatobencil)-6-metil-DTPS (IB4M), y D es el derivado aminorreactivio CHX-A"-DTPA.



Se ha observado que las variantes semi-rígidas modificadas en la cadena principal del DTPA proporcionan una estabilidad adecuada para el marcado con  $^{90}\text{Y}$  de, p. ej., Zevalin®. Aunque los quelantes acíclicos son menos inertes, y por consiguiente menos estables, que los macrocíclicos, su marcado se suficientemente rápido incluso a temperatura ambiente. Por esta razón, podrían ser preferibles para el marcado de anticuerpos monoclonales, que no toleran la calefacción. Los protocolos detallados para el acoplamiento de quelantes de poliaminopolícarboxilato a proteínas y péptidos dirigidos contra una diana han sido publicados por Cooper y colaboradores (Nat. Protoc. 1: 314-7, 2006) y Sosabowski y Mather (Nat. Protoc. 1: 972-6, 2006).

Se puede usar un polipéptido según la invención acoplado a un quelante de poliaminopolícarboxilato para proporcionar un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato del polipéptido e unión a HER2 acoplado al quelante y un radionucleido adecuado para la obtención de imágenes médicas, seleccionándose dicho radionucleido del grupo que consiste en  $^{61}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{110m}\text{In}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{44}\text{Sc}$  e  $^{86}\text{Y}$ , o con un radionucleido adecuado para terapia, seleccionándose dicho radionucleido del grupo que consiste en  $^{225}\text{Ac}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{166}\text{Ho}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{212}\text{Pb}$ ,  $^{149}\text{Pm}$ ,  $^{153}\text{Sm}$ ,  $^{227}\text{Th}$  e  $^{90}\text{Y}$ , donde el radionucleido forma un complejo con el polipéptido de unión a HER2.

Una realización particularmente preferida de un polipéptido radiomarcado según la invención es el radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 que tiene la secuencia de aminoácidos

AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQUPKVD C (SEQ ID NO: 5) acoplada a 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético e  $^{111}\text{In}$

20 Una realización particularmente preferida de un polipéptido radiomarcado según la invención es el radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 que tiene la secuencia de aminoácidos

AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQUPKVD C (SEQ ID NO: 5) acoplada a 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético y  $^{61}\text{Cu}$  y  $^{64}\text{Cu}$ .

Una realización particularmente preferida de un polipéptido radiomarcado según la invención es el radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 que tiene la secuencia de aminoácidos

AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQUPKVD C (SEQ ID NO: 5) acoplada a 10-maleimidoethylacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético y  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  ó  $^{68}\text{Ga}$

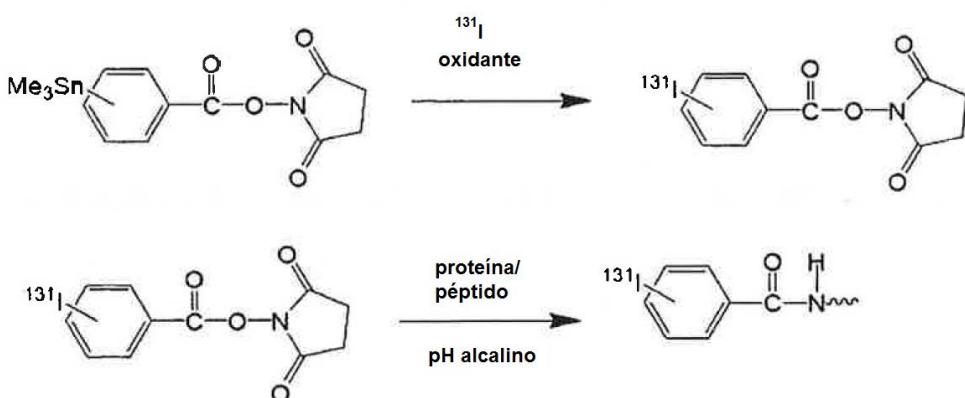
30 Una realización particularmente preferida de un polipéptido radiomarcado según la invención es el radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 que tiene la secuencia de aminoácidos

AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQUPKVD C (SEQ ID NO: 5) acoplada a 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético e <sup>86</sup>Y.

El polipéptido radiomarcado según la invención también puede obtenerse mediante marcado indirecto de un polipéptido de unión a HER2 como se ha descrito antes. Preferiblemente, el polipéptido comprende al menos una

cisteína, y lo más preferiblemente comprende solo una cisteína. La(s) cisteína(s) puede(n) estar presente(s) en el polipéptido según la invención inicialmente o puede(n) añadirse en una etapa posterior como uno o más aminoácidos adicionales. Para el marcado indirecto con, por ejemplo,  $^{18}\text{F}$ ,  $^{76}\text{Br}$ , se usan diferentes isótopos de yodo y  $^{211}\text{At}$ , “moléculas ligando” intermedias. Dichos ligandos deberían contener dos restos funcionales, uno que proporcione un radiomarcado rápido y eficiente, y otro que permita un acoplamiento rápido y eficiente a las proteínas, p. ej., a grupos amino, o preferiblemente al grupo tiol de una única cisteína. Por ejemplo, un grupo malemida reacciona con grupos tiol para formar un enlace de tioéter estable. La idea es hacer reaccionar primero la “molécula ligando” con la radiomarca y posteriormente con el grupo tiol de la proteína.

Se están investigando intensamente varias alternativas para la radioyodación, donde el radiomarcado de la molécula ligando se ha realizado, p. ej., sobre un anillo fenólico activado o sobre un anillo aromático con un grupo saliente adecuado. Vaidyanathan *et al.* (Vaidyanathan G y Zalutsky MR (2006) Nat Protoc. 1 (2): 707-13) han proporcionado un protocolo detallado para la preparación de ligandos no marcados y radioyodación usando N-succinimidil 3-[ $^3\text{H}$ ]-yodobenzoato. Un ejemplo de radioyodación indirecta usando N-succinimidil trimetilestanylbenzoato se muestra en el siguiente esquema.



15 En este esquema, la molécula ligando se radioyoda primero en condiciones ácidas y después es acoplada a la amina libre (extremo N del grupo  $\epsilon$ -amino de la lisina) en condiciones alcalinas. En bibliografía se han descrito tanto los meta-yododerivados como los para-yododerivados de benzoato.

20 La molécula ligando puede comprender un grupo arilo que une la radiomarca (p. ej., en la posición 2-, 3- ó 4-), siempre que cuando la radiomarca sea  $^{76}\text{Br}$ , entonces la molécula ligando no incluye un grupo OH fenólico. Los ejemplos no limitantes de moléculas ligando comprenden una imida heterocíclica que puede usarse para unir el polipéptido de la invención y la radiomarca, e incluyen *N*-[2-benzamidoetil]-malemida, 4-maleimidobenzofenona (BPMal), succinimidil 4-(*p*-maleimidofenil)-butirato (SMPB), hidrocloruro de hidracida de ácido 4-(4-*N*-maleimidofenil)-butírico (MPBH) y éster de maleimidobenzoil-*N*-hidroxisuccinimida (MBS).

25 La *N*-[2-benzamidoetil]-malemida se puede hacer reaccionar con  $^{18}\text{F}$  para formar *N*-[2-(4-(18F-fluorobenzamido)-etil]-malemida. Asimismo, se puede hacer reaccionar con  $^{76}\text{Br}$  como describen Cai *et al.* (J. Nucl. Med. 47: 1172-80, 2006).

30 La presente invención también se ocupa de diferentes aspectos del uso del polipéptido de unión a HER2 descrito antes, así como a diversos métodos para tratamiento, diagnosis y detección en los que el polipéptido es útil debido a sus características de unión. Cuando se hace referencia al “polipéptido de unión a HER2” en la siguiente descripción de dichos usos y métodos, este término pretende abarcar el polipéptido de unión a HER2 solo, pero también a aquellas moléculas basadas en dicho polipéptido descritas anteriormente que, p. ej., incorporen el polipéptido de unión a HER2 como un resto en una proteína de fusión y/o que estén conjugadas a una marca, un quelante, un agente terapéutico y/o diagnóstico y/o que estén provistos de residuos de aminoácido adicionales en forma de marca o para otros propósitos. Como se ha explicado anteriormente, dichas proteínas de fusión, derivados, etc., forman parte de la presente invención.

35 Por tanto, en dicho aspecto, la invención proporciona un método para la obtención de imágenes *in vivo* del organismo de un sujeto mamífero, que incluye un humano, que padece o que se sospecha que padece un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de HER2, comprendiendo el método las siguientes etapas:

- 40 - Administración de un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente, que comprende un radionucleido adecuado para la obtención de imágenes médicas, al organismo de un sujeto mamífero; y
- Obtener una imagen de al menos una parte del organismo del sujeto usando un instrumento de obtención de imágenes médicas, indicando dicha imagen la presencia del radionucleido en el interior de dicho

- organismo. Preferiblemente, la imagen se obtiene pasadas 1-72 horas de la administración del polipéptido radiomarcado al organismo, o en algunos casos incluso más preferiblemente pasadas 1-24 horas. El tiempo entre la administración y la obtención de la imagen depende de la vida media del radionúcleido usado. Es posible repetir la etapa de obtención de imagen dos, tres o más veces, con lo que se obtiene una serie de imágenes. Eso es útil cuando se quiere seguir la biodistribución con el tiempo de un agente dirigido a diana, y permite realizar estudios farmacocinéticos. El especialista apreciará que se podría obtener un número cualquiera de imágenes, con el objetivo de alcanzar el grado requerido de resolución temporal en dicho estudio.
- En una realización del método de obtención de imágenes según la invención, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado según la invención, etapa que comprende mezclar un polipéptido según el primer aspecto con un radionúcleido adecuado para la obtención de imágenes médicas.
- En una realización más específica del método de obtención de imágenes según la invención, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado de i) un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en SEQ ID NO: 7 con ii)  $^{99m}\text{Tc}$ , etapa que comprende mezclar el polipéptido con  $^{99m}\text{Tc}$ -perteclenetato en presencia del agente reductor apropiado, p. ej., cloruro o fluoruro estañoso, en una disolución tamponante apropiada. Esto podría realizarse también en presencia de un intermedio quelante débil, p. ej. tartrato, o citrato o gluconato.
- En otra realización específica del método de obtención de imágenes según la invención, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado de i) un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 5 conjugada con 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético con ii)  $^{111}\text{In}$ , etapa que comprende mezclar el conjugado con  $^{111}\text{In}$  en un tampón apropiado que prevenga la formación de coloides no solubles, por ejemplo (aunque sin limitación) tampón de acetato o de citrato.
- En otra realización específica del método de obtención de imágenes según la invención, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado de i) un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 5 conjugada con 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético con ii)  $^{61}\text{Cu}$  ó  $^{64}\text{Cu}$ , etapa que comprende mezclar el conjugado con  $^{61}\text{Cu}$  ó  $^{64}\text{Cu}$  en un tampón apropiado que prevenga la formación de coloides no solubles, por ejemplo (aunque sin limitación) tampón de acetato o de citrato.
- En otra realización específica del método de obtención de imágenes según la invención, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado de i) un polipéptido cuya secuencia de aminoácidos consiste en la SEQ ID NO: 5 conjugada con 10-maleimidoetilacetamida de ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7-tris-acético con ii)  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  ó  $^{68}\text{Ga}$ , etapa que comprende mezclar el conjugado con  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{67}\text{Ga}$  ó  $^{68}\text{Ga}$  en un tampón apropiado que prevenga la formación de coloides no solubles, por ejemplo (aunque sin limitación) tampón de acetato o de citrato.
- En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, dicho cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer salivar, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.
- En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente para uso en diagnosis. El término "diagnosis" se usa en la presente memoria con el objetivo de describir el acto o el proceso de identificar o determinar la naturaleza y la causa de una enfermedad a través de la evaluación del historial del paciente, un examen y una revisión de los datos de laboratorio.
- El polipéptido radiomarcado se puede usar en diagnosis de un cáncer que pertenezca al grupo de cánceres que se caracteriza por la aparición frecuente de sobreexpresión de HER2. El término "aparición frecuente" se usa en la presente memoria para denotar que la sobreexpresión de HER2 está presente en al menos un 10% de todos los pacientes que presentan un cáncer específico. Por tanto, el polipéptido radiomarcado puede usarse en el proceso de decidir si un paciente padece o no un cáncer de este tipo. También puede usarse en el proceso de decidir sobre el tratamiento adecuado de un paciente. Particularmente, la detección de la sobreexpresión de HER2 puede ser útil para la estratificación de pacientes para una terapia dirigida a HER2, p. ej. tratamiento con trastuzumab (Herceptin®).
- El polipéptido radiomarcado también puede usarse en diagnosis y/o en la caracterización molecular de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer salivar, cáncer de pulmón y cáncer de esófago. En este contexto, la caracterización molecular se refiere a la caracterización de la expresión de HER2, es decir por ejemplo para determinar si existe o no cualquier expresión de HER2, para determinar la cantidad de expresión de HER2, p. ej. antes y después del tratamiento, lo que puede llevarse a cabo obteniendo imágenes antes y después del tratamiento, y para determinar la extensión o el contenido anatómico de la expresión de HER2, p. ej. con fines quirúrgicos.

También se proporciona, en otro aspecto adicional de la invención, el uso de un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente en la preparación de un agente diagnóstico para obtener imágenes *in vivo* del organismo del sujeto animal, que incluye humano.

5 En otro aspecto de aplicación, la invención proporciona un método de tratamiento de un sujeto mamífero, que incluye humano, que padece un cáncer caracterizado por la sobreexpresión de HER2, que comprende la etapa de administrar un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente, que comprende un radionucleido adecuado para terapia, dentro del organismo de dicho sujeto mamífero en una cantidad terapéuticamente eficaz.

En una realización de este aspecto, el método comprende, antes de la etapa de administración, una etapa preparatoria para preparar un polipéptido radiomarcado según la invención, etapa que puede comprender:

- 10 - mezclar un polipéptido según el primer aspecto con un radionucleido metálico adecuado para la terapia en un tampón apropiado; o
- mezclar un polipéptido según el primer aspecto con perrenato en un tampón apropiado en presencia de un agente reductor apropiado; esto también podría realizarse en presencia de un intermedio quelante débil, p. ej. tartrato, o citrato o gluconato, o
- 15 - mezclar un polipéptido según el primer aspecto con un intermedio reactivo de renio, tal como un complejo de tricarbonilo; o
- mezclar un polipéptido según el primer aspecto con un intermedio reactivo con un átomo de halógeno unido en un tampón apropiado. Dicho mezclamiento debería llevarse a cabo en presencia de sustancias diseñadas para suprimir la radiolisis del polipéptido, tal como ácido ascórbico o ácido gentísico.

20 En algunas realizaciones de este aspecto de la invención, dicho cáncer se selecciona entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer salivar, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.

En otro aspecto, la invención proporciona un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente para uso en terapia, tal como para uso en terapia de un cáncer que se caracteriza por la sobreexpresión de HER2, por ejemplo para uso en terapia de un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer salivar, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.

También se proporciona, en otro aspecto adicional de la invención, el uso de un polipéptido radiomarcado como el descrito anteriormente en la preparación de un medicamento para el tratamiento de un cáncer que se caracteriza por la sobreexpresión de HER2, tal como un cáncer seleccionado entre cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer salivar, cáncer de pulmón y cáncer de esófago.

30 Otro aspecto de la presente invención se refiere a una molécula de ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica un polipéptido como el descrito anteriormente.

Un aspecto adicional de la presente invención se refiere a un vector de expresión que comprende la molécula de ácido nucleico del aspecto previo, y otros elementos de ácido nucleico que posibiliten la producción del polipéptido según la invención a través de la expresión de la molécula de ácido nucleico.

35 Otro aspecto adicional de la presente invención se refiere a una célula hospedante que comprende el vector de expresión del aspecto previo.

Los últimos tres aspectos de la invención son herramientas para la producción de un polipéptido según la invención, y el especialista será capaz de obtenerlos y ponerlos en uso práctico sin una dificultad excesiva, dada la información suministrada en la presente memoria concerniente al polipéptido que va a ser expresado y dado el nivel actual de la técnica de expresión recombinante de proteínas.

40 Sin embargo, el polipéptido según la invención también puede ser producido por otros medios conocidos, que incluyen la síntesis química o la expresión en distintos hospedantes procarióticos o eucarióticos, que incluyen plantas y animales transgénicos.

45 La invención se ilustrará ahora en detalle mediante la descripción de experimentos llevados a cabo de acuerdo a ella. Los ejemplos que se muestran a continuación no deben interpretarse como limitativos. En los ejemplos, se hace referencia a las figuras anexas.

Breve descripción de las figuras

Las secuencias de las moléculas Affibody® se muestran más adelante en la Tabla 1.

50 Figura 1: muestra sensogramas Biacore obtenidos tras inyección de A: 7,8 nM; B: 1,9 nM y C: 0,49 nM de molécula II Affibody® sobre un chip sensor que tiene inmovilizada sobre él la proteína de fusión quimérica HER2/Fc. El grupo SH de la cisteína C-terminal fue bloqueado con *N*-etilmaleimida (NEM).

Figura 2: muestra sensogramas Biacore obtenidos tras inyección de A: 6 nM; B: 1,5 nM y C: 0,38 nM de molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) con DOTA acoplado a la cisteína C-terminal sobre un chip sensor que tiene inmovilizada sobre él la proteína de fusión quimérica HER2/Fc.

Figura 3: muestra sensogramas Biacore obtenidos tras inyección de A: 6 nM; B: 1,5 nM y C: 0,38 nM de molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7) sobre un chip sensor que tiene inmovilizada sobre él la proteína de fusión quimérica HER2/Fc.

Figura 4: muestra la biodistribución de molécula II Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  con DOTA en xenoinjertos de tumor SKOV-3 de ratones BALB/c *nu/nu*. A todos los ratones se les inyectó 1  $\mu\text{g}$  (100 kBq) de molécula II Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$ . Tras 0,5, 1, 4 y 24 horas desde la inyección, los órganos fueron diseccionados, pesados y se midió su contenido en radiactividad en el contador gamma. Se calculó la captación de radiactividad como el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% IA/g).

Figura 5: muestra las relaciones de tumor a órgano de la captación radiactiva medida en el estudio de biodistribución descrito en la Figura 4.

