

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 812 564**

51 Int. Cl.:

A61K 39/385 (2006.01)

C07K 14/435 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.11.2012 PCT/IB2012/002876**

87 Fecha y número de publicación internacional: **30.05.2013 WO13076580**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.11.2012 E 12824705 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.05.2020 EP 2782598**

54 Título: **Proteínas recombinantes y sus usos terapéuticos**

30 Prioridad:

23.11.2011 US 201161563128 P
01.06.2012 US 201261654401 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
17.03.2021

73 Titular/es:

BIOVEN 3 LIMITED (33.3%)
Codan Services Limited Clarendon House 2
Church Street
Hamilton HM11, GB;
CHARLTON, KEITH ALAN (33.3%) y
D'HONDT, ERIK (33.3%)

72 Inventor/es:

CHARLTON, KEITH, ALAN y
D'HONDT, ERIK

74 Agente/Representante:

PADIAL MARTÍNEZ, Ana Belén

ES 2 812 564 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

Proteínas recombinantes y sus usos terapéuticos

5 CAMPO

La presente divulgación se refiere al campo de las proteínas recombinantes para su uso en el tratamiento de enfermedades.

10 ANTECEDENTES

La inmunología del cáncer es el estudio de las interacciones entre un sistema inmunitario y las células cancerosas, tales como tumores o neoplasias malignas. El inicio de una respuesta inmunitaria, tal como el reconocimiento de antígenos específicos de cáncer, que son expresados por tumores humanos y no en tejidos normales, es de interés particular. Generalmente, los métodos para controlar la división y la proliferación de las células malignas han consistido en aislar estos antígenos y presentarlos de manera que el sistema inmunitario los reconozca como antígenos no propios e inducir una respuesta inmunitaria específica.

En la actualidad existe un número significativo de factores de crecimiento identificados, y se ha demostrado que la mayoría, si no todos, son mediadores importantes de la proliferación celular en diversos cánceres, además de estar implicados en otras patologías. Generalmente, los factores de crecimiento son proteínas séricas solubles que reconocen, y se unen mediante un grupo de receptores de factores de crecimiento ubicados en superficies celulares. Los factores de crecimiento particulares pueden ser específicos para un solo receptor o se pueden unir a más de un receptor estrechamente relacionado con afinidades variables. De manera similar, algunos receptores se unen a un ligando de factor de crecimiento único, mientras que otros se pueden unir a múltiples factores de crecimiento relacionados, de nuevo normalmente con diferentes afinidades. Después de la unión a su receptor natural, el dominio citoplasmático del receptor se fosforila, y esto inicia una cascada de señalización intracelular que da como resultado la modulación de la transcripción de uno o más genes y por último la progresión a través del ciclo celular y la proliferación celular.

Los factores de crecimiento y sus receptores son componentes esenciales de los procesos de crecimiento, desarrollo y reparación normales, y sus perfiles de distribución y niveles de expresión tisulares regulan estrechamente el crecimiento celular. Numerosos estudios han mostrado que los factores de crecimiento pueden estimular la proliferación de una variedad de tipos de células tanto *in vitro* como *in vivo* (Cohen S., Carpenter G., PNAS USA 72, 1317, 1975, Witsch E *et al*: Physiology: 25 (2):85-101, (2010)). Además, se ha demostrado que ciertos factores de crecimiento estimulan la proliferación en algunas líneas de células cancerosas, por ejemplo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF) puede estimular algunas células de carcinoma de pulmón de células no microcíticas (Osborne C. K. *et al*. Can Res. 40, 2. 361 (1980)). Otros factores de crecimiento, como el factor de crecimiento del endotelio vascular (VEGF), el factor de crecimiento de fibroblastos (FGF) y el factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), son importantes en varias enfermedades oncológicas, tales como cáncer de pulmón de células no microcíticas (NSCLC) (Ballas MS, Chachoua A., Onco Targets and Therapy: 4, 43-58 (2011)), cáncer de próstata, (Cox ME *et al*; Prostate 69 (1): 33-40 (2009)), y cáncer de mama (Law J *et al*, Cancer Res; 68, 24: 10238-10346 (2008)).