Figura 6: muestra la especificidad de tumor de la molécula II Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  con DOTA en xenoinjertos de tumor SKOV-3. Se inyectó a todos los ratones 1  $\mu\text{g}$  (100 kBq) de molécula II Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  con DOTA. Un grupo de animales fue pretratado con un exceso de molécula Affibody® no marcada (grupo de bloqueo) 50 minutos antes de la inyección de la molécula Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$ . Los órganos fueron diseccionados 4 horas después de la inyección, se pesaron y se midió su contenido en radiactividad en el contador gamma. Se calculó la captación de radiactividad como el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% IA/g).

Figura 7: muestra imágenes de cámara gamma de xenoinjertos de tumor SKOV-3 que expresa HER2 en ratones BALB/c *nu/nu* (parte izquierda, 30 minutos y 4 h p.i.) y xenoinjertos A431 negativos en HER2 (parte derecha, 4 h p.i.). A todos los ratones se les inyectó 3  $\mu\text{g}$  (4,5 MBq) de molécula II Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  con DOTA. K = riñón (del inglés "kidney"), T = tumor.

Figura 8: muestra la biodistribución de molécula X Affibody® marcada con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  en xenoinjertos de tumor SKOV-3 en ratones BALB/c *nu/nu* 4 horas después de la inyección. A todos los ratones se les inyectó 1  $\mu\text{g}$  (65 kBq) de molécula X Affibody® marcada con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Un grupo de animales fue pretratado con un exceso de molécula Affibody® (grupo de bloqueo) 50 minutos antes de la inyección de molécula Affibody® marcada con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . Los órganos fueron diseccionados 4 horas después de la inyección, se pesaron y se midió su contenido en radiactividad en el contador gamma. Se calculó la captación de radiactividad como el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% IA/g).

Figura 9: muestra las relaciones de tumor a órgano de la captación radiactiva medida en el estudio de biodistribución descrito en la Figura 8.

Figura 10: muestra imágenes de cámara gamma de xenoinjertos de tumor SKOV-3 que expresa HER2 en ratones BALB/c *nu/nu* (parte izquierda, 1 h y 4 h p.i.) y xenoinjertos A431 negativos en HER2 (parte derecha, 4 h p.i.). A todos los ratones se les inyectó 3  $\mu\text{g}$  (15 MBq) de molécula X Affibody® marcada con  $^{99\text{m}}\text{Tc}$ . K = riñón, T = tumor.

Figura 11: muestra los perfiles analíticos de elución en HPLC para la molécula X Affibody® en la etapa de síntesis de los aminoácidos 18 a 58. Las moléculas Affibody® fueron separadas en una columna VydacTP218TP54. Caudal: 1 mL/min; Temperatura: 35 °C; Detección: 220 nm; Eluyente A: 0,1% de TFA, 1% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O; Eluyente B: 0,1% de TFA en acetonitrilo.

**A)** Síntesis llevada a cabo sobre resina de poliestireno usando seudoprolinas en las posiciones 22-23, 41-42, 45-46 y 53-54.

**B)** Síntesis estándar de péptidos sobre resina de poliestireno sin seudoprolinas.

Figura 12: muestra los perfiles de elución de HPLC analíticos para la molécula X Affibody® en la etapa de síntesis de los aminoácidos 1 a 58 (**A**) y 10 a 58 (**B**). Las moléculas Affibody® se separaron en una columna Vydac TP218TP54. Caudal: 1 mL/min; Temperatura: 35 °C; Detección: 220°C; Disolvente A: 0,1% de TFA, 1% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O; Disolvente B: 0,1% de TFA en acetonitrilo.

**A)** Síntesis llevada a cabo sobre resina de poliestireno usando seudoprolinas en las posiciones 22-23, 41-42, 45-46 y 53-54.

**B)** Síntesis estándar de péptidos sobre resina de poliestireno sin seudoprolinas.

Figura 13: muestra los gráficos de hidrofobicidad / hidrofilicidad para algunas de las moléculas Affibody® enumeradas en la Tabla 1. **A)** gráfico correspondiente a la molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5), **B)** gráfico correspondiente a la molécula Affibody® con SEQ ID NO: X (SEQ ID NO: 7) y **C)** gráfico correspondiente a la moléculas Affibody® Z00342, la molécula Affibody® original, sin mutaciones, como control. La parte superior de las

figuras muestra la representación usando la escala Kyte-Doolittle y la parte inferior los índices de hidrofobicidad a pH 3,4, determinados mediante HPLC. Los aminoácidos hidrofóbicos presentan valores positivos y los aminoácidos hidrofílicos presentan valores negativos. Se usó una ventana móvil de siete aminoácidos para ambas representaciones. En B) sólo se usó para preparar los gráficos la secuencia de aminoácidos de la molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7), es decir, la molécula X Affibody® sin ma.

Figura 14: muestra los perfiles de elución de HPLC para la molécula II Affibody® según la invención (línea negra) y la molécula Affibody® Z00342 (línea discontinua gris). Las moléculas Affibody® fueron separadas en una columna Zorbax 300SB C8 150 x 2,1 mm, 3,5 µm, usando un caudal de 0,5 mL/min y un sistema de disolventes TFA, agua, acetonitrilo.

## 10 Ejemplos

### Ejemplo 1 – Preparación de un polipéptido según la invención

#### Sumario

En este ejemplo, las moléculas Affibody® específicas de HER2 son subclonadas en un vector de expresión pET System, expresadas a mayor escala en células bacterianas apropiadas y purificadas según los protocolos incluidos a continuación. Las secuencias de aminoácidos de las correspondientes moléculas Affibody® específicas de HER2 de longitud completa se incluyen en la Tabla 1 como moléculas I-XI Affibody®.

#### Clonación de moléculas Affibody®

Los genes que codifican las moléculas I-VIII Affibody® fueron amplificados mediante PCR usando como plantilla dos oligonucleótidos (que abarcan juntos la secuencia Affibody®). Para cada construcción se usó un par de oligonucleótidos plantilla (cada uno de 102 b de longitud) con un solapamiento complementario de 28 pb. El gen Affibody® se amplificó con un cebador directo (sentido), que incluye un sitio *Nde*I y un codón de inicio ATG (para la molécula I Affibody® también se incluyó una secuencia que codifica etiqueta His6 en el cebador) y un cebador inverso (anti-sentido) con codones para los aminoácidos C-terminales, codón de parada y un sitio *Not*I.

La fusión génica de Dominio de Unión a Albúmina (ABD, del inglés "Albumin Binding Domain") y Affibody® de la molécula IX Affibody® fue producido mediante PCR de extensión de solapamiento. La molécula Affibody® que codifica el fragmento fue generada como se ha descrito anteriormente para las moléculas I-VIII Affibody®, con la excepción de que el cebador inverso incluyó una secuencia ligando (con un codón Cys) y el extremo 5' del gen ABD. El gen ABD se amplificó con un cebador directo, que incluye el extremo 3' del gen Affibody® y la secuencia ligando y un cebador inverso con codón de parada y un sitio *Not*I. Posteriormente, se usaron los dos productos de PCR con un solapamiento de 25 pb como plantilla en la amplificación PCR final usando cebador directo de gen Affibody® y cebador inverso de gen ABD, generando la fusión génica Affibody®-ABD.

Los productos de PCR fueron digeridos con las enzimas de restricción *Nde*I y *Not*I, y fueron ligadas en un vector de expresión T7 digerido previamente con las mismas enzimas.

Tabla 1. Secuencia de aminoácidos de las moléculas Affibody® producidas.

Molécula Affibody®	Secuencia de aminoácidos de la proteína madura
I	GSSHHHHHHL QVDAKYAKEM RNAYWEIALL PNLTNQQKRA FIRKLYDDPS QSSELLSEAKK KLNDSQAPK
II (SEQ ID NO: 5)	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKVD C
III	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC
IV	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC
V	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKC
VI	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNDSQAPK
VII	AEAKYAKEIR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNDSQAPK
VIII	AEAKYAKELR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLCEAKK LNDSQAPK
IX	AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPG-CGS-“ABD”

X (SEQ ID NO: 7)	maESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK
XI	YAKELRNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL LCEAKKLNDS QA

*Expresión y recolección de moléculas Affibody®*

Los plásmidos de expresión resultantes fueron transformados en células BL21 (DE3) de *Escherichia coli* usando electroporación. Se seleccionaron bacterias que contienen plásmidos de expresión de agar selectivo que contenía canamicina y se cultivaron a 37°C en 800 mL de TSB+medio YE (30 g/L de caldo de soja tríptico + 5 g/L de extracto de levadura) suplementado con 50 mg/L de canamicina usando un sistema multifermentador (System Greta, Belach Bioteknik AB, Suecia). A una densidad óptica ( $DO_{600nm}$ ) de ~1, la expresión de moléculas Affibody® fue inducida automáticamente mediante la adición de IPTG 0,5 mM. Cinco horas después de la adición de agente de inducción, los cultivos fueron enfriados automáticamente a <12°C. Después, los cultivos fueron recolectados mediante centrifugación (20 minutos a 15.900xg) y se recolectaron 5-10 g de pellet de células bacterianas y se almacenaron en un congelador (-20°C).

*Purificación de molécula I Affibody®*

El pellet de células (3 g) fue resuspendido en 30 mL de un tampón de pH 8 que contenía urea 7 M y 1000 unidades de Benzonasa (Merck). Después de 30 minutos de incubación, el lisato fue clarificado mediante centrifugación y el sobrenadante que contenía la molécula Affibody® marcada con His<sub>6</sub> fue aplicada a una columna Superflow Ni-NTA (Qiagen) de 1,5 mL. La columna se lavó con 20 mL de un tampón de pH 6,3 que contenía urea 7 M y se eluyó con un tampón de pH 4,5 que contenía urea 8 M. Finalmente, el tampón se intercambió por 1xPBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 8,1 mM, pH 7,4) usando una columna PD-10 (GE Healthcare).

*Purificación de moléculas II-VIII Affibody®*

El pellet de células (10 g) se resuspendió en 100 mL de Tris-HCl 20 mM de pH 7,5, suplementado con 2000 unidades de Benzonasa (Merck), alterada mediante ultrasonidos y calentada a 75°C durante 10 minutos. El lisato tratado con calor fue clarificado mediante centrifugación y se aplicó a una columna XK26 empaquetada con 25 mL de Q-Sepharose FF (GE Healthcare), equilibrada previamente con Tris-HCl 20 mM, pH 7,5. Se recolectó el flujo a través de la fracción de la columna y se incubaron las moléculas Affibody® con una cisteína C-terminal con DTT 20 mM durante 1 hora a temperatura ambiente. Se añadió ACN al 5% y se aplicó a una columna Resource 15RPC de 3 mL (GE Healthcare), equilibrada previamente con ACN al 5%, TFA al 0,1% en agua. Tras lavar la columna con 5 volúmenes de columna (VC) de ACN al 5%, TFA al 0,1% en agua, las proteínas ligadas fueron eluídas con un gradiente lineal de 5-32% de ACN, 0,1% de TFA en agua durante 20 VC. Las fracciones que contenían moléculas Affibody® fueron identificadas mediante SDS-PAGE y se agruparon. Finalmente, el tampón fue intercambiado por 1xPBS usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (GE Healthcare).

*Purificación de molécula IX Affibody®*

La partícula celular (5 g) fue resuspendida en 50 mL de tampón TST (Tris-HCl 25 mM, NaCl 200 mM, EDTA 1 mM, 0,055 de Tween 20, pH 8,0) y alterada mediante ultrasonidos. Tras clarificar mediante centrifugación, el sobrenadante se aplicó a una columna XK26 (GE Healthcare) empaquetada con 20 mL de HSA-Sepharose (albúmina de suero humano inmovilizada sobre Sepharose 4 Fast Flow activada con CNBr, GE Healthcare). La columna se lavó con 10 VC de tampón TST seguido de 5 VC de NH<sub>4</sub>Ac 5 mM, pH 5,6. Las moléculas Affibody® ligadas a ABD fueron eluídas con HAc 0,5 M pH 2,8. Finalmente, el tampón se intercambió con 1xPBS usando una columna de desalación HiPrep 26/10 (GE Healthcare).

*Ejemplo 2 – Propiedades de unión a HER2 de un polipéptido según la invención *in vitro**

40 *Sumario*

En los experimentos que constituyen este ejemplo, la unión de polipéptidos según la invención fue analizada usando Resonancia de Plasmón Superficial (SPR, del inglés “Surface Plasmon Resonance”) en un sistema Biacore® 2000. Se muestra la actividad de unión a diana HER2 para las moléculas Affibody® (SEQ ID NO: 5), II con DOTA acoplado a la cisteína C-terminal y X (SEQ ID NO: 7).

45 *Ánalisis de biosensor*

La proteína quimérica recombinante humana HER2/Fc (ErbB2/Fc), que consiste en el dominio extracelular de ErbB2 (HER2, Met<sup>1</sup>-Thr<sup>652</sup>) fusionado a la región Fc de IgG1 humana (Pro<sup>100</sup>-Lys<sup>330</sup>) con una etiqueta His<sub>6</sub> C-terminal (R&D Systems nº 1129-ER), fue inmovilizada (1800 unidades de resonancia (UR) sobre una superficie de un chip sensor CM5 usando química de acoplamiento de aminas. Una superficie del chip fue activada y desactivada para uso como

célula de referencia. Las moléculas Affibody® diluidas en tampón HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, 0,005% de tensioactivo P-20, pH 7,4) se usaron como analitos.

Para el análisis de la cinética de unión, se inyectaron tres concentraciones de analitos por duplicado sobre el chip usando un caudal constante de 50  $\mu$ L/minuto. La fase de asociación fue de 5 minutos, seguida de una fase larga de disociación (30 minutos) para tener en cuenta la baja tasa de salida de moléculas Affibody®. La constante de equilibrio de disociación ( $K_D$ ), la constante cinética de asociación ( $k_a$ ) y la constante cinética de disociación ( $k_d$ ) fueron calculadas usando el modelo de unión de Langmuir 1:1 con una corrección de la transferencia de materia del software BIAevaluation 4.1 (GE Healthcare).

#### *Bloqueo del grupo SH de la cisteína*

Las moléculas Affibody® con una única cisteína C-terminal fueron tratadas con N-etilmaleimida (NEM, Pierce Nº 23030) para bloquear el grupo SH de la cisteína y prevenir con ello la dimerización de las moléculas. La molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) fue reducida tratando 1 mL (2,1 mg) del péptido con 10  $\mu$ L de Tris-HCl, pH 8,5, y 40  $\mu$ L de ditiotreitol (DTT) 0,5 M durante dos horas a temperatura ambiente. El exceso de DDT fue eliminado mediante filtración con gel sobre columnas NAP5 (GE Healthcare) equilibradas con tampón de acoplamiento (fosfato sódico 100 mM, NaCl 150 mM, pH 7,0): cargar la columna con 0,5 mL de proteína reducida, eluir la proteína con 1 mL de tampón de acoplamiento.

El bloqueo del grupo SH libre se llevó a cabo usando un exceso molar 20 a 1 de NEM respecto a proteína: añadir 15  $\mu$ L de disolución NEM en agua (200 mM) a 0,5 mL de disolución de proteína reducida (1 mg/mL) e incubar durante una hora a temperatura ambiente sobre un mezclador de cabeza-sobre-cabeza. El exceso de NEM fue eliminado mediante filtración de gel en columnas NAP5 como se ha descrito anteriormente, utilizando sin embargo PBS como tampón de equilibrado.

#### *Acoplamiento de Maleimida-DOTA a la cisteína C-terminal*

Se redujeron 3 mg de molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) con DTT 20 mM a 40°C durante 30 minutos. El DTT en exceso fue eliminado mediante cambio de tampón en una columna PD-10 a acetato de NH4 0,2M, pH 5,5. El acoplamiento se llevó a cabo con un exceso tres a uno del quelante, maleimido-mono-amida-DOTA (Mal-DOTA, Macrocylics Nº B-272), disolución en agua (1 mg/mL). La mezcla se incubó durante 1 hora a 40°C con agitación continua. La purificación de quelantes no conjugados se realizó en una columna RPC semi-preparativa, Zorbax 300SB C18, 9,4x250 mm, 5  $\mu$ m. El grado de acoplamiento del material purificado se analizó mediante HPLC-MS en una columna analítica Zorbax 300SB C8 de 150x2,1 mm, 3,5  $\mu$ m. Con este método sólo se detectaron moléculas Affibody® conjugadas a maleimida-DOTA.

La interacción de unión a HER2 de la molécula II Affibody® se muestra en los sensógrafos de la Figura 1, la molécula II Affibody® con DOTA acoplado a la cisteína C-terminal en la Figura 2 y la molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7) en la Figura 3.

Se realizó un estudio cinético para determinar los parámetros de unión para la interacción de las moléculas Affibody® con la diana HER2. Se inyectaron tres concentraciones diferentes de las moléculas Affibody® sobre superficies de chip Biacore con proteína de fusión quimérica HER2/Fc inmovilizada. Las constantes de equilibrio de disociación ( $K_D$  =  $k_d/k_a$ ), las constantes cinéticas de asociación ( $k_a$ ) y las constantes cinéticas de disociación ( $k_d$ ) se resumen en la Tabla 2. El acoplamiento de DOTA a la cisteína C-terminal no cambió significativamente la  $K_D$  en comparación con la molécula II Affibody® bloqueada con NEM.

40 Tabla 2

	$k_a$ (1/Ms)	$K_d$ (1/s)	$K_D$ (pM)
Molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) con NEM	1,23 E +07	7,14 E -04	60
Molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) con DOTA	1,27 E +07*	8,10 E -04*	65*†
Molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7)	6,72 E +07	5,57 E -04	83

\* media de 18 determinaciones.

†  $\pm$ 8,66 (STDEV)

Ejemplo 3a – Propiedades de unión a HER2 *in vivo* de los polipéptidos según la invención que tienen un quelante de poliaminopolícarboxilato

#### Sumario

En los experimentos que constituyen este ejemplo se analizó la unión de polipéptidos radiomarcados según la invención *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón. La molécula II Affibody® con DOTA acoplado a la cisteína C-terminal fue radiomarcada con  $^{111}\text{In}$  e inyectada en ratones que portaban xenoinjertos de tumor SKOV-3 que sobreexpresa HER2, y como control en xenoinjertos de tumor A431 negativo para HER2. Se llevaron a cabo estudios de biodistribución y captación de imágenes con cámara gamma para analizar la distribución de la molécula Affibody® radiomarcada en los diferentes órganos, y la localización en el animal entero.

#### 10 Marcado con $^{111}\text{In}$

La molécula II Affibody® fue modificada acoplando mono-amida DOTA (Mal-DOTA) a la cisteína C-terminal como se ha descrito en el Ejemplo nº 2. La molécula resultante se denomina “molécula II Affibody® con DOTA”.

Para el marcado con  $^{111}\text{In}$  se mezclaron 30 µg de la molécula II Affibody® con DOTA (en 30 µL de tampón de acetato de amonio, pH 5,5) con 40,5 µL de disolución de reserva de  $^{111}\text{InCl}_3$  (15 MBq en el momento del marcado). El pH de la mezcla de reacción era ~ 5,0. La mezcla de reacción se incubó a 60°C durante 60 minutos.

La eficacia del marcado se analizó mediante cromatografía de capa fina instantánea (ITLC) sobre láminas de fibra de vidrio impregnadas con gel de sílice (láminas ITLC SG, Gelman Sciences Inc.) usando ácido cítrico 0,02 M como eluyente. La distribución de la radioactividad a lo largo de la tira ITLC se visualizó y cuantificó usando un Phospholmager (Cyclone™ Storage Phosphor System, Packard). Las moléculas Affibody® radiomarcadas permanecía en el origen de la lámina ITLC, mientras que el  $^{111}\text{In}$  libre migraba con el frente de disolvente.

La pureza radioquímica fue de 99,8-99,9 %, es decir, el radiomarcado fue prácticamente cuantitativo. No se requirió ninguna purificación adicional de la molécula Affibody® radiomarcada. La mezcla de reacción se diluyó con PBS hasta 1,4 mL y se mantuvo congelada antes del experimento (1-2 días).

#### Modelo de tumor

#### 25 Se practicaron injertos a ratones BALB/c *nu/nu* hembra criados con $1 \times 10^7$ células SKOV-3 (adenocarcinoma de ascitis de ovario humano) o con $1 \times 10^7$ células A431 (carcinoma epidermoide humano) en la pata trasera derecha. Las células SKOV-3 sobreexpresan HER2 y las células A431 son negativas para HER2.

#### Biodistribución en ratones que portan tumor

#### 30 Para los estudios de biodistribución, se distribuyó aleatoriamente a los ratones que portaban tumores de xenoinjerto (30-40 días después de la implantación de $1 \times 10^7$ células SKOV-3) en grupos de cuatro. Los ratones fueron inyectados en la cola con 1 µg (100 kBq) de molécula Affibody® marcada con $^{111}\text{In}$ en 100 µL de PBS. Todas las inyecciones fueron toleradas bien. Un grupo de animales fue inyectado s.c. con 1,5 mL (0,9 mg) de molécula II Affibody® en la que la Cys C-terminal había sido bloqueada con NEM, como se ha descrito en el ejemplo 2, seguido de inyección i.v. con 1 µg (100 kBq) de molécula Affibody® marcada con $^{111}\text{In}$ 50 minutos después (experimento de bloqueo).

#### 35 Tras la inyección de una dosis letal de una disolución de Ketalar y Rompun, los ratones fueron sacrificados mediante exsanguinaciones por punción cardíaca a las 0,5, 1, 4 y 24 horas después de la inyección (h p.i.). Los animales del grupo de bloqueo fueron sacrificados 4 horas p.i. Los órganos fueron diseccionados, pesados y se midió su contenido en radiactividad en el contador gamma. Se calculó la captación de radiactividad como el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% de AI/g).

#### 40 Obtención de imágenes

Para la obtención de imágenes en cámara gamma, se usaron ratones que portan tumores de xenoinjerto (30-40 días después de la implantación de  $1 \times 10^7$  células SKOV-3 ó 10-15 días después de la implantación de  $1 \times 10^7$  células A431).

#### 45 Los ratones fueron inyectados en la vena de la cola con 3 µg (4,5 MBq) de molécula II Affibody® marcada con $^{111}\text{In}$ en 100 µL de PBS. 0,5 ó 4 horas p.i. se practicó la eutanasia a los animales con una dosis letal de una disolución de Ketalar y Rompun. Se llevó a cabo la obtención de imágenes usando una cámara gamma Millenium GE equipada con un colimador MEGP. Los resultados centellográficos fueron evaluados visualmente usando el software Hermes (Nuclear Diagnostics, Estocolmo, Suecia).

#### 50 Resultados

Los resultados del estudio de biodistribución realizado usando la molécula II Affibody® con DOTA marcada con  $^{111}\text{In}$  se muestran en la Figura 4. La captación de radiactividad a todos los tiempos fue superior en el tumor que en los

demás órganos, distintos del riñón. La captación del tumor era de  $13 \pm 2$  % Al/g ya a las 0,5 horas p.i., aumentó a  $17 \pm 2$  % Al/g a la 1 hora p.i. y disminuyó lentamente desde  $15 \pm 3$  % Al/g a las 4 horas p.i. hasta  $11 \pm 4$  % Al/g a las 24 horas p.i. También se observó una elevada captación de radiactividad en los riñones, lo cual era de esperar puesto que los riñones son el principal mecanismo de excreción de proteínas pequeñas como las moléculas Affibody®.

5 La mayor captación renal con un valor de  $186 \pm 24$  % Al/g, medida a 1 hora p.i., disminuyó hasta  $144 \pm 13$  % Al/g a las 24 horas p.i. Por tanto, la captación renal fue considerablemente menor que la captación renal medida para la molécula Affibody® Z00342 (descrita en el documento WO 2005/003456 como Z<sub>HER2:107</sub>, y a veces también denominada Z<sub>HER2:342</sub>) con DOTA acoplado en el extremo N, es decir,  $243 \pm 22$  % Al/g medido a 1 hora p.i. y  $232 \pm 34$  % Al/g a las 24 horas p.i. (Orlova, A. et al (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). Adicionalmente, la molécula 10 II Affibody® con DOTA marcada con <sup>111</sup>In presentó una menor captación en todos los órganos para todos los tiempos medidos en comparación con la molécula Affibody® específica de HER2 descrita por Orlova, A. et al (2006). La elevada captación tumoral junto con la reducida captación en otros órganos dan lugar a unas relaciones tumor-a-órgano que exceden las relaciones publicadas para la molécula Affibody® descrita previamente (Figura 5). Por ejemplo, la relación tumor-a-sangre fue de 16 a 1 hora p.i., 88 a 4 horas p.i. y 275 a 24 horas p.i., en comparación 15 con 8 (1 h p.i.), 12 (4 h p.i.) y 47 (24 h p.i.) para la molécula Affibody® descrita por Orlova, A. et al (2006).

La especificidad del ataque a tumor usando moléculas Affibody® según la invención se demostró mediante un experimento de bloqueo, donde la pre-inyección a ratones portadores de tumor de un exceso de molécula Affibody® no marcada redujo la captación tumoral de molécula II Affibody® con DOTA marcada con <sup>111</sup>In en un 86%, pero no así la captación en otros órganos (Figura 6). Las imágenes de cámara gamma tomadas 30 minutos y 4 horas p.i. 20 confirmaron un elevada especificidad del ataque a tumor de la molécula II Affibody® con DOTA marcada con <sup>111</sup>In (Figura 7). Los tumores SKOV-3 fueron visualizados y a las 0,5 horas p.i., y a las 4 horas p.i. se había eliminado la radiactividad de fondo. Además del tumor, también se observa una clara captación en los riñones. Los ratones que portan tumor de xenoinjerto A431 negativo en HER2 presentaron una captación despreciable de la radiactividad en el tumor a las 4 h p.i.

25 Ejemplo 3b – Propiedades de unión de HER2 *in vivo* de los polipéptidos según la invención que tienen un quelante N3S

#### Sumario

En los experimentos que constituyen este ejemplo se analizó la unión de los polipéptido radiomarcados según la invención *in vivo* en un modelo de xenoinjerto de ratón. La molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7), que contiene una 30 secuencia mercaptacetil-glutamilo-seril-glutamilo (ma-ESE) N-terminal fue radiomarcada con <sup>99m</sup>Tc e inyectada en ratones portadores de xenoinjertos de tumor SKOV-3 que sobreexpresa HER2. Se realizaron estudios de biodistribución y de obtención de imágenes con cámara gamma para analizar la distribución de la molécula Affibody® radiomarcada en diferentes órganos y la localización en todo el animal.

#### Marcado con <sup>99m</sup>Tc

35 La molécula X Affibody® fue marcada con <sup>99m</sup>Tc usando el método indirecto.

Para el marcado con <sup>99m</sup>Tc, se produjo un kit que contenía los siguientes ingredientes: 50 mg de dihidrato de gluconato, 1 mg de sal disódica de EDTA y 0,5 mg de dihidrato de cloruro de estaño (II) por 1 mL. La disolución se dividió en alícuotas que contienen 1 mL, y las alícuotas fueron secadas por congelación. Los kits de marcado secados por congelación fueron almacenados a -20°C antes de su uso.

40 Se añadieron 50  $\mu$ L de PBS (KCl 2,68 mM, NaCl 137 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,47 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH 7,4) a 50  $\mu$ g de disolución ABY-024 (2 mg/mL en agua desionizada desgasificada). Tras someter a vórtice, la mezcla fue mezclada con un kit de marcado de tecnecio, y se añadieron 200  $\mu$ L de eluato que contiene <sup>99m</sup>TcO<sub>4</sub><sup>-</sup> procedente de un generador de <sup>99m</sup>Tc (generador UltratechneKow FM, Tyco Healthcare Nordic AB, Mallinckrodt, Suecia, AB). La mezcla se incubó a 90°C durante 60 minutos.

45 Se aplicaron dos alícuotas pequeñas (0,8  $\mu$ L) para cada mezcla a dos tiras de ITLC SG, y una fue eluída con PBS (para determinar el rendimiento) y la otra con mezcla de piridina:ácido acético:agua (5:3:1,5) (para determinar la presencia de tecnecio hidrolizado reducido (RHT, del inglés "Reduced Hydrolyzed Technetium"). En este eluyente, los coloides de tecnecio permanecen en el origen, mientras que las moléculas Affibody® radiomarcadas, el pertechnato y otros complejos de <sup>99m</sup>Tc migraron con el frente de disolvente. La distribución de la radiactividad a lo largo de la tira de ITLC fue visualizada y cuantificada usando un PhosphorImager (Cyclone<sup>TM</sup> Storage Phosphor System, Packard). El marcado fue casi cuantitativo, lo que hizo innecesaria cualquier purificación adicional.

50 La molécula Affibody® radiomarcada fue diluida con PBS para asegurar que la concentración de radiactividad es 65 kBq por 100  $\mu$ L. La concentración de moléculas Affibody® se ajustó a 1  $\mu$ g por 100  $\mu$ L.

#### Biodistribución en ratones portadores de tumor

55 Se injertaron  $1 \times 10^7$  células SKOV-3 (adenocarcinoma de ascitis de ovario humano) en ratones BALB/c *nu/nu* hembras criados en la pata trasera derecha.

Para los estudios de biodistribución, los ratones con xenoinjertos tumorales (40-45 días después de la implantación de  $1 \times 10^7$  células) fueron distribuidos aleatoriamente en grupos de cuatro.

5 Se inyectó 1 µg (65 kBq) de molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  en 100 µL de PBS a los ratones en la vena de la cola. Todas las inyecciones fueron bien toleradas. Un grupo de animales fue inyectado s.c. con 100 µL (0,5 mg) de His<sub>6</sub>-Z00342 mediante inyección i.v. con 1 µg (65 kBq) de molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  50 minutos después (experimento de bloqueo).

10 Tras la inyección de una dosis letal de una disolución de Ketalar y Rompun, los ratones fueron sacrificados mediante exsanguinaciones vía punción cardíaca a las 4 horas de la inyección (h p.i.). Los animales del grupo de bloqueo fueron sacrificados 4 horas p.i. Los órganos fueron diseccionados, pesados y se midió su contenido de radiactividad en el contador gamma. Se calculó la captación de radiactividad como el porcentaje de actividad inyectada por gramo de tejido (% Al/g).

#### Obtención de imágenes

15 Para la obtención de imágenes en cámara gamma, se usaron ratones portadores de tumores de xenoinjerto (40 días después de la implantación de  $1 \times 10^7$  células SKOV-3 ó 10-15 días después de la implantación de  $1 \times 10^7$  células A431).

20 Los ratones fueron inyectados en la vena de la cola con 3 µg (15 MBq) de molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  en 100 µL de PBS. 1 ó 4 horas p.i. se practicó la eutanasia a los animales con una dosis letal de una disolución de Ketalar y Rompun. Se llevó a cabo la obtención de imágenes usando una cámara gamma e.Cam Siemens equipada con un colimador LEHR. Los resultados centellográficos fueron evaluados visualmente usando el software Hermes (Nuclear Diagnostics, Estocolmo, Suecia).

#### Resultados

25 Los resultados del estudio de biodistribución usando molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  se muestran en la Figura 8. La captación de radiactividad a 4 h p.i. fue mayor en el tumor que en los demás órganos, aparte del riñón. La captación tumoral fue de  $17 \pm 4$  % Al/g a las 4 horas p.i. También se observó una elevada captación de radiactividad en los riñones, lo cual era de esperar ya que los riñones constituyen el principal mecanismo de excreción para proteínas pequeñas como las moléculas Affibody®. La captación renal fue de  $58 \pm 10$  % Al/g medida a las 4 horas p.i. Por tanto, la captación renal fue considerablemente menor que la captación renal medida para la molécula Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  descrita anteriormente en el Ejemplo 3a y Z00342 con DOTA acoplado al extremo N (Orlova, A. et al (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). Adicionalmente, la baja captación intestinal (3,52 % Al/g) y hepática (1,06 % Al/g) junto con la mayor captación en los riñones demuestran que la molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  se elimina predominantemente a través del mecanismo renal y no del mecanismo hepatobiliar. La solicitud de patente EP 6 123 095 describe que el resto quelante ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 preferido que comprende una o dos Ser, siendo los restantes uno o dos residuos de aminoácido Glu, da como resultado un cambio desde un mecanismo de eliminación hepatobiliar a un mecanismo renal. La molécula X Affibody® contiene tanto uno de los restos quelantes preferidos descritos en el documento EP 6 123 095, es decir ma-Glu-Ser-Glu y todos los cambios de restos quelantes descritos en el Ejemplo 1 (tabla 1) de la presente invención que dan como resultado un aumento de la hidrofobicidad de estos polipéptidos. Por tanto, la molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  descrita aquí representa un ejemplo adicional de un polipéptido que contiene un resto quelante ma-Xaa1-Xaa2-Xaa3 que combina una baja eliminación hepatobiliar y un elevada eliminación renal, pero minimizando la reabsorción en los riñones.

40 La captación de molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  en todos los órganos fue similar a la captación de molécula Affibody® marcada con  $^{111}\text{In}$  descrita en la ejemplo 3a.

45 Las relaciones tumor-a-órgano del experimento de biodistribución descrito anteriormente se muestran en la Figura 9. Nuevamente, se obtuvieron elevadas relaciones tumor-a-órgano. En particular, la relación tumor-a-hígado de la molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  fue comparada con la de molécula II Affibody® con DOTA marcada con  $^{111}\text{In}$  descrita en el ejemplo 3a con una relación de 10 a las 4 horas p.i. La relación tumor-a-sangre fue de 42 a las 4 horas p.i.

50 La especificidad del ataque a tumor usando la molécula X Affibody® fue demostrada mediante un experimento de bloqueo, en el que la pre-inyección en ratones portadores de tumor de un exceso de molécula Affibody® sin marcar redujo la captación tumoral de molécula X Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  en un 90%, pero no así la captación en otros órganos (Figura 8).

55 Las imágenes de cámara gamma tomadas 1 hora y 4 horas p.i. confirmaron una elevada especificidad de ataque a tumor de la molécula Affibody® marcada con  $^{99m}\text{Tc}$  según la invención (Figura 10). Los tumores SKOV-3 fueron visualizados ya a la hora p.i., y a las 4 horas p.i. la radiactividad de fondo había desparecido. Aparte del tumor, también se observa una clara captación en los riñones, sin embargo esta captación fue considerablemente menor en comparación con la captación renal de la molécula II Affibody® con DOTA marcada con  $^{111}\text{In}$  descrita en el ejemplo

3a. Los ratones portadores de xenoinjerto de tumor A431 negativo en HER2 presentaron una captación despreciable de la radiactividad del tumor a las 4 h p.i.

Ejemplo 4 – Estudio comparativo de la síntesis química de un polipéptido según la invención y de Z00342

*Sumario*

5 En los experimentos que constituyen este ejemplo se describe la síntesis de péptidos según la invención en fase sólida. Mutaciones introducidas en cuatro posiciones, a saber [N23T], [A42S], [A46S] y [A54S] permitieron el uso de una estrategia de síntesis alternativa con precursores de pseudoprolina con la abreviatura simplificada Fmoc-Xxx-Yyy-OH. El uso de pseudoprolinas en las cuatro posiciones descritas anteriormente posibilitó la síntesis de la molécula X Affibody® completa (SEQ ID NO: 7) (es decir, los aminoácidos 1-58), mientras que la síntesis estándar no consiguió producir el péptido.

10 La introducción de nuevos residuos de serina o treonina también permite el uso de dipéptidos de isoacilo, que es una alternativa a las pseudoprolinas para aumentar la eficacia sintética reduciendo la agregación durante la síntesis de péptidos (Sohma *et al.*, Tetrahedron Lett. 47: 3013, 2006). Varias unidades básicas de construcción de este tipo se encuentran disponibles en Novabiochem de Merck Biosciences AG.

15 *Razonamiento*

La síntesis de péptidos de la molécula Affibody® Z00342 (descrita en la solicitud de patente WO 2005/003156 como  $Z_{\text{HER2:107}}$ , y algunas veces denominada  $Z_{\text{HER2:342}}$ ), así como el acoplamiento de DOTA al extremo N para esta molécula Affibody® es posible y está descrita en bibliografía (Orlova, A *et al.* (2006), Cancer Research 67: 2178-2186). Sin embargo, se observó una enorme diferencia en el rendimiento de péptido después de la síntesis. Las 20 dificultades para sintetizar de forma reproducible el péptido pueden estar relacionadas tanto con la longitud del péptido como con la secuencia de aminoácidos primaria. Adicionalmente, péptidos largos con grupos reactivos de las cadenas de aminoácidos laterales todavía protegidas pueden generar estructuras secundarias desfavorables, p. ej. láminas beta que pueden alterar la síntesis de péptidos en fase sólida (Quibell, M. & Johnson, T., en Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis – A Practical Approach, W.C. Chan, P.D. White Eds., Oxford University Press 2000, 115-135). Un modo de prevenir la formación de estructuras secundarias durante la síntesis de péptidos es el uso de 25 pseudoprolinas. Las pseudoprolinas con la abreviatura simplificada Fmoc-Xxx-Yyy-OH pueden usarse si el aminoácido Yyy es serina, treonina o cisteína. Estas pseudoprolinas presentan una estructura de tipo prolina cerrada con la cadena lateral unida a la cadena principal, y que se puede ser convertida en la estructura de aminoácidos normal mediante tratamiento ácido (Haack, T. & Mutter, M. Tetrahedron Letters (1992), 33 (12), 1589-92). Las 30 pseudoprolinas se encuentran disponibles comercialmente para 14 aminoácidos en la posición Xxx (excepto Arg, Cys, His, Met, Pro, Thr) junto con serina o treonina en la posición Yyy.