En tejidos malignos se han informado niveles altos de diversos receptores de factores de crecimiento. Por ejemplo, el receptor del factor de crecimiento epidérmico (EGFR) se ha detectado a niveles inusualmente altos en tumores malignos de origen epitelial, tales como cánceres de pulmón, mama, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro y esófago. El papel que desempeñan los factores de crecimiento y sus receptores en la regulación del crecimiento tumoral se desconoce, pero hay sugerencias de que la expresión del receptor del factor de crecimiento en las células tumorales proporciona un mecanismo para la estimulación del crecimiento autocrino que conduce a una proliferación incontrolada (Schlessinger J., Schreiber A. B., Levi A., Liberman T., Yarden Y. Crit. Rev. Biochem. 1983, 14 (2) 93-111). Además, Liao Y *et al*; Hum Pathol 36 (11): 1186-1196 (2005) y Cox ME *et al*; Prostate: 69 (1) 33-40 (2009) describen el papel del aumento del receptor y del factor de crecimiento en el cáncer de próstata metastásico.

Una estrategia de tratamiento para dirigirse a la señalización del factor de crecimiento en la terapia del cáncer ha sido el uso de una inmunoterapia pasiva, tal como el uso de anticuerpos monoclonales contra el receptor/receptores particulares involucrados. Tales estudios han demostrado que el reconocimiento específico del receptor por un anticuerpo que es capaz de inhibir la unión del ligando puede tener un efecto inhibitorio sobre la estimulación mitogénica de células malignas (SATO J. D., *et al*. Methods in Enzymology, vol. 146 págs. 63-81, 1987). Sin embargo, los anticuerpos que son de origen murino normalmente producirán una respuesta de anticuerpos humanos anti-ratón (HAMA), limitándolos de ese modo a una sola administración.

Otras estrategias de tratamiento han sido el uso de una inmunoterapia activa con vacunas que contienen el factor de crecimiento de interés para inducir una respuesta inmunitaria contra la molécula para inhibir el efecto de proliferación del factor de crecimiento en tumores. El documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.984.018, de Davila *et al.*, con el título Vaccine Composition Comprising Autologous Epidermal Growth Factor or a Fragment or a Derivative

Thereof having Anti-tumor Activity and use Thereof in the Therapy of Malignant Diseases, desvela, por ejemplo, el uso de una vacuna que contiene una mezcla de un factor de crecimiento y una proteína vehículo inmunogénica (es decir, no humana) conjugados químicamente entre sí usando glutaraldehído. Sin embargo, sin glutaraldehído ligado a ninguna teoría particular, se cree que la conjugación química dificulta las respuestas inmunitarias contra la vacuna.

Se trata de un enfoque técnicamente desafiante, ya que requiere que el hospedador genere una respuesta inmunitaria a un 'autoantígeno', y los sistemas inmunitarios de los vertebrados han evolucionado para evitar que se produzcan tales respuestas. Cuando se genera una respuesta inmunitaria fuerte contra un autoantígeno, por ejemplo, uno que incluye la activación de linfocitos T auxiliares, generalmente se produce una patología autoinmune. Durante muchos años se ha planteado la hipótesis de que algunos trastornos autoinmunes, por ejemplo, lupus, esclerosis múltiple (MS), diabetes, etc., podrían ser causados por la exposición precoz a un agente ambiental que incluye epítomos inmunogénicos (epítomos de linfocitos T) que imitan estrechamente los autoepítomos del hospedador. Esto podría conducir a la estimulación de los linfocitos T auxiliares que presentan reactividad cruzada con los epítomos del hospedador. La exposición posterior al agente ambiental podría dar como resultado una respuesta anti-autoinmune (Albert, L.J., e Inman, R.D New England Journal of Medicine, 30 de diciembre, págs. 2068-2074, 1999). Desde entonces se ha demostrado que un antígeno viral puede generar de hecho una respuesta anti-autoinmune contra una proteína de célula nerviosa (Levin, M.C. *et al.*, Nature Medicine vol 8 (5) págs. 509-513, 2002).