La molécula Affibody® original Z00342 no tiene treonina y cisteína en la estructura primaria. La serina solo se da en la posición 33, 39 y 41. Solo hay disponible un precursor de pseudoprolina para la serina 41 (Q<sup>40</sup>-S<sup>41</sup>). Para las otras dos serinas el aminoácido de la posición Xxx evita el uso de pseudoprolinas ya que no hay precursores disponibles (R<sup>32</sup>-S<sup>33</sup> y P<sup>38</sup>-S<sup>39</sup>).

35 Las mutaciones introducidas en los polipéptidos según la invención están dirigidas, aunque sin restricción, a facilitar la síntesis de péptidos. Especialmente, las mutaciones en las posiciones 23, 42, 46 y 54, es decir [N23T], [A42S], [A46S], [A54S] pueden tener la capacidad para resolver dos de los problemas en SPPS identificados: pueden 40 permitir el uso de pseudoprolinas y la región crítica en torno al aminoácido 21 a 26 es cambiada en la posición 23 mediante la sustitución de asparagina por treonina.

*Síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS)*

45 La secuencia de aminoácidos de la molécula X Affibody® (SEQ ID NO: 7) se construyó sobre una resina de poliestireno Fmoc-Lys(Boc)-Wang en un sintetizador de péptidos completamente automatizado. Dicha resina es altamente adecuada para la formación de péptidos con la estrategia Fmoc. Se acoplaron 57 aminoácidos (con la protección de cadena lateral adecuada) sobre la resina. En la última etapa se llevó a cabo manualmente el 50 acoplamiento de ácido mercaptoacético protegido con S-trítilo.

*Etapa 1: Síntesis de Péptidos en Fase Sólida*

50 La resina de poliestireno Fmoc-Lys(Boc)-Wang fue transferida a un reactor SPPS con un agitador. A continuación se inició la síntesis con desprotección Fmoc de la resina, seguida de un procedimiento de acoplamiento con Fmoc-Pro-OH según la descripción general proporcionada más adelante. Esta etapa se siguió de nuevo de una desprotección Fmoc y un acoplamiento posterior de los derivados de aminoácido de acuerdo a la secuencia. Tras los lavados finales de la resina con isopropil éter (IPE), la resina de péptidos fue secada en un desecador a presión reducida.

Se llevó a cabo una síntesis de péptidos Fmoc estándar y una síntesis usando pseudoprolinas en cuatro posiciones. Para la síntesis estándar solo se usaron aminoácidos Fmoc. Para la síntesis de péptidos alternativa, además de

aminoácidos Fmoc, se usaron las siguientes pseudoprolinas: Fmoc-Leu-Thr-OH en la posición 22-23, Fmoc-Ser-Ser-OH en la posición 41-42, Fmoc-Leu-Ser-OH en la posición 45-46 y Fmoc-Asp-Ser-OH en la posición 53-54.

*Procedimiento de desprotección de Fmoc*

La resina también fue tratada con un 20% de piperidina en NMP a fin de alcanzar la ruptura del grupo protector N- $\alpha$ -Fmoc. A continuación se llevó a cabo el lavado de la resina con NMP.

*Procedimiento de acoplamiento*

Acoplamiento automatizado de los derivados de aminoácido Pro57 a Glu1. Hasta 3 eq del derivado Fmoc-AA fueron disueltos en NMP. Para el acoplamiento, se añadió 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TBTU) en dimetilformamida (DMF) y sym.-colidina (2,4,6-trimetilpiridina) en NMP. La disolución resultante se mezcló a temperatura ambiente antes de ser vertida sobre la resina. Se usó NMP como disolvente. Tras un tiempo de acoplamiento de al menos 15 minutos a 60°C, la resina se lavó con NMP.

Después de cada procedimiento de acoplamiento, tiene lugar automáticamente una repetición del acoplamiento con 2-(1H-7-azabenzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio tetrafluoroborato (TATU) en DMF como reactivo de acoplamiento y con diclorometano como disolvente, seguido de finalización con anhídrido acético.

15 *Etapa 2: Acoplamiento de ácido mercaptoacético*

Las acilaciones se llevaron a cabo con 5 equivalentes molares de aminoácidos, 2-(1H-benzotriazol-1-il)-1,1,3,3-tetrametiluronio hexafluorofosfato (HBTU) y 1-hidroxibenzotriazol (HOEt) y 10 equivalentes de *N*-etildisopropilamina (DIEA, de Lancaster Synthesis, Morecambe, Inglaterra). El ácido S-tritil-mercaptopropanoico procedía de AnaSpec Inc. (San Jose, CA, EE.UU.).

20 *Etapa 3: Separación de la resina, incluyendo la separación de los grupos protectores remanentes*

La resina de péptidos fue tratada con ácido trifluoroacético (TFA) en presencia de agua purificada, etanoditiol (EDT) y triisopropilsilano (TIS). Después de aproximadamente 2 horas de tiempo de separación a temperatura ambiente, la mezcla de reacción se enfrió hasta aproximadamente 0°C, y se añadió yoduro amónico y sulfuro de dimetilo para reducir la metionina oxidada. Tras un periodo de ruptura adicional de 60 minutos, el yodo formado fue reducido con ácido ascórbico. Tras eliminar por filtración el producto, fue precipitado en IPE en frío, separado de nuevo por filtración, lavado con IPE y secado a presión reducida.

*Análisis de pureza mediante HPLC*

30 La pureza de los péptidos de 58 aminoácidos de longitud y algunos intermedios fue determinada mediante HPLC de fase inversa usando una columna Vydac 218 TP54 (5  $\mu$ m, 250 x 4,6 mm) y 0,1% de TFA, 1% de acetonitrilo en H<sub>2</sub>O y 0,1% de TFA en acetonitrilo como disolventes A y B, respectivamente. La temperatura del horno de la columna se fijó en 35°C. La columna fue eluída con un gradiente de 15 a 45 % de disolvente B en 30 minutos o con un gradiente de 20 a 50% de B en 30 minutos. La detección con UV se fijó a 220 nm. La pureza se calculó mediante normalización de área.

*Resultados*

35 El rendimiento y la pureza de la molécula X Affibody<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 7), sintetizada con o sin el uso de pseudoprolinas fueron analizados mediante cromatografía analítica de fase inversa. A fin de seguir el progreso de la síntesis, se tomó una pequeña porción de resina de síntesis tras varias etapas de acoplamiento y se analizó para determinar la presencia, pureza y rendimiento del intermedio peptídico deseado. La Figura 11 muestra el análisis del intermedio peptídico de 41 aminoácidos de longitud (aminoácidos 18-58). En esta etapa de la síntesis de péptidos, se identificó un pico claro y predominante con la secuencia correcta (TR = 15,33 min, rendimiento 49%) si la síntesis se llevaba a cabo usando pseudoprolinas (Figura 11 A). Sin embargo, la síntesis estándar de Fmoc dio como resultado un número enorme de picos de péptidos pequeños y dos picos principales con un tamaño similar, aunque con bajo rendimiento. Uno de estos dos picos (TR = 20,82 min) fue identificado como el intermedio de péptido con la secuencia correcta (aa 18-58) (Figura 11B). El péptido de longitud completa (aminoácidos 1-58) se obtuvo solo si la síntesis se llevaba a cabo usando pseudoprolinas. La Figura 12 A muestra un único pico de producto con un rendimiento del péptido final del 26%. Sin embargo, la síntesis estándar de Fmoc no consiguió producir el producto peptídico final. El análisis del intermedio de 49 aminoácidos de longitud (aminoácidos 10-58) procedente de la síntesis estándar reveló que no podía detectarse el intermedio deseado y se abortó la síntesis (Figura 12 B).

Ejemplo 5 – Estudio comparativo de hidrofilicidad de polipéptido según la invención y de Z00342

*Sumario*

En los experimentos que constituyen este ejemplo, el incremento de hidrofilicidad de los polipéptidos según la invención se describe usando dos métodos: 1) representaciones de hidrofobicidad/hidrofilicidad de proteínas y 2) perfiles de elución de HPLC de fase inversa.

5 *1) Representaciones de hidrofobicidad/hidrofilicidad de proteínas*

Se generan gráficos de hidrofobicidad/hidrofilicidad para representar la distribución de residuos polares y apolares a lo largo de la secuencia de proteínas. Estos gráficos se usan habitualmente para predecir regiones altamente hidrofóbicas, p. ej. partes de extensión de membrana o secuencias hidrofílicas, es decir regiones que probablemente 10 están expuestas sobre la superficie de proteínas.

15 Los gráficos se generan escaneando la secuencia de proteína con una ventana móvil que puede adaptarse para el propósito del análisis. Por ejemplo, se sugiere una ventana móvil de siete aminoácidos como un buen valor para encontrar regiones putativas expuestas en la superficie. En cada posición, se calcula el índice hidrofóbico medio de los aminoácidos dentro de la ventana. Este valor se representa como el punto central de la ventana. Para los gráficos de hidrofobicidad/hidrofilicidad que constituyen este ejemplo se usaron dos escalas de hidrofobicidad: 1) 20 escala Kyte-Doolittle en la que las regiones hidropáticas alcanzan un valor positivo (Kyte J., Doolittle R.F. (1982) J. Mol. Biol. 157: 105-132) y 2) Índices de hidrofobicidad a pH 3,4 determinados mediante HPLC (Cowan R., Whittaker R.G. (1990) Peptide Research 3: 75-80). Los gráficos fueron generados usando el programa BioAnnotator que es un componente de Vector NTI Suite 9.0.0 (Invitrogen).

25 20 Se cambiaron entre diez y doce aminoácidos de la molécula Affibody<sup>®</sup>, es decir los aminoácidos no implicados en la actividad de unión a diana de la molécula (diferentes de uno, Met9), cuando era posible, por aminoácidos más hidrofílicos y/o por aminoácidos que reducen la antigenicidad global, para optimizar la secuencia para la expresión en *E. coli* y para marcar con radionucleídos.

25 En la Figura 13 A y B se muestran dos ejemplos de gráficos de hidrofobicidad/hidrofilicidad para polipéptidos según la invención. Con fines comparativos, el gráfico correspondiente a la molécula Affibody<sup>®</sup> original Z00342 se muestra en la Figura 13 C.

En la secuencia de la molécula II Affibody<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 5) se realizaron los siguientes cambios de aminoácidos:

- Cuatro de estas mutaciones cambiaron aminoácidos hidrofóbicos no polares por aminoácidos polares [F5Y], [A42S], [A46S] y [A54S].
- Dos que cambiaron aminoácidos polares por aminoácidos hidrofóbicos no polares [N3A] y [N6A].
- Una que cambió un aminoácido polar no cargado por un aminoácido polar cargado positivamente [S33K].
- Una que cambió un aminoácido polar por un aminoácido cargado negativamente [N43E].
- Una que cambió un aminoácido polar por un aminoácido menos polar [N23T].
- Una que cambió un aminoácido hidrofóbico por otro aminoácido menos hidrofóbico [V1A].
- Una que cambió un aminoácido cargado negativamente por otro aminoácido cargado negativamente [D2E].

35 Los gráficos correspondientes a la molécula II Affibody<sup>®</sup> de la Figura 13 A muestran un aumento de la hidrofilicidad en la región de las moléculas Affibody<sup>®</sup> que constituye la hélice alfa 2 y 3 y el extremo C (entre los aminoácidos 24 y 58) comparado con la molécula Affibody<sup>®</sup> original Z00342 (Figura 13 C).

40 40 En la secuencia de la molécula X Affibody<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 7) se realizaron los mismos cambios de aminoácidos que para la molécula II Affibody<sup>®</sup>, pero los primeros 3 aminoácidos fueron cambiados por aminoácidos más hidrofílicos:

- Una de estas mutaciones cambió un aminoácido hidrofóbico no polar por un aminoácido cargado negativamente [V1E].
- Una que cambió un aminoácido cargado negativamente por un aminoácido polar [D2S].
- Una que cambió un aminoácido polar no cargado por un aminoácido polar cargado negativamente [N3E].

45 45 Los gráficos correspondientes a la molécula X Affibody<sup>®</sup> (SEQ ID NO: 7) de la Figura 13 B muestran el mismo aumento de hidrofilicidad de la región de hélice alfa 2 y 3 (entre los aminoácidos 24 y 58) e incluso un extremo N más hidrofílico en comparación con la molécula Affibody<sup>®</sup> original Z00342 (Figura 13 C).

## 2) Perfiles de elución de HPLC de fase inversa

Las proteínas se pueden separar de forma eficaz mediante cromatografía de fase inversa (RP, del inglés "reversed phase"). Las diferencias de hidrofilicidad/hidrofobicidad de una proteína pueden analizarse con columnas RP, p. ej. columnas C8 ó C18 en las que las proteínas más hidrofílicas eluyen primero, es decir a menores concentraciones de

5 eluyente acetonitrilo, que las proteínas hidrofóbicas. Se usaron las siguientes condiciones para comparar la elución de la molécula II Affibody® (SEQ ID NO: 5) y la molécula Affibody® original Z00342: instrumento de HPLC: Agilent 1100 (Agilent); Columna: Zorbax 300SB C8 150 x 2,1 mm, 3,5 µm (Agilent); Temperatura: 30°C; Carga: 20 µL de disolución de proteína con 2,2 mg/mL; Caudal: 0,5 mL/min; Disolvente A: 0,5% de ácido trifluoroacético (TFA) en agua; Disolvente B: 90% de acetonitrilo, 0,5% de TFA en agua; Gradiente: 0-2 min 10% de B, 2-17 min 10-70% de B, 17-18 min 70-100% de B, 18-21 min 100% de B, 21-22 min 100-10% de B, 22-25 min 10% de B. Los resultados de los análisis se muestran en la Figura 14. El cambio del tiempo de retención ilustra el aumento de hidrofilicidad de la molécula II Affibody® en comparación con la molécula Affibody® original Z00342. Esta molécula Affibody® con todas las mutaciones descritas anteriormente eluye con un tiempo de retención de 9,614 min comparado con 9,860 min para la molécula Affibody® original Z00342.

10 15 Ejemplo 6 – Estudio comparativo de antigenicidad (unión de IgG) de polipéptido según la invención y de Z00342

## Sumario

Una propiedad deseable de los polipéptidos específicos de HER2 descritos en esta invención es que presenten un perfil de antigenicidad bajo, lo que significa que muestran un bajo potencial de interacción con inmunoglobulinas (Ig).

20 En este ejemplo, se describe un método para medir antigenicidad (unión de IgG) *in vitro*, y se comparan moléculas Affibody® I, II, II con DOTA conjugadas a la cisteína C-terminal y XI con DOTA conjugadas en una cisteína interna (posición 42) con la molécula Affibody® Z00342 estándar específica de HER2 con el objetivo de evaluar la influencia de las alteraciones de aminoácidos realizadas. El ensayo usado se denomina ELISA de antigenicidad *in vitro* (IVA, del inglés "in vitro antigenicity").

ELISA de antigenicidad *in vitro* (IVA)

25 En el ELISA IVA, se recubrió una placa de 96 pocillos con 2 µg/mL de la molécula Affibody® Z00342 específica de HER2, que fue seleccionada como reactivo estándar de recubrimiento. Adicionalmente, la placa se recubrió con 2 µg/mL de las moléculas Affibody® específicas de HER2 I, II, II con DOTA y XI con DOTA. Se añadieron 50 µL de disolución de recubrimiento por pocillo y la placa de media área se incubó a +4°C durante una noche. La placa ELISA se lavó dos veces con agua de grifo y se añadieron a cada pocillo 100 µL de disolución de bloqueo (disolución salina tamponada de fosfato (PBS), pH 7,4 con un 0,5% de caseína). La placa fue incubada posteriormente durante 1 hora a temperatura ambiente (RT, del inglés "room temperature"), se vació, seguido de la adición de 50 µL/pocillo de un conjunto de suero de primate en series de dilución 2 a 1 comenzando desde 1 en una dilución de 100. La placa se incubó durante 1 hora a RT y a continuación se lavó cinco veces con PBS + 0,05% de Tween (PBS-T). Para la detección, se usó un anticuerpo Ig-HRP de cabra anti-humano 1/5000 (Southern Biotechnology). La placa se incubó durante 50 min a RT seguido de una etapa de lavado por quintuplicado usando PBS-T. Para el desarrollo del color, se añadieron 50 µL de sustrato TMB ImmunoPure (Pierce) y la placa se incubó a oscuras a RT durante 12 min. La reacción de color se detuvo añadiendo disolución de parada (H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M) y la absorbancia se midió a 450 nm.

## Cálculo de valores IVA

40 El ELISA IVA se llevó a cabo posteriormente como se ha descrito anteriormente. Las curvas de valoración resultantes fueron representadas en un gráfico usando una regresión XY no lineal para obtener un valor de dilución a DO 0,3. El valor de dilución estándar a DO 0,3 se fijó en 100 y se calculó el valor IVA de cada muestra relacionándolo con el del estándar. Por consiguiente, un valor IVA por debajo de 100 refleja un menor grado de unión a Ig de primate de ese polipéptido particular específico de HER2 en comparación con el estándar Z00342. Se evaluaron cuatro polipéptidos específicos de HER2 diferentes para determinar la antigenicidad *in vitro*, es decir las moléculas Affibody® I, II, II con DOTA y XI con DOTA. Se demostró que estos polipéptidos tienen un bajo perfil de antigenicidad *in vitro* en comparación con la proteína estándar. La conclusión es que las alteraciones de aminoácidos que se realizaron dieron como resultado un descenso del potencial para interaccionar con inmunoglobulinas.

45 50 Tabla 3. Valores IVA de diferentes polipéptidos específicos de HER2 relacionados con la Z00342 estándar.