La publicación de Estados Unidos N.º 2006/0251654, de Casimiro *et al.*, con el título Method for Treatment of Malignant and Infectious Chronic Diseases, (la publicación '654) desvela un método para tratar a un sujeto portador de una enfermedad crónica maligna o infecciosa que comprende el método de inmunizar al sujeto con una vacuna que contiene un autoantígeno asociado con la enfermedad crónica maligna o infecciosa que se acopla a una proteína vehículo; tratar al sujeto con un agente inmunomodulador; e inmunizar al sujeto nuevamente con la vacuna de la etapa 1, y un adyuvante apropiado seleccionado entre hidróxido de aluminio y Montanide ISA 51 (Seppic, París, Francia). Desafortunadamente, se cree que la preparación de la vacuna mediante conjugación química obstaculiza la respuesta inmunitaria.

La mayoría de las vacunas descritas anteriormente exhiben una serie de limitaciones, que surgen principalmente del método de fabricación y la posible falta de uniformidad y homología del producto proteico. Las vacunas descritas anteriormente comprenden generalmente una mezcla de una proteína vehículo recombinante y polipéptidos de origen humano que se conjugan químicamente usando glutaraldehído. Desafortunadamente, este reactivo puede formar indeseablemente enlaces de reticulación covalentes entre variedades de grupos químicos y generalmente conduce a un producto muy heterogéneo. Por lo tanto, las vacunas resultantes pueden comprender no solo moléculas de proteína vehículo con números variables del polipéptido humano diana unido (por ejemplo, 0, 1, 2, 3, etc.), sino que cada uno de los polipéptidos humanos pueden unirse al vehículo a través de diferentes átomos y de ese modo en diferentes posiciones y en diferentes orientaciones. Además, tanto el polipéptido diana como las moléculas de proteína vehículo se pueden conjugar entre sí, dando como resultado diversos homo-multímeros que pueden no tener eficacia clínica y pueden no contribuir a una respuesta inmunitaria del paciente contra el cáncer.

El documento de Estados Unidos N.º 5.894.018 desvela proteínas conjugadas incluyendo, entre otros, factor de crecimiento epidérmico (EGF) conjugado con la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B), mediante reticulación mediada por glutaraldehído, con la intención de provocar una respuesta anti-EGF en sujetos humanos para el tratamiento de la neoplasia maligna dependiente de EGF.

SUMARIO

La presente memoria descriptiva desvela proteínas recombinantes y sus respectivos métodos de fabricación; la caracterización de las proteínas recombinantes y métodos terapéuticos de uso de las proteínas recombinantes para tratar enfermedades crónicas, tales como, por ejemplo, cánceres de pulmón, mama, vejiga, próstata, ovario, vulva, colon, colorrectal, intestinal, pulmón, cerebro, esófago, otros cánceres, y otras enfermedades.

La presente memoria descriptiva desvela que la proteína recombinante es una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una toxina B del cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* o un equivalente sintético, y que expresa una o más secuencias de uno o más epítomos de factores de crecimiento humano. Las expresiones de los factores de crecimiento o partes del mismo pueden estar presentes en múltiples sitios, como un solo antígeno, en tándem, y/o cadenas más largas de molécula o moléculas de antígeno por sitio.

La presente memoria descriptiva también desvela las proteínas recombinantes como una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una toxina B del cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* o un equivalente sintético, y que expresa una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo. La proteína recombinante también puede incluir una o más secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo, y/o una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo.