Molécula Affibody®	Valor IVA
Estándar Z00342	100
I	13
II	4
II con DOTA	6
XI con DOTA	1

## LISTADO DE SECUENCIAS

<110> AFFIBODY AB  
 <120> NUEVOS POLIPÉPTIDOS  
 <130> 21039125  
 5 <150> EP07150395  
 <151> 2007-12-21  
 <160> 7  
 <170> PatentIn versión 3.5  
 <210> 1  
 10 <211> 48  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 <223> nuevo polipéptido de unión a HER-2  
 15 <220>  
 <221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA  
 <222> (2) . . (2)  
 <223> X en la posición 2 es M, I ó L  
 <220>  
 20 <221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA  
 <222> (39) . . (39)  
 <223> X en la posición 39 es S ó C  
 <400> 1  
 Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr  
 1 5 10 15  
 Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser  
 20 25 30  
 Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln  
 35 40 45  
 25 <210> 2  
 <211> 51  
 <212> PRT  
 <213> artificial  
 <220>  
 30 <223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (5) . . (5)

<223> X en la posición 5 es M, I ó L

5 <220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (42) . . (42)

<223> X en la posición 42 es S ó C

<400> 2

Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile Ala Leu Leu Pro  
1 5 10 15

Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg Lys Leu Tyr Asp  
20 25 30

Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala Lys Lys Leu Asn  
35 40 45

10 Asp Ser Gln  
50

<210> 3

<211> 55

<212> PRT

<213> artificial

15 <220>

<223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (9) . . (9)

20 <223> X en la posición 9 es M, I ó L

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (46) . . (46)

<223> X en la posición 46 es S ó C

25 <400> 3

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln  
 50 55

<210> 4

<211> 55

<212> PRT

5 <213> artificial

<220>

<223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

10 <222> (9) . . (9)

<223> X en la posición 9 es M, I ó L

<220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (46) . . (46)

15 <223> X en la posición 46 es S ó C

<400> 4

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Xaa Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Xaa Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln  
 50 55

<210> 5

<211> 61

20 <212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

<400> 5

Ala Glu Ala Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys  
 50 55 60

5

<210> 6

<211> 58

<212> PRT

<213> artificial

10 <220>

<223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

<400> 6

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
 1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
 20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala  
 35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
 50 55

<210> 7

15 <211> 58

<212> PRT

<213> artificial

<220>

<223> nuevo polipéptido de unión a HER-2

20 <220>

<221> CARACTERÍSTICA\_MISCELÁNEA

<222> (1) .. (1)

<223> La secuencia comprende un grupo mercaptoacetilo (ma) acoplado al extremo N

<400> 7

Glu Ser Glu Lys Tyr Ala Lys Glu Met Arg Asn Ala Tyr Trp Glu Ile  
1 5 10 15

Ala Leu Leu Pro Asn Leu Thr Asn Gln Gln Lys Arg Ala Phe Ile Arg  
20 25 30

Lys Leu Tyr Asp Asp Pro Ser Gln Ser Ser Glu Leu Leu Ser Glu Ala  
35 40 45

Lys Lys Leu Asn Asp Ser Gln Ala Pro Lys  
50 55

5

## REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido de unión a HER2 que comprende la secuencia de aminoácidos EX<sub>1</sub>RNAYWEIA LLPNLTNQQK RAFIRKLYDD PSQSSELLX<sub>2</sub>E AKKLNDSQ en la que X<sub>1</sub> de la posición 2 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> de la posición 39 es S ó C (SEQ ID NO: 1).
- 5    2. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 1, que comprende la secuencia de aminoácido YAKEX<sub>1</sub>RNAYW EIALLPNLTN QQKRAFIRKL YDDPSQSSEL LX<sub>2</sub>EAKKLND SQ en la que X<sub>1</sub> de la posición 5 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> de la posición 42 es S ó C (SEQ ID NO: 2).
3. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 1 ó 2, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre
- 10    AEAKYAKEX<sub>1</sub>R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLX<sub>2</sub>EAKK LNDSQ (SEQ ID NO: 3), y ESEKYAKEX<sub>1</sub>R NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLX<sub>2</sub>EAKK LNDSQ (SEQ ID NO: 4); en la que X<sub>1</sub> de la posición 9 es M, I ó L, y X<sub>2</sub> de la posición 46 es S ó C.
4. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 3, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada entre
- 15    AEAKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPKVD C (SEQ ID NO: 5), y ESEKYAKEMR NAYWEIALLP NLTNQQKRAF IRKLYDDPSQ SSELLSEAKK LNDSQAPK (SEQ ID NO: 6).
5. Un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, que además comprende un mercaptoacetilo acoplado a su extremo N-terminal, donde un entorno quelante constituido por una estructura quelante N<sub>3</sub>S es proporcionado por los átomos de nitrógeno de los tres primeros enlaces peptídicos consecutivos desde el extremo N, junto con el grupo SH del mercaptoacetilo.
- 20    6. Un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 que comprende un residuo de cisteína ya presente en la secuencia o en forma de un residuo de aminoácido adicional o reemplazando un residuo de aminoácido expuesto superficialmente que no esté implicado en la unión a HER2.
7. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 6, en el que el residuo de cisteína es uno situado en el extremo C-terminal de la SEQ ID NO: 5 o la cisteína adicional se sitúa en el extremo C de cualquiera de las SEQ ID NO: 1-4 ó 6-7, donde el residuo de cisteína opcionalmente va seguido de uno o más residuo(s) de aminoácidos adicional(es), y donde un entorno quelante constituido por una estructura quelante N<sub>3</sub>S es proporcionado por los átomos de nitrógeno de tres enlaces peptídicos consecutivos de la tira de residuos de aminoácido constituida por la cisteína y los dos residuos de aminoácido precedentes, junto con el grupo SH del residuo de cisteína.
- 25    8. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 6, que comprende un entorno quelante proporcionado por un quelante de poliaminopolícarboxilato acoplado al polipéptido a través de un grupo tiol.
9. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 8, donde el quelante de poliaminopolícarboxilato se selecciona entre ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-1,4,7,10-tetraacético o sus derivados, y ácido dietilentriaminopentaacético o sus derivados.
- 30    10. Un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 9, donde la secuencia de aminoácidos es como se establece en la SEQ ID NO: 5.
11. Un polipéptido radiomarcado que consiste en un radioquelato de un polipéptido de unión a HER2 y un radionucleido, siendo seleccionado dicho radioquelato del grupo que consiste
- 35    un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 5 y 7 con un radionucleido adecuado para la obtención de imágenes médicas, que es <sup>99m</sup>Tc, o con un radionucleido adecuado para terapia, siendo seleccionado del grupo que consiste en <sup>186</sup>Re y <sup>188</sup>Re;
- 40    un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 8-10 con un radionucleido adecuado para la obtención de imágenes médicas, siendo seleccionado del grupo que consiste en <sup>61</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>110m</sup>In, <sup>111</sup>In, <sup>44</sup>Sc y <sup>86</sup>Y, o con un radionucleido adecuado para terapia, siendo seleccionado del grupo que consiste en <sup>225</sup>Ac, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>67</sup>Cu, <sup>166</sup>Ho, <sup>177</sup>Lu, <sup>212</sup>Pb, <sup>149</sup>Pm, <sup>153</sup>Sm, <sup>227</sup>Th y <sup>90</sup>Y, donde el radionucleido forma un complejo con el polipéptido de unión a HER2 mediante un entorno quelante, y

un polipéptido de unión a HER2 según la reivindicación 6 ligado mediante una molécula ligando a un radionucleido adecuado para la obtención de imágenes médicas y/o para terapia, seleccionado del grupo que consiste en  $^{211}\text{At}$ ,  $^{76}\text{Br}$ ,  $^{18}\text{F}$  e isótopos de yodo.

- 5    **12.** Un polipéptido radiomarcado según la reivindicación 11, que comprende la secuencia de aminoácidos fijada en la SEQ ID NO: 5 ligada a través de una molécula ligando a  $^{18}\text{F}$ .
13. Un polipéptido radiomarcado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde el radionucleido es adecuado para la obtención de imágenes, para uso en diagnosis.
14. Un polipéptido radiomarcado para uso según la reivindicación 13, donde dicha diagnosis comprende las etapas de:
- 10    - administrar un polipéptido radiomarcado según una cualquiera de las reivindicaciones 11-12, donde el radionucleido es adecuado para obtener imágenes, en el interior del cuerpo del sujeto mamífero; y
- obtener una o más imágenes, dentro de las 1-72 horas de administración del polipéptido radiomarcado, de al menos una parte del cuerpo del sujeto usando un instrumento de obtención de imágenes médicas, indicando dicha(s) imagen(es) la presencia del radionucleido en el interior del cuerpo.
- 15    **15.** Un polipéptido radiomarcado según la reivindicación 11, donde el radionucleido es adecuado para terapia, para uso en terapia.
16. Un polipéptido de fusión que comprende al menos un primer resto que consiste en un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y al menos un resto adicional que consiste en un dominio de unión a albúmina de proteína G de estreptococo.
- 20    **17.** Un polipéptido de fusión que comprende al menos un primer resto que consiste en un polipéptido de unión a HER2 según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, y al menos un resto para aplicaciones terapéuticas.
18. Un ácido nucleico que codifica el polipéptido según una cualquiera de las reivindicaciones 1-4 ó 6.

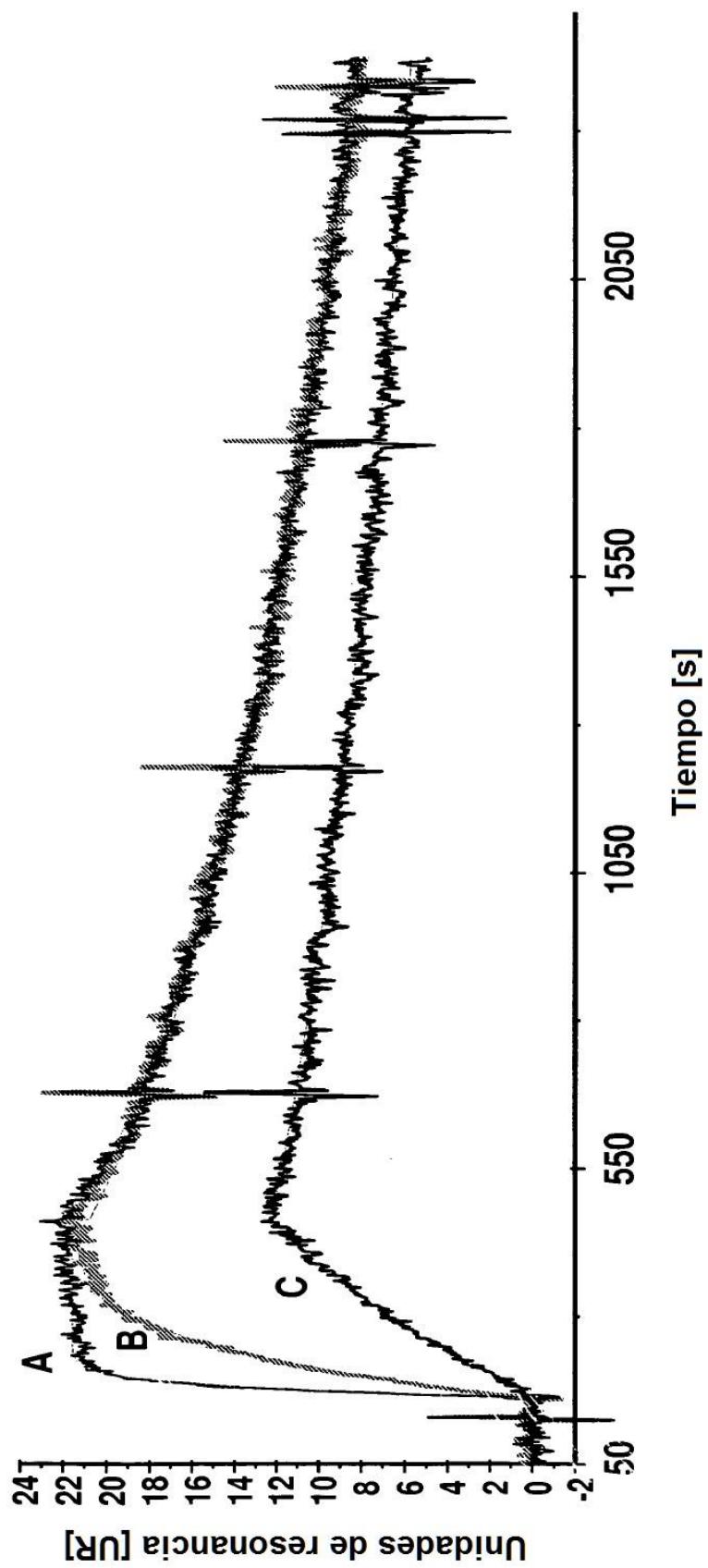


Fig. 1

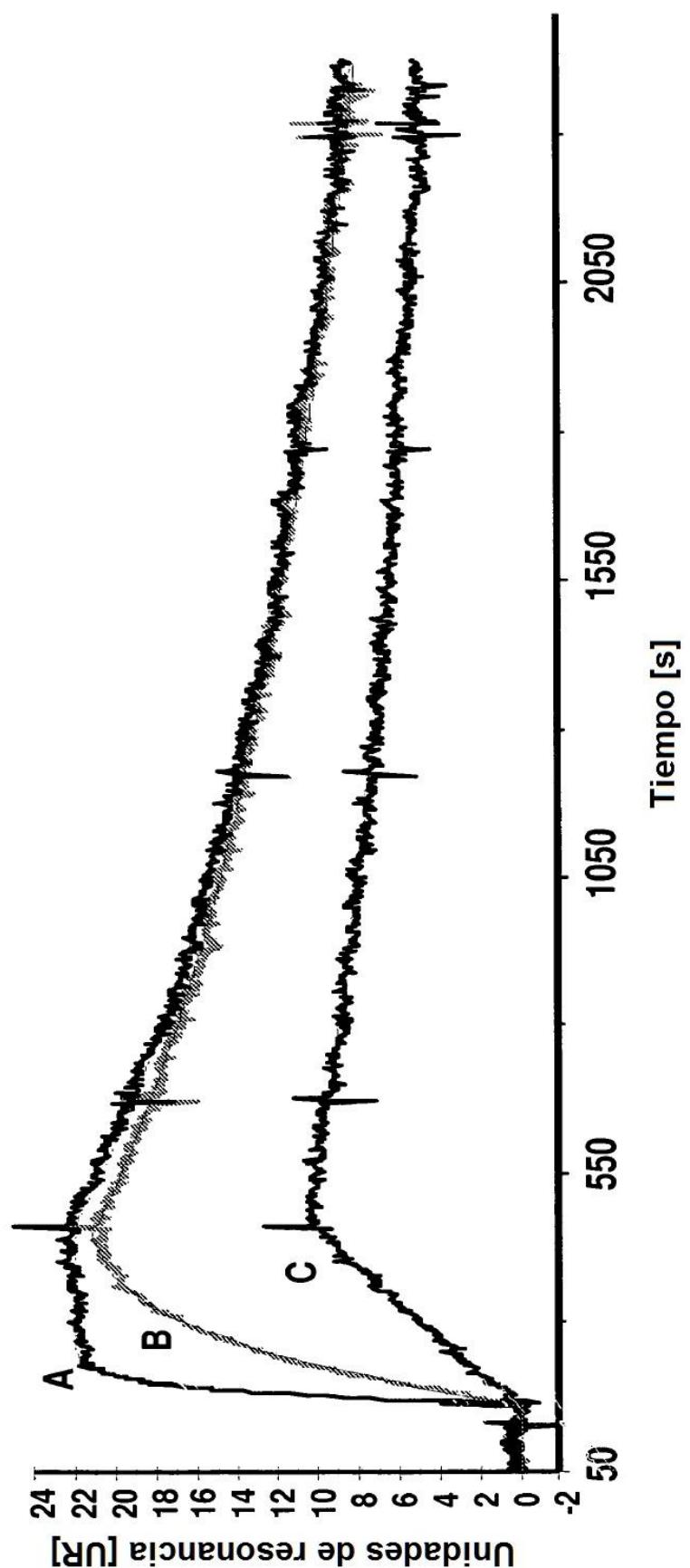


Fig. 2

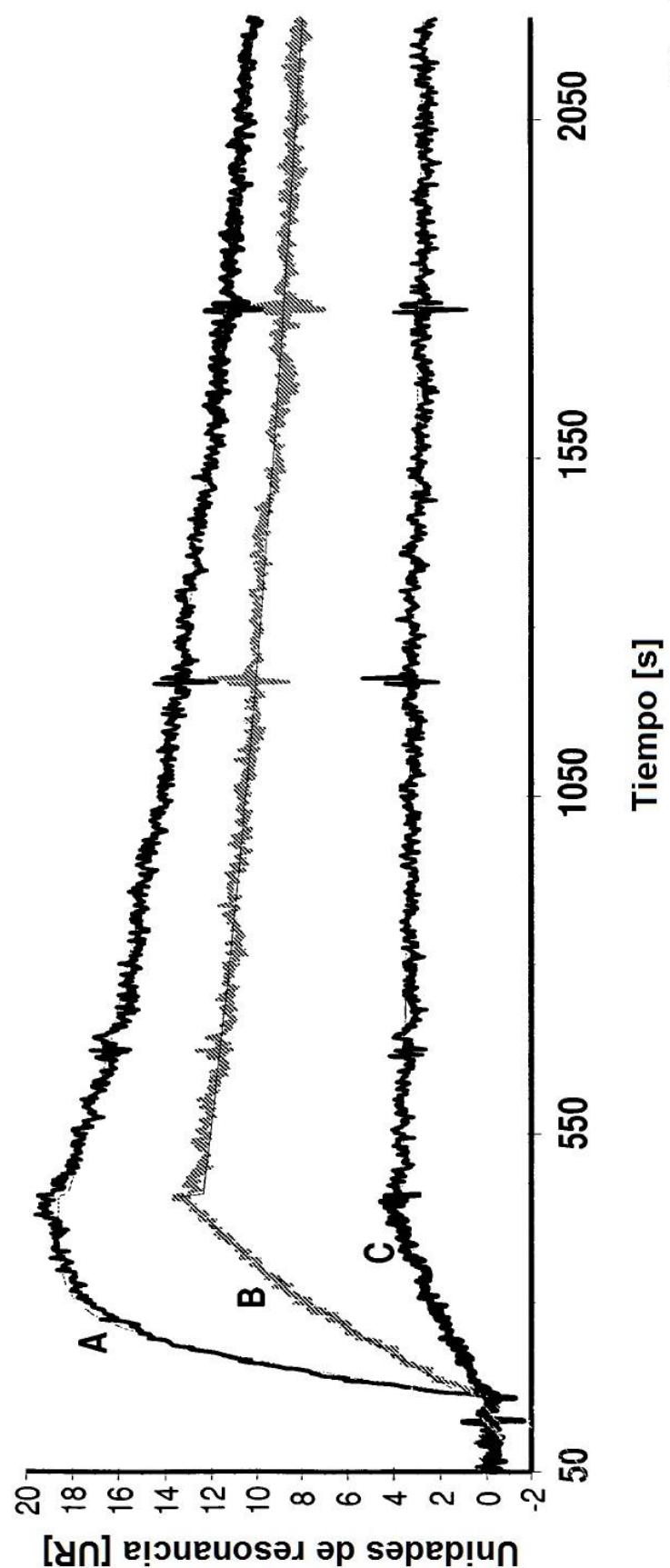


Fig. 3

Fig. 4

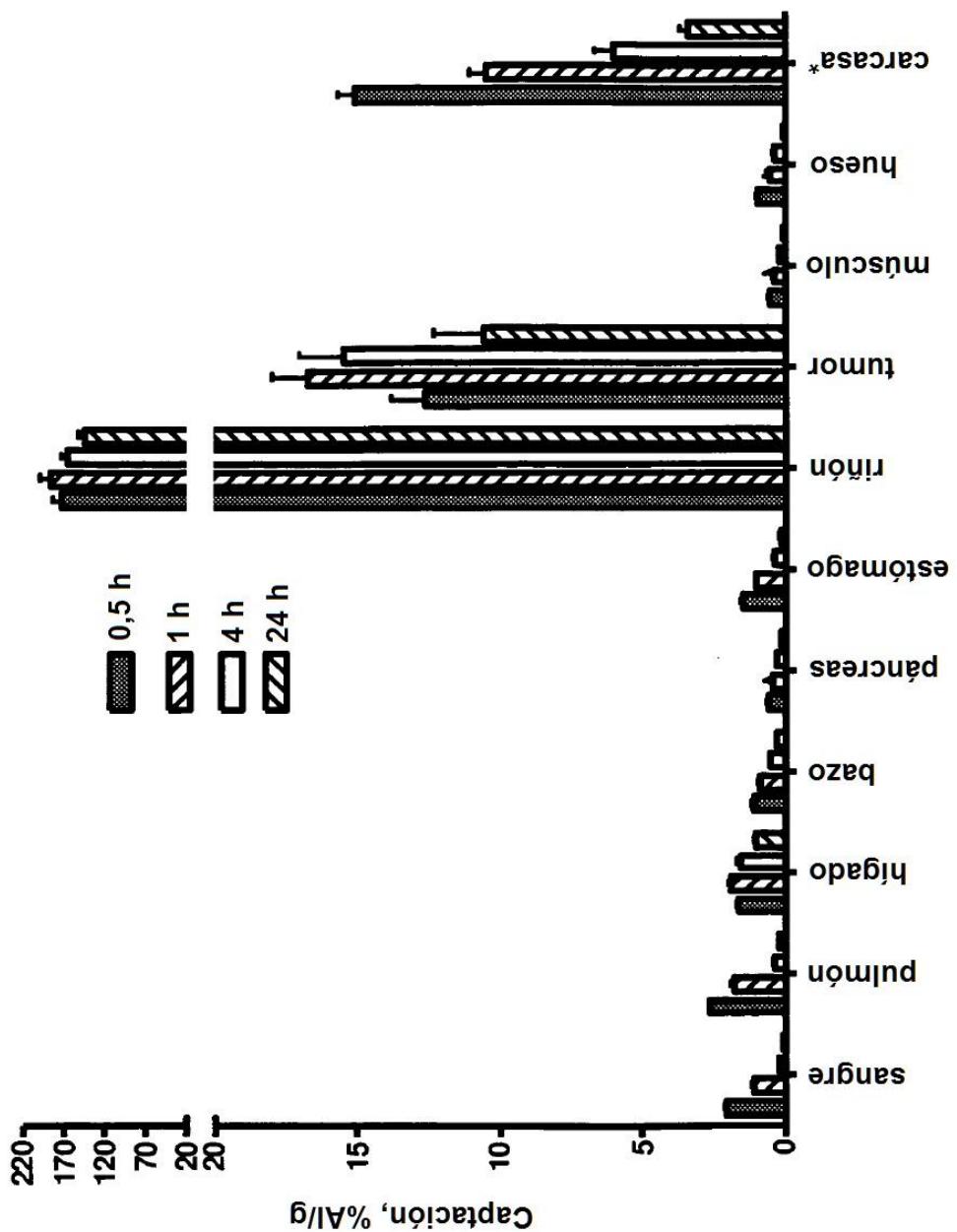


Fig. 5

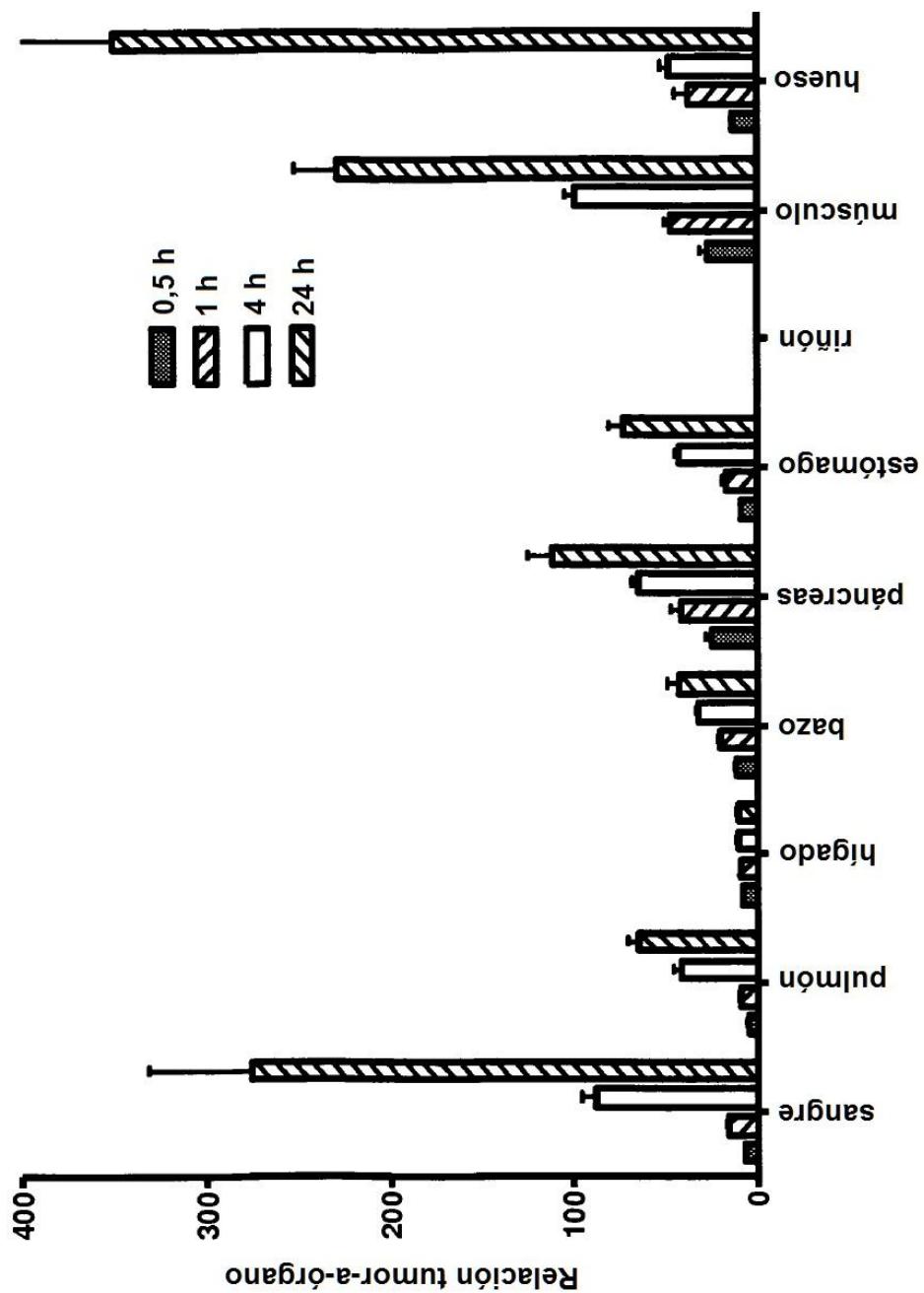
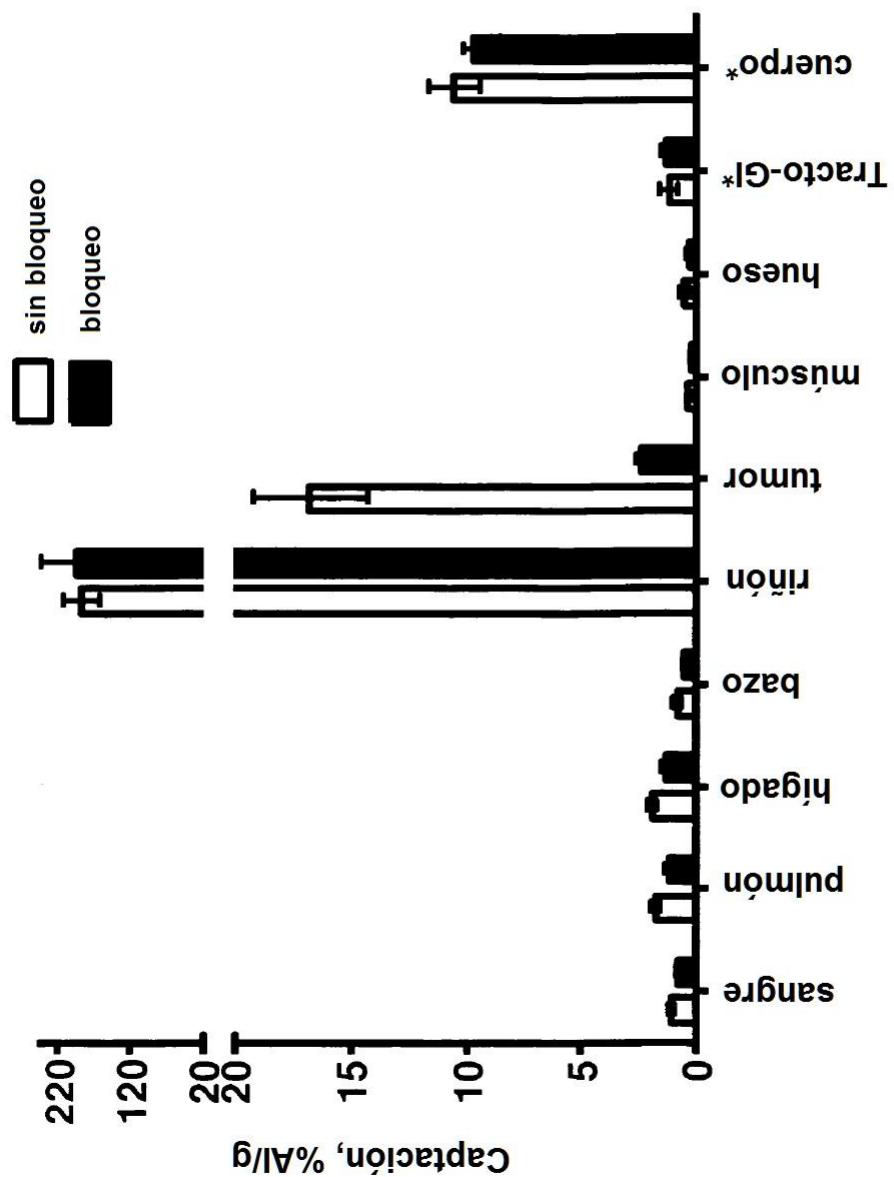