La presente memoria descriptiva también desvela proteínas recombinantes como una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una toxina B del cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* o un equivalente sintético, y que expresa una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo. La proteína recombinante también puede incluir una o más secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo, y/o una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo.

La presente memoria descriptiva desvela las expresiones de antígeno o antígenos tumorales o partes del mismo, receptor o receptores o partes del mismo, y/o factor o factores de crecimiento o partes del mismo que pueden estar presentes en múltiples sitios, como un solo antígeno o receptor, en tándem, y/o cadenas más largas de molécula o moléculas de antígeno o receptor por sitio.

La secuencia de un antígeno tumoral puede incluir una secuencia de un antígeno específico de próstata (PSA) o parte del mismo. La secuencia de un receptor puede incluir una secuencia de un receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) o parte del mismo y/o un receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her3) o parte del mismo.

La presente invención se refiere a una proteína recombinante como se define en la reivindicación 1 de las reivindicaciones adjuntas a la presente. En algunas realizaciones, la proteína recombinante puede incluir además una longitud completa o parte de la misma de uno o más de los siguientes factores de crecimiento, y/o autoantígenos alternativos tales como, pero no limitados a, otros factores de crecimiento, que incluyen, pero no se limitan a, EGF, IGF-1, IGF-2, FGF, TGF- β , TGF- α , VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, las BMP, y las IL 1-6. Dentro del ámbito de la divulgación se contempla que los factores de crecimiento se pueden seleccionar entre orígenes humanos y no humanos. Además dentro del ámbito de la divulgación se contempla que dicha secuencia de factores de crecimiento puede ser sustancialmente similar a la de factores de crecimiento humanos o no humanos o dicha secuencia puede contener partes funcionales de los mismos. Además, la proteína recombinante puede incluir una o más expresiones de otras secuencias que se pueden usar para modelar funcionalmente parte o todos los factores de crecimiento dentro de una secuencia proteica inmunogénica recombinante. En una realización, también se pueden expresar o añadir restos de flaqueo adicionales a la secuencia mínima para permitir que todo el dominio de neutralización de la molécula se presente en una conformación natural y sea accesible a las células del sistema inmunitario.

En el contexto de la presente divulgación, "dominio de neutralización" se define como una región o regiones de uno o ambos miembros de un par de unión específico, por ejemplo, un factor de crecimiento y su receptor afín, en el que la unión de una tercera molécula que no es un miembro del par de unión específico a la región o regiones mencionadas anteriormente evitará la unión posterior de los dos miembros del par de unión específico. La tercera molécula puede ser otra molécula proteica que incluye, pero no se limita a, un anticuerpo, o puede ser una molécula no proteica pequeña y puede ser de origen natural o sintético. El dominio de neutralización incluirá normalmente aquellas regiones de los miembros del par de unión específico que están en contacto directo durante la unión, y también incluirá regiones fuera de dichas regiones en las que después de la unión de una tercera molécula introduce suficiente impedimento estérico para evitar que los miembros del par de unión específico se unan directamente.

En el campo está bien establecido que el reconocimiento específico de un ligando por su receptor afín se define por una interacción entre el sitio de unión al receptor y una firma molecular particular (epítipo) del ligando. Por lo tanto, un anticuerpo que se une o que de otro modo bloquea el sitio de unión al receptor, o que se une al epítipo de reconocimiento del ligando o que de otro modo lo bloquea, evitará las interacciones ligando-receptor. Tales anticuerpos se describen como "de neutralización". En el contexto de la presente divulgación, es deseable que el hospedador genere anticuerpos de neutralización después de la administración de la proteína recombinante y, por lo tanto, la secuencia proteica puede expresar o incluir una o más de todas de, o una secuencia adecuada obtenida a partir de, un factor de crecimiento o antígeno tumoral de manera que los epítipos necesarios para la unión al receptor se presenten en una conformación funcional (nativa).