Fig. 6



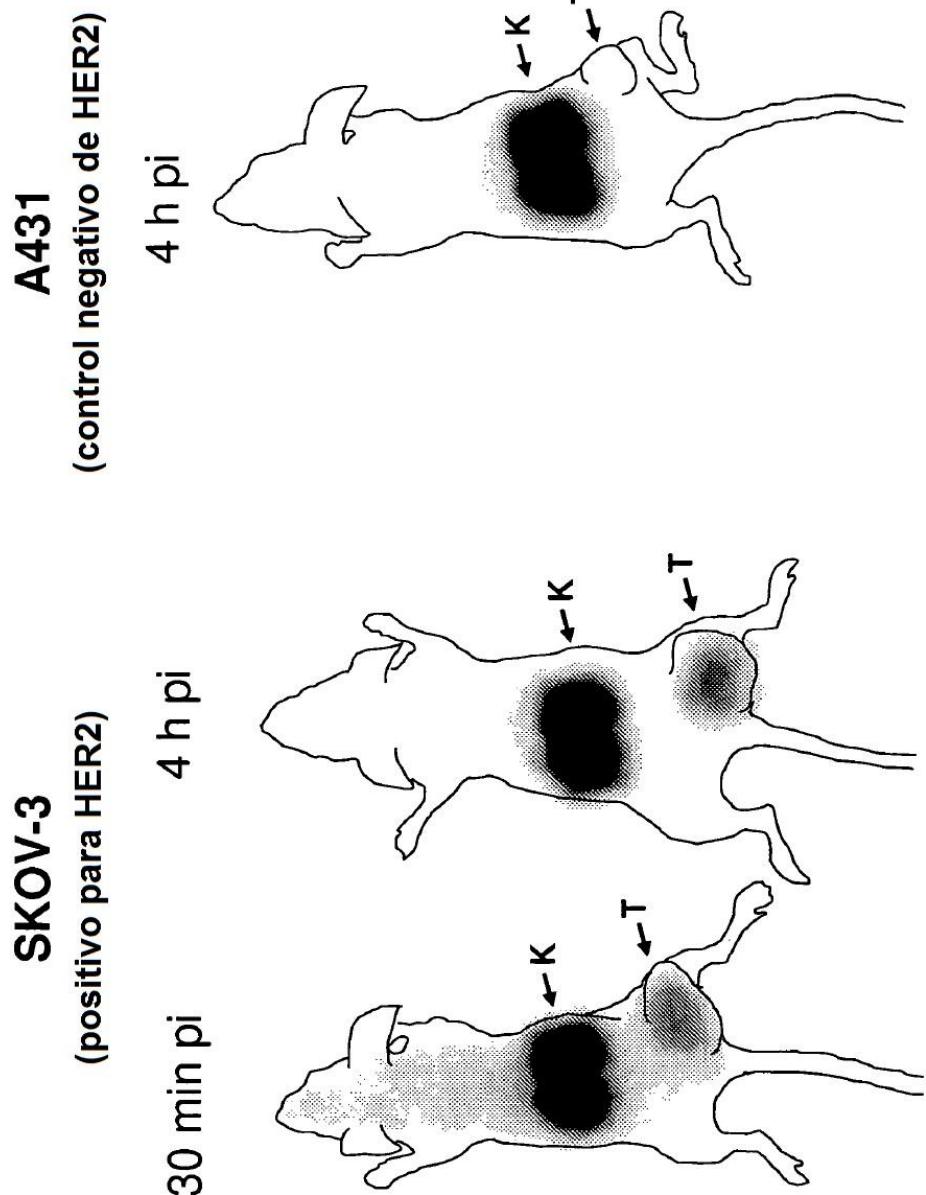


Fig. 7

Fig. 8

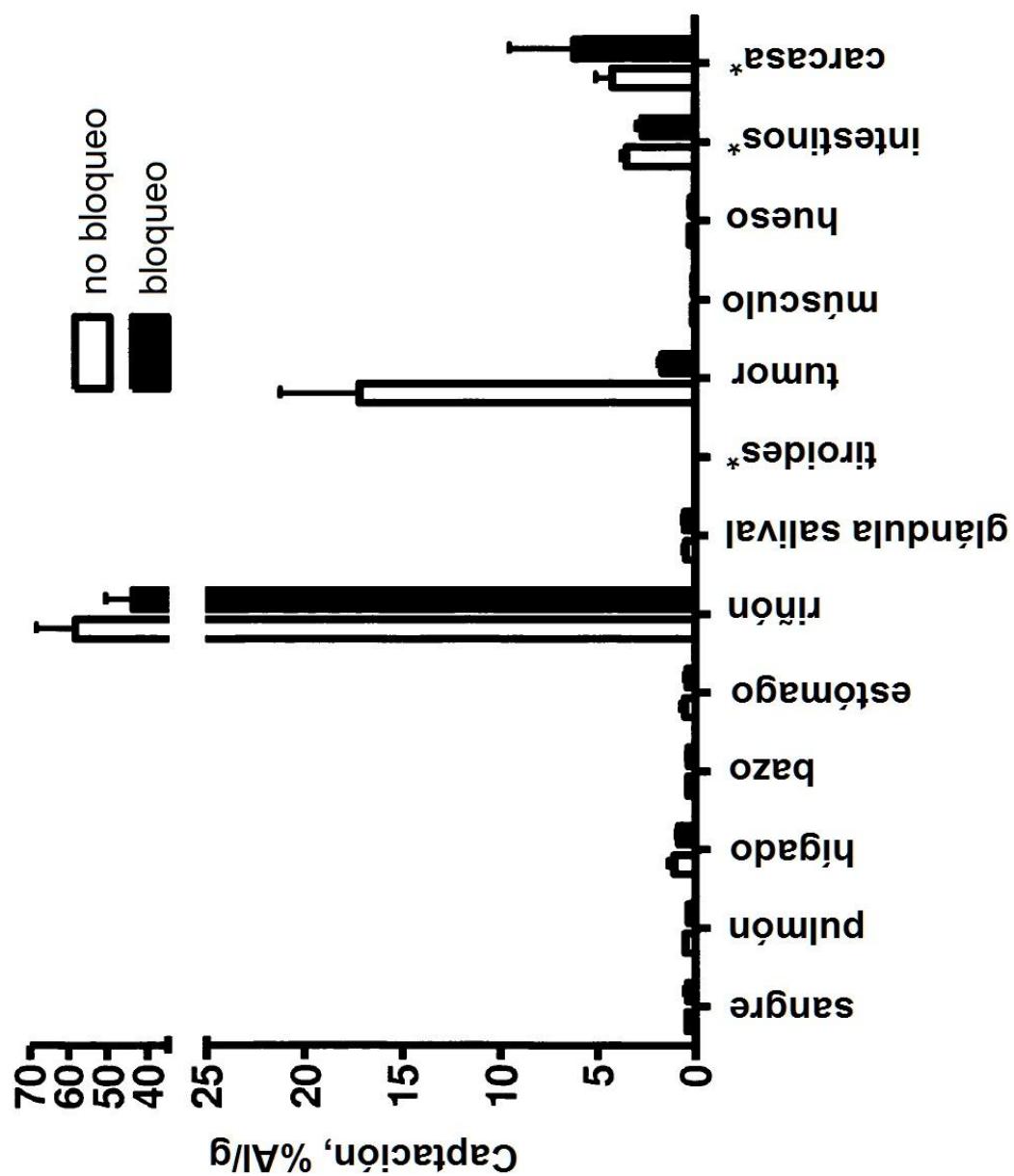


Fig. 9

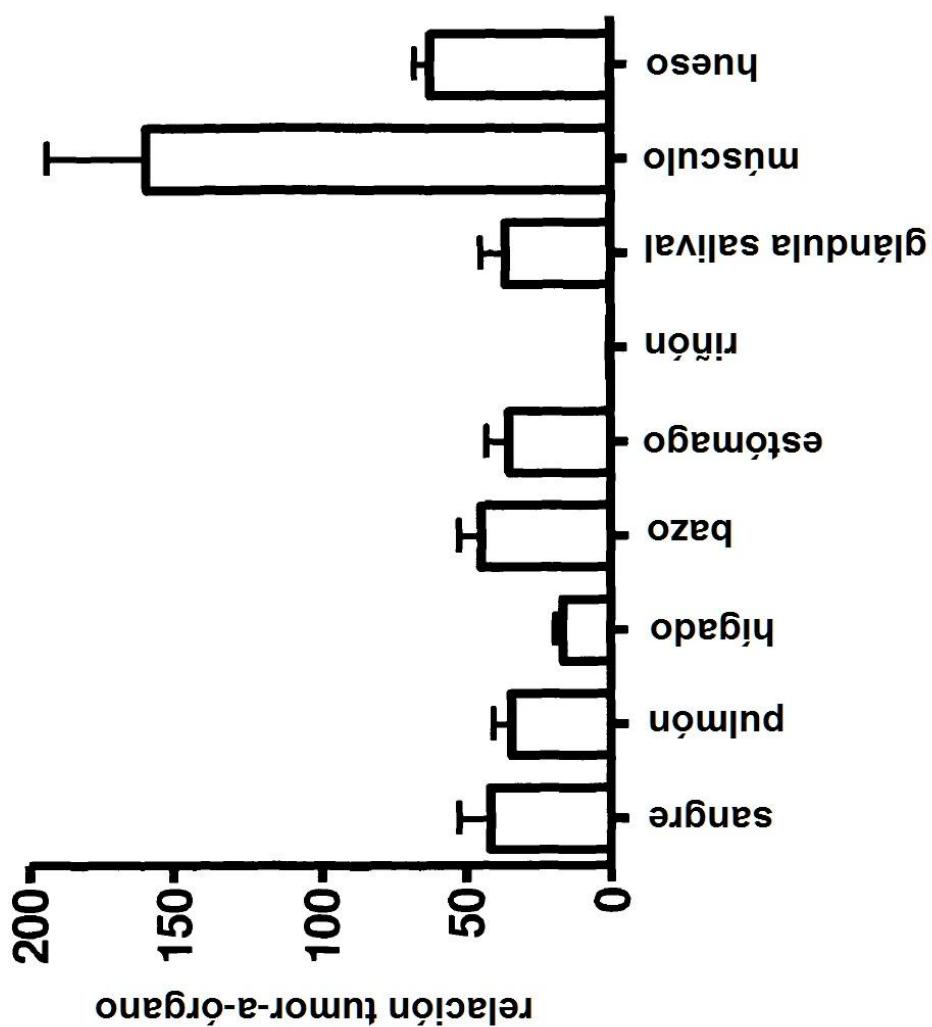
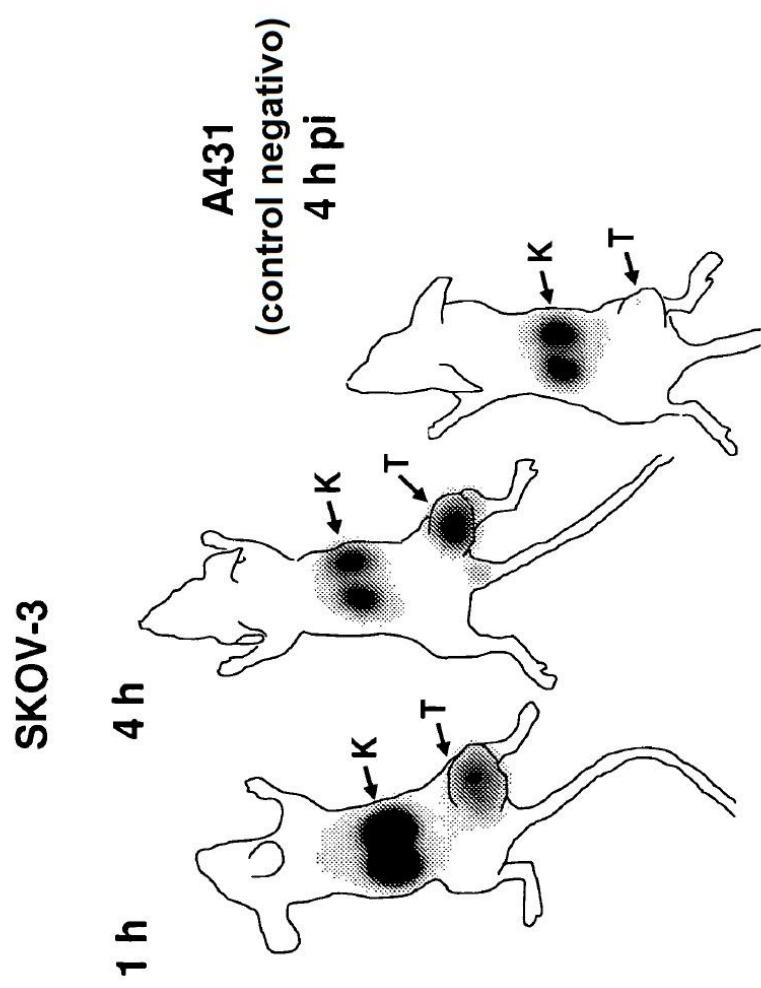