Además de expresar múltiples copias de un antígeno tumoral, receptor y/o factor de crecimiento únicos, presentadas como un antígeno tumoral, receptor y/o factor de crecimiento único o parte del mismo por sitios físicos, y/o como cadenas de antígeno tumoral, receptores y/o secuencias de factores de crecimiento repetitivo (por ejemplo, n = 1 o más); la proteína de acuerdo con la divulgación también puede incluir expresiones de uno o más epítipos o sitios de unión de dos o más antígenos tumorales, receptores y/o factores de crecimiento diferentes presentes como únicos o como cadenas en diferentes posiciones dentro de la secuencia de la proteína recombinante.

La proteína resultante puede ser un polipéptido único que exprese un antígeno tumoral, un receptor y/o un factor de crecimiento o uno o más epítipos o sitios de unión de los mismos dentro de la secuencia de la proteína recombinante. En una realización ilustrativa, la secuencia de la proteína recombinante expresa una o más partes de una secuencia de CT-B y presenta la expresión o expresiones del antígeno, receptor y/o factor de crecimiento tumorales o una o más expresiones de epítipos o sitios de unión del mismo en una superficie de la proteína recombinante en una conformación natural.

Se desvela un proceso para preparar una formulación proteica. El proceso incluye ensamblar uno o más monómeros monovalentes o multivalentes individuales juntos y preparar una vacuna multivalente que incluye una proteína recombinante que incluye uno o más antígenos, receptores y/o factores de crecimiento tumorales o partes de los mismos.

5 Se desvela un proceso para tratar a un paciente. El proceso incluye administrar al paciente por separado una o más vacunas monovalentes o multivalentes, un antígeno tumoral, receptor y/o factor de crecimiento, proteínas sintéticas en un mismo día o en días o momentos alternos durante un periodo de vacunación.

10 Alternativamente, se desvela un proceso para tratar a un paciente, en el que el proceso incluye administrar al paciente por separado una o más vacunas monovalentes o multivalentes, un antígeno tumoral, receptor y/o factor de crecimiento, proteínas sintéticas en un vehículo farmacéuticamente aceptable que incluye un adyuvante para favorecer una respuesta inmunitaria.

15 **BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS**

Las realizaciones descritas en la presente divulgación se ilustran en las figuras de los dibujos adjuntos que pretenden ser a modo de ejemplo y no limitantes, en donde se pretende que las referencias similares hagan referencia a partes similares o correspondientes, y en donde:

- 20 La Figura 1 ilustra una tabla de secuencias y estructuras de moléculas de EGF de una serie de organismos;
 La Figura 2 ilustra una realización de una estructura de una molécula de EGF humano, que incluye un dominio de neutralización de EGF;
 La Figura 3 ilustra una realización de una estructura lineal simplificada de los pares de cisteína de la molécula de EGF, que incluye el dominio de neutralización de EGF;
 25 La Figura 4 ilustra una realización de una secuencia mínima de la molécula de EGF que presenta el dominio de neutralización de EGF en una conformación correcta;
 La Figura 5 ilustra una realización de una estructura de una molécula sintética modificada, que expresa el dominio de neutralización de EGF;
 30 La Figura 6 ilustra un gráfico de barras de mAb 10825 y mAb 10827 que se unen a rHuEGF con una densidad óptica (DO) a 450 nm;
 La Figura 7 ilustra un gráfico de barras de mAb 10825 y mAb 10827 que se unen a rHuEGF en competición con un péptido soluble libre derivado del dominio de neutralización;
 La Figura 8 ilustra un gráfico de líneas de la unión del dominio mAb 10827 de neutralización anti-EGF a 6
 35 proteínas sintéticas EGF-CT-B adsorbidas directamente sobre placas de ELISA;
 La Figura 9 ilustra un gráfico de líneas de la unión del dominio mAb 10827 de neutralización anti-EGF a 6 proteínas sintéticas EGF-CT-B capturadas por un anticuerpo anti-CT-B de conejo;
 La Figura 10 ilustra una transferencia de Western de las 6 proteínas EGF-CT-B sintéticas monovalentes desarrolladas sobre gel de SDS en condiciones nativas (sin ebullición), y detectadas con un anticuerpo anti-CT-B;
 40 La Figura 11 ilustra un gráfico de líneas de la unión del dominio mAb 10827 de neutralización anti-EGF a proteínas EGF-CT-B sintéticas que incluye cualquiera de 2 secuencias de EGF de longitud completa (E2) o dos secuencias parciales de EGF (B2);
 La Figura 12 ilustra una transferencia de Western de las proteínas EGF-CT-B sintéticas bivalentes desarrolladas sobre geles de SDS-PAGE no desnaturalizantes;
 45 La Figura 13 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye dos secuencias de EGF de longitud completa (subrayadas) y una secuencia de CT-B (en letra cursiva);
 La Figura 14 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye dos secuencias de dominio de neutralización de EGF (subrayadas) y la secuencia de CT-B (en letra cursiva);
 50 La Figura 15 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye dos secuencias parciales de la molécula de EGF incluyendo el dominio de neutralización de EGF, Cys6 a Cys31, (subrayada) y la secuencia de CT-B (en letra cursiva);
 La Figura 16 ilustra una transferencia de Western que muestra el efecto del desplazamiento del pH en la multimerización de proteína CT-B nativa. Las muestras en el lado derecho del gel se incubaron durante 5 minutos al pH indicado en la parte inferior antes del análisis del gel. Las muestras en el lado izquierdo se incubaron al pH indicado en la parte inferior durante 5 minutos, a continuación se neutralizaron de vuelta a pH 7,0 durante 1 hora antes del análisis del gel;
 55 La Figura 17 ilustra una tabla de las construcciones T1-T6, E2, y B2 que incluye secuencias que expresan EGF y CT-B;
 La Figura 18 ilustra una transferencia de Western de las construcciones E2 y B2;
 La Figura 19 ilustra las construcciones E2, E2N, y E2C incluyendo secuencias que expresan EGF y CT-B;
 La Figura 20 ilustra construcciones incluyendo secuencias que expresan EGF y CT-B y que contienen conectores de aminoácido extendidos;
 La Figura 21 ilustra una transferencia de Western de las construcciones E2, E2N, y E2C;
 65 La Figura 22 ilustra una transferencia de Western de un número de construcciones N-terminales incluyendo los conectores de aminoácido extendidos; y

La Figura 23 ilustra una transferencia de Western de un número de construcciones C-terminales incluyendo los conectores de aminoácido extendidos.

La Figura 24 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye IGF1 (subrayada), EGF (subrayada y en letra cursiva) y las secuencias de CT-B (en letra cursiva);

La Figura 25 ilustra un gráfico de barras de un ELISA de captura que demuestra la presencia simultánea de secuencias de IGF, EGF y CTB en una proteína recombinante única. Las barras A y B fueron capturadas con anticuerpo anti-EGF, y la barra C con anticuerpo anti-IGF. Las proteínas se detectaron como sigue a continuación: A anti-CTB, B anti-IGF y C anti-CTB;

La Figura 26 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye la secuencia de Hu-IGFI (subrayada) y la secuencia de CT-B (en letra cursiva);

La Figura 27 ilustra un gráfico de barras de un ELISA de captura en el que se detectan hetero-oligómeros de IGF-CTB y EGF-CTB. Todas las muestras incluyen IGF C-terminal para CTB. Las muestras A y B incluyen EGF C-terminal para CTB, y las muestras B y D incluyen EGF N-terminal para CTB. Las muestras A y B fueron capturadas con un anticuerpo anti-EGF, y se detectó IGF, mientras que las muestras C y D fueron capturadas con un anticuerpo anti-IGF y se detectó EGF;