Fig. 10



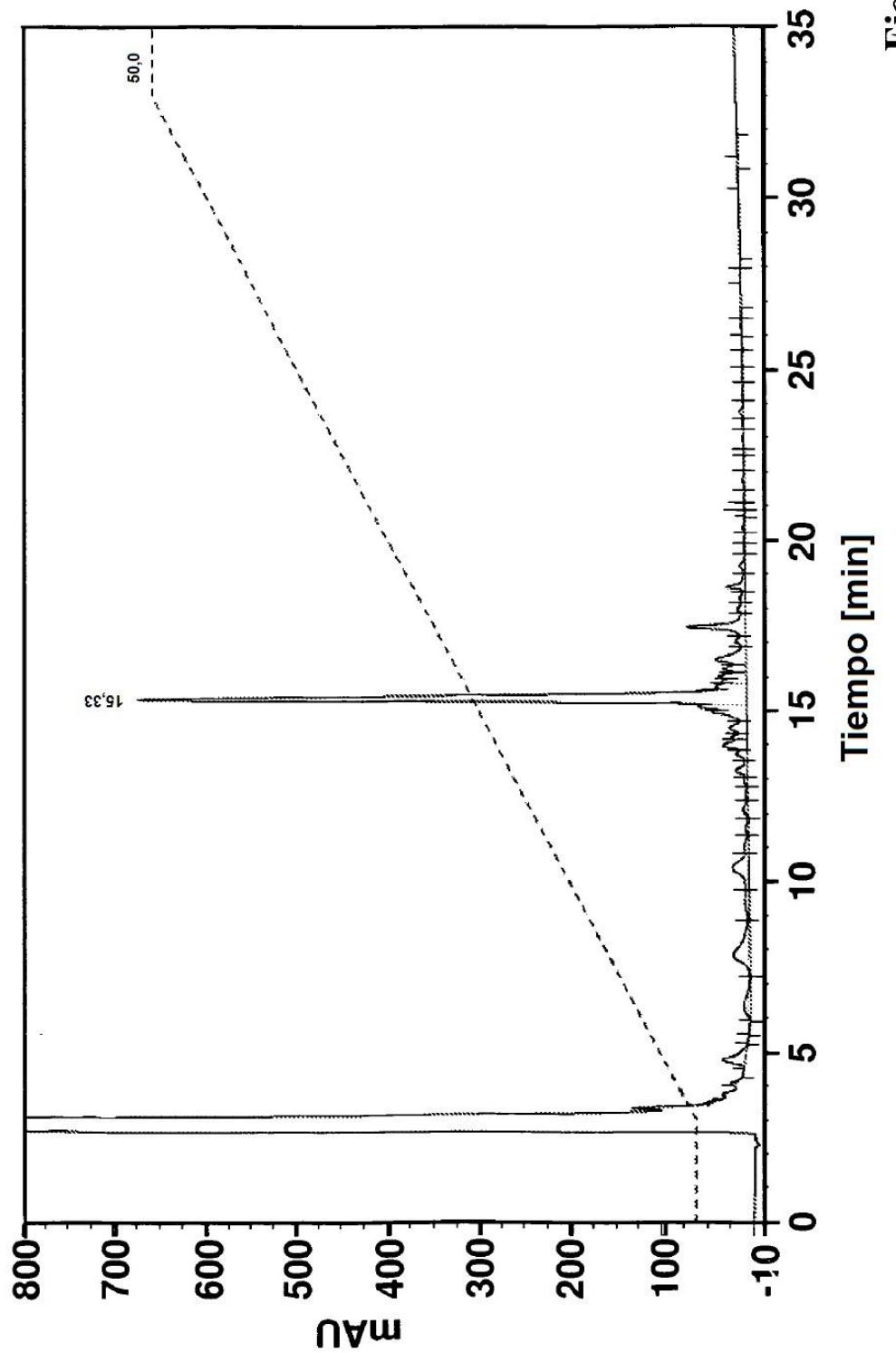


Fig. 11 A

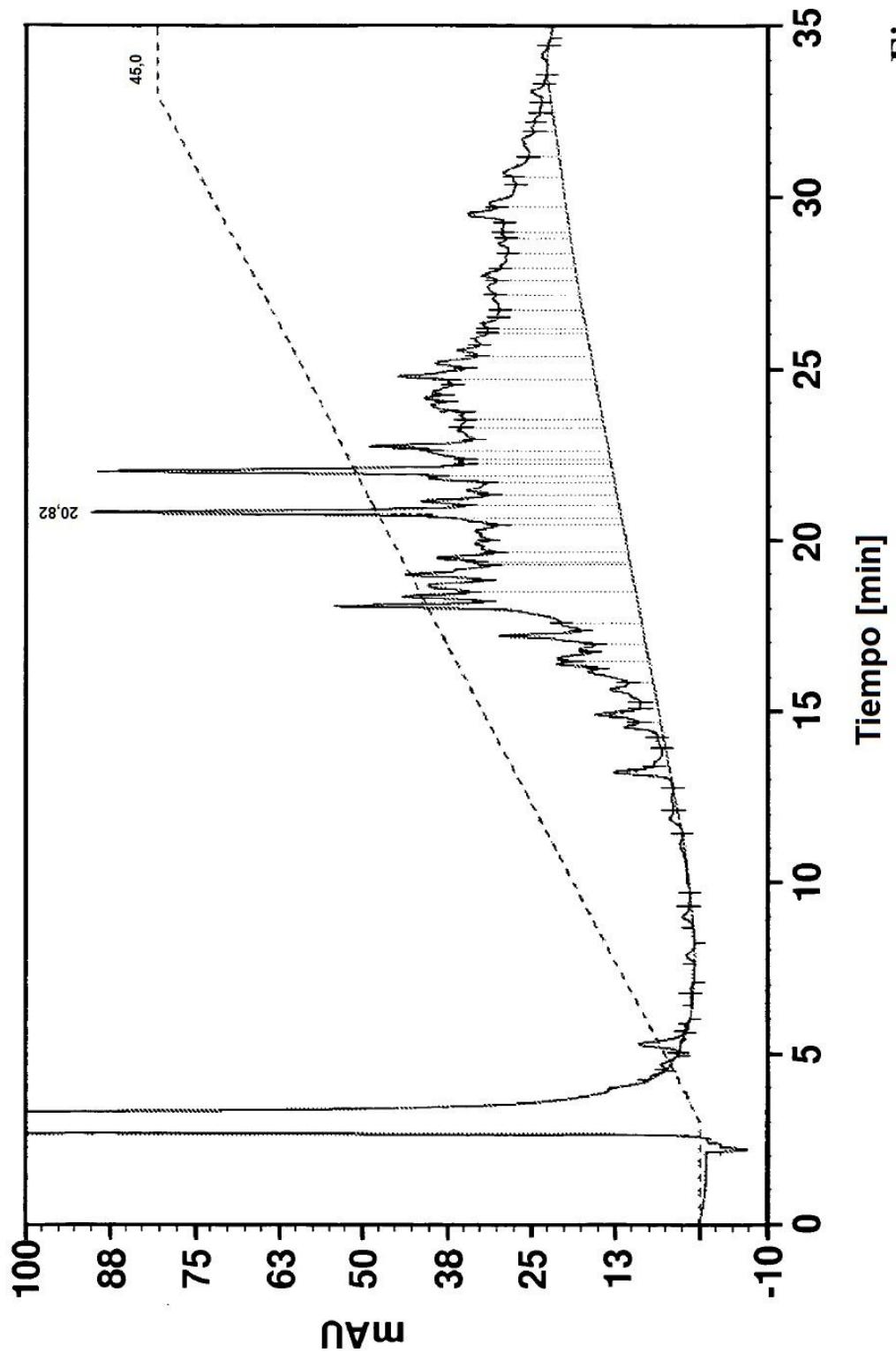


Fig. 11 B

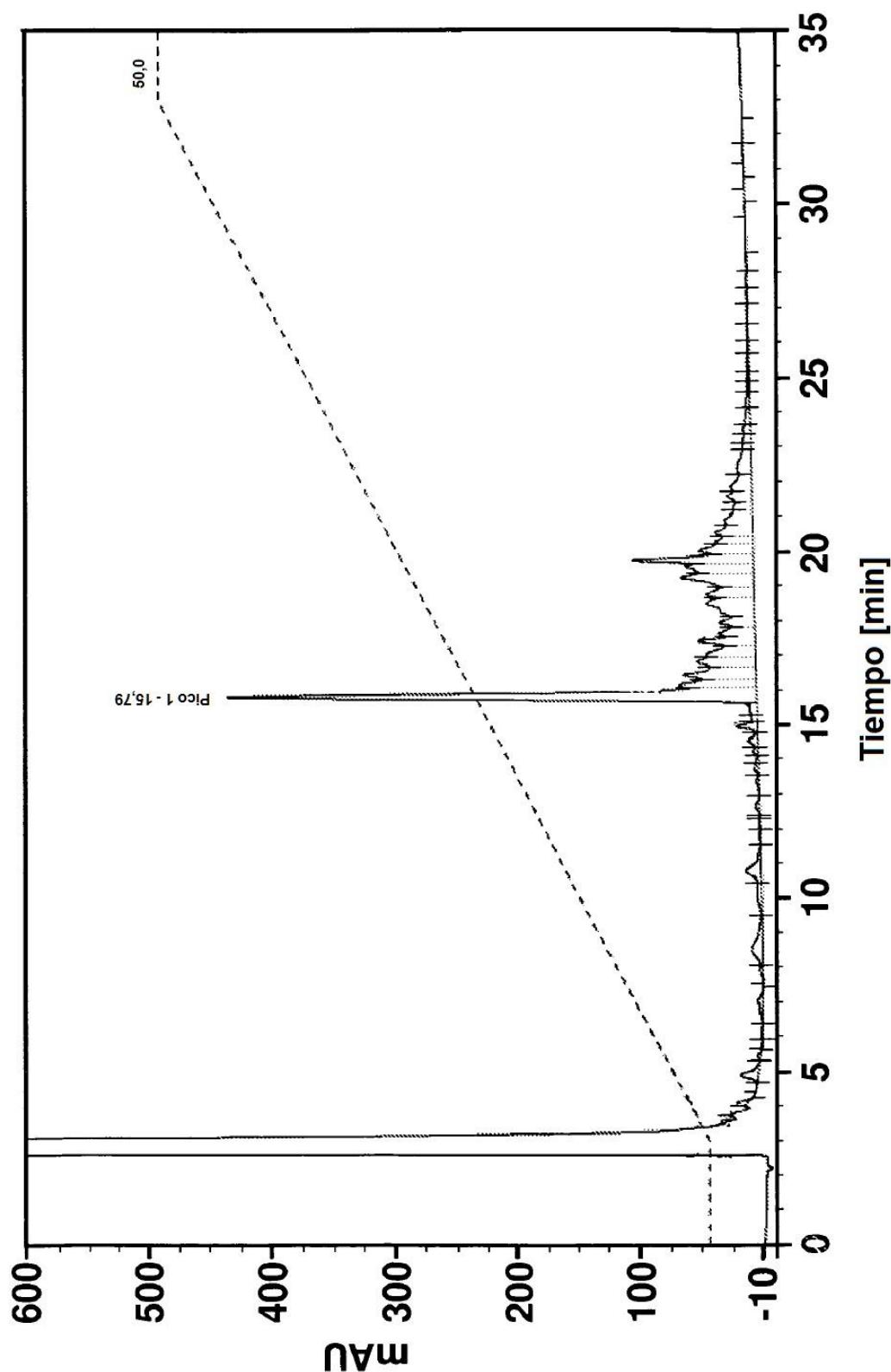


Fig. 12 A

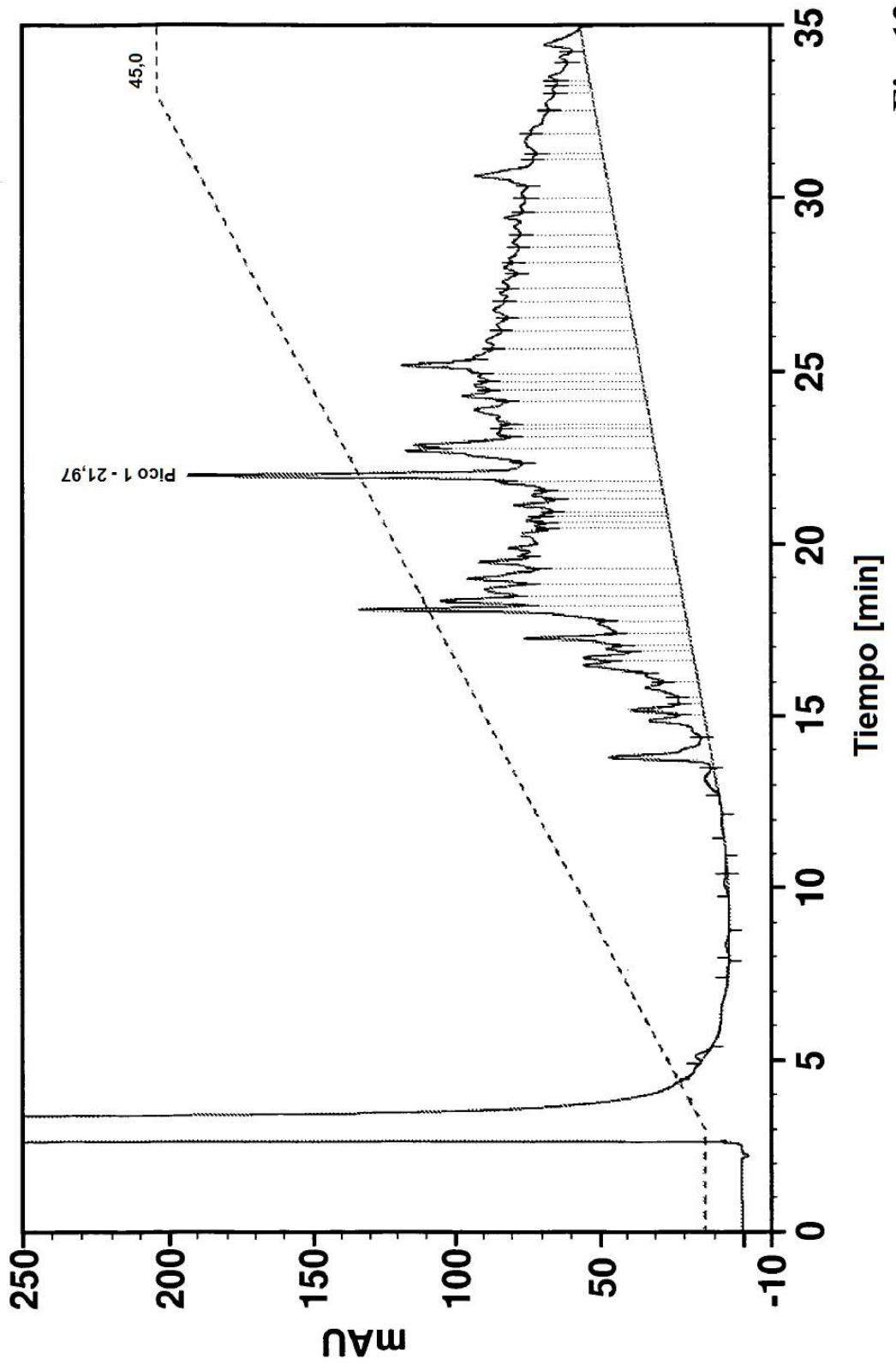
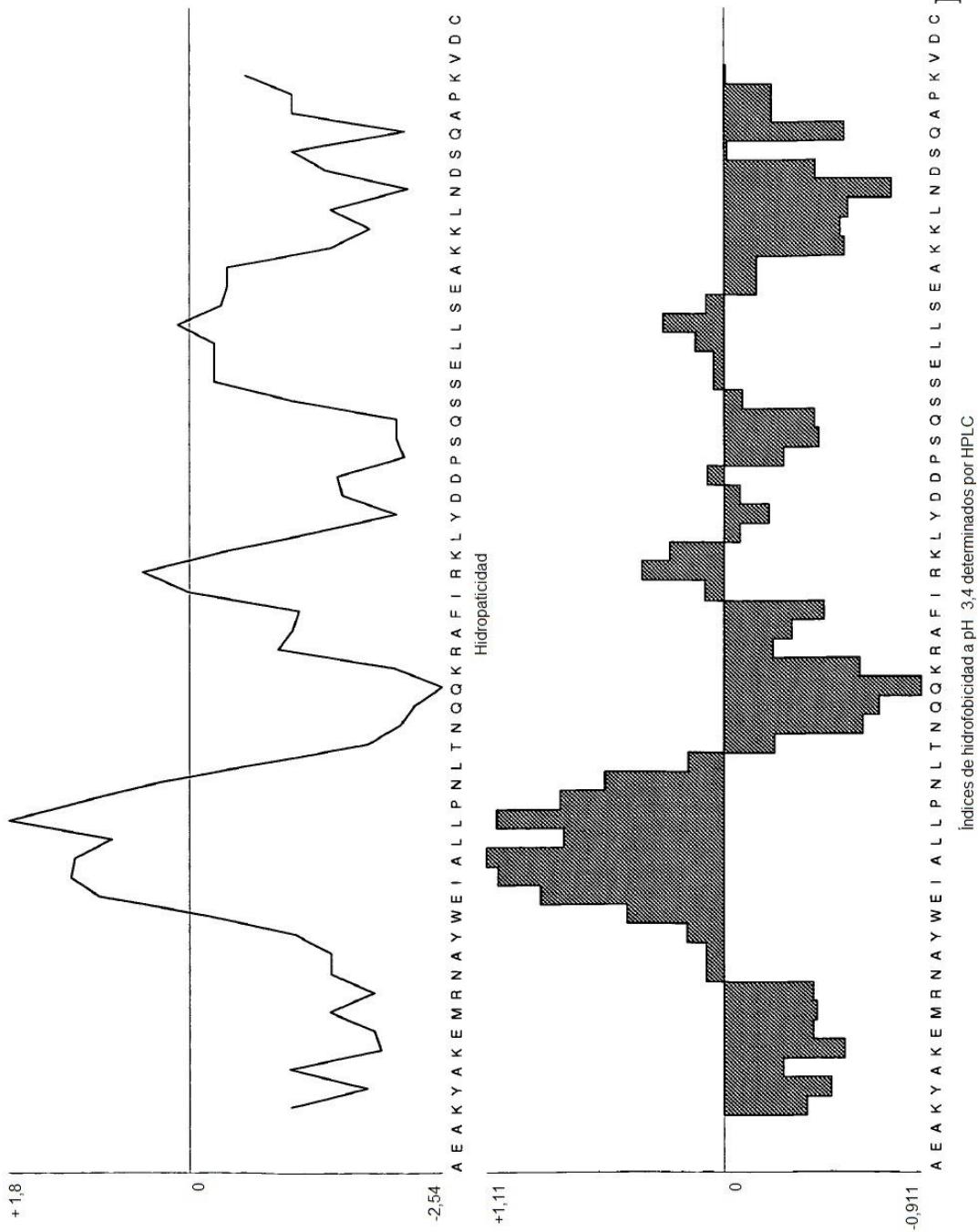


Fig. 12 B



**Fig. 13A**

Indices de hidrofobicidad a pH 3.4 determinados por HPLC

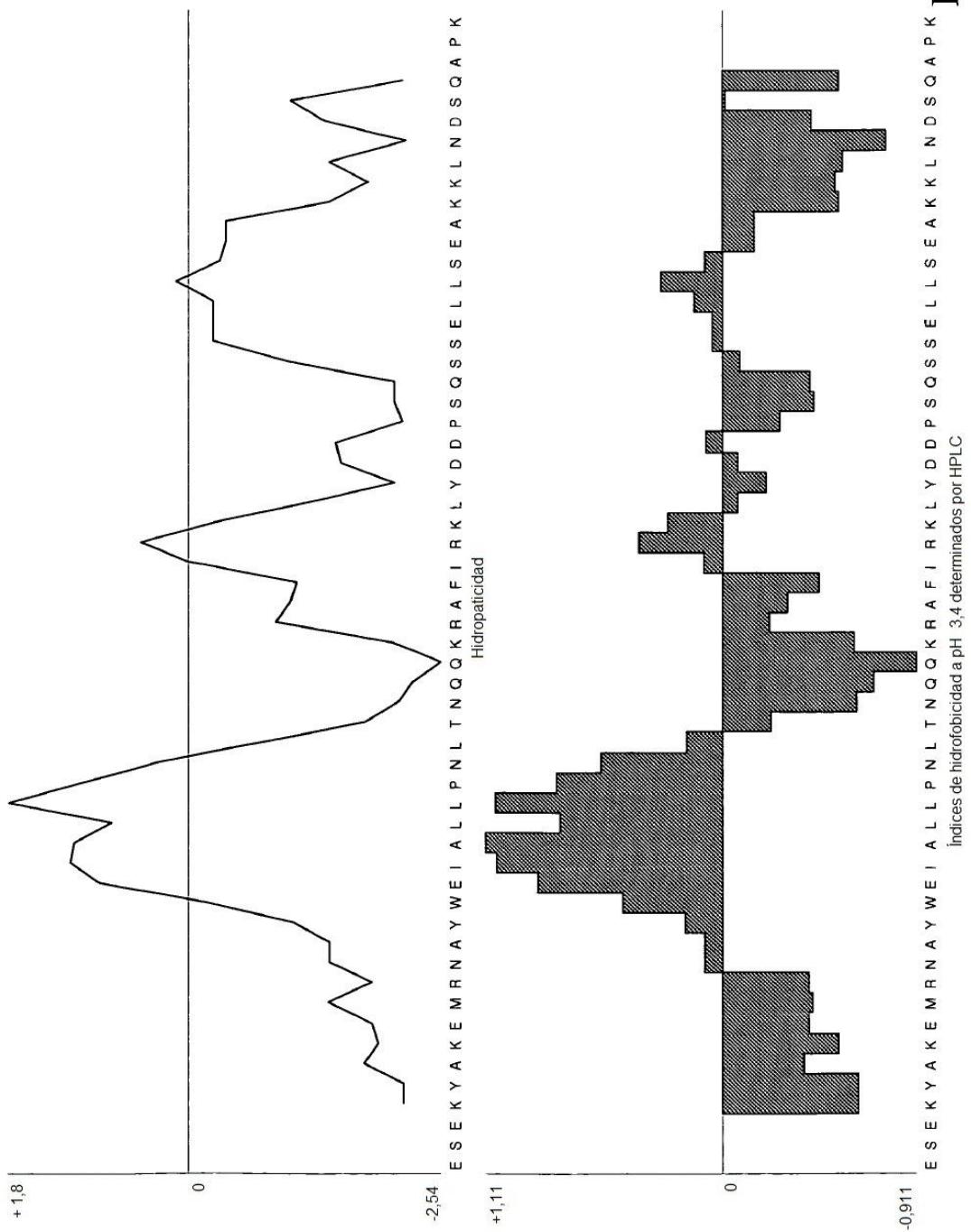
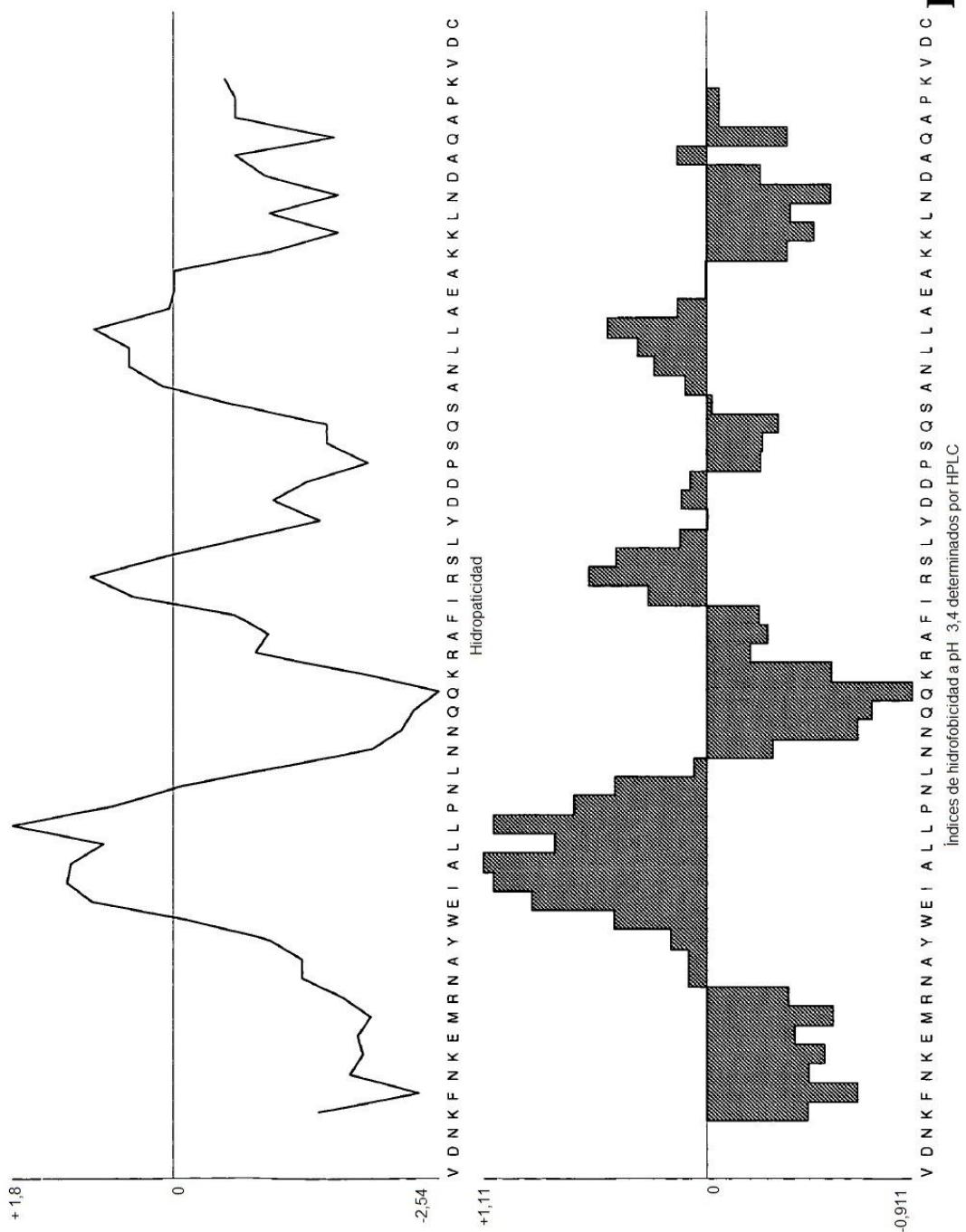


Fig. 13B

Indices de hidrofobicidad a pH 3.4 determinados por HPLC

**Fig. 13C**

índices de hidrofobicidad a pH 3,4 determinados por HPLC

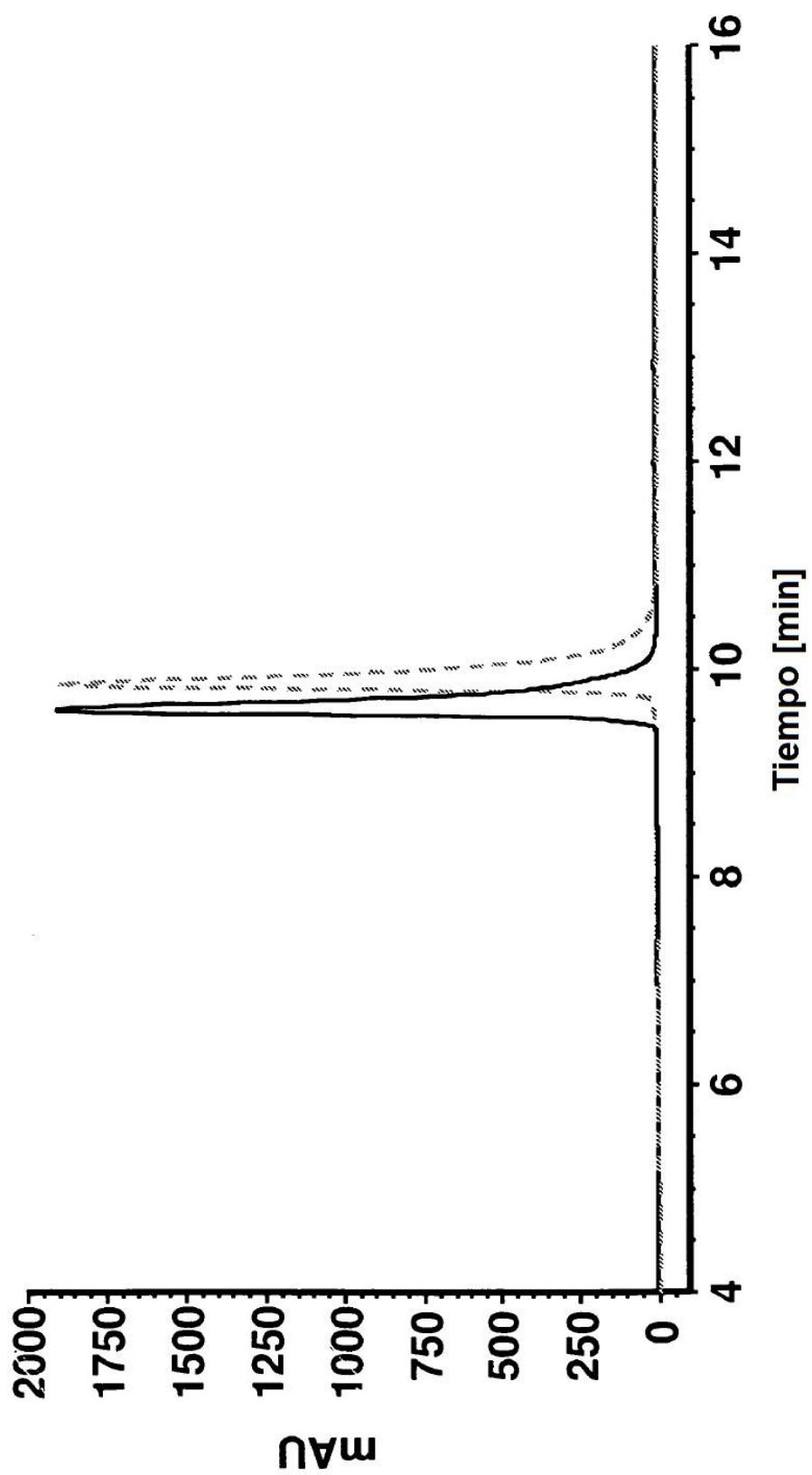


Fig. 14