La Figura 28 (a-e) ilustra secuencias de proteína sintética incluyendo la secuencia de CT-B (en letra cursiva) y las secuencias del factor de crecimiento (subrayadas) de a) TGF-Betal, b) FGF2, c) HGF (NK1), d) IGF1/2 y e) VEGF-A/C (secuencia de VEGF-C subrayada y en letra cursiva);

La Figura 29 ilustra un gráfico de barras de un ELISA de captura de una serie diversa de proteínas recombinantes quiméricas incluyendo secuencias derivadas de uno o más factores de crecimiento junto con secuencias de CTB. En cada caso, la proteína recombinante fue capturada con un anticuerpo específico para una de las secuencias y a continuación se detectó con un anticuerpo específico para una secuencia diferente como sigue a continuación:

HGF y TGF B1 fueron capturados con anticuerpos α -HGF y α -TGF B1, y se detectó CTB;

FGF2 fue capturado con anticuerpo α -CTB y se detectó FGF2;

VEGF A/C fue capturado con (i) anticuerpo α -VEGF-A y (ii) anticuerpo α -VEGF-C, y en ambos casos se detectó CTB;

IGF1/2 fue capturado con anticuerpo α -IGF1 en ambos casos, y se detectó con (i) anticuerpo α -CTB y (ii) anticuerpo α -IGF2;

La Figura 30 ilustra una transferencia de Western de un gel de SDS-PAGE de proteína TGF B1-CTB recombinante nativa de acuerdo con la Figura 28a que demuestra la presencia de proteína recombinante principalmente pentamérica;

La Figura 31 ilustra una secuencia de proteína sintética que incluye a) una secuencia de proteína sintética que incluye la secuencia de TGF-B1 (subrayada) y la secuencia de CT-B (en letra cursiva) y b) la secuencia de dominio de unión a ligando del receptor TGF-Beta2 (subrayada) y la secuencia de CT-B (en letra cursiva);

La Figura 32 ilustra un gráfico de barras de un ELISA de captura de la proteína recombinante que contiene las secuencias tanto de TGF-Beta-R2 como de CTB. El gráfico demuestra que ambas secuencias se pueden unir de forma simultánea en ambas orientaciones sin sesgo;

La Figura 33 ilustra que la proteína recombinante que contiene secuencias derivadas de TGF-beta y de CTB es capaz de unirse a secuencias que contienen proteína recombinante derivada del dominio de unión a ligando del receptor 2 de TGF beta y CTB;

La Figura 34 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 1 a una dilución de 1/100 para r-IGF después de la inmunización;

La Figura 35 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 2 a una dilución de 1/100 para r-EGF después de la inmunización;

La Figura 36 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 3 a (a) una dilución de 1/100 y (b) una dilución de 1/8 para r-EGF después de la inmunización;

La Figura 37 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 3 a (a) una dilución de 1/100 y (b) una dilución de 1/8 para r-IGF después de la inmunización;

La Figura 38 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 4 a (a) una dilución de 1/100 y (b) una dilución de 1/8 para r-EGF después de la inmunización;

La Figura 39 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 4 a (a) una dilución de 1/100 y (b) una dilución de 1/8 para r-IGF después de la inmunización;

La Figura 40 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 5 a una dilución de 1/8 (excepto la muestra 178 a 1/100) para r-IGF después de la inmunización;

La Figura 41 ilustra las respuestas del anticuerpo IgG de sueros de ratones del Grupo 6 a una dilución de 1/100 para a) r-IGF y b) rHu-EGF después de la inmunización;

La Figura 42 ilustra la estructura del mono-gangliósido GM1, el compañero de unión natural de la subunidad B de la toxina del cólera;

La Figura 43 ilustra la estructura de la D-galactosa disponible en el mercado conjugada con un soporte sólido (Pierce); y

La Figura 44 ilustra un gel de SDS-PAGE de la purificación de rCTB del sobrenadante del cultivo (medios) de tres cepas de células de *E. coli* transformadas con un vector de expresión de CTB como sigue a continuación: el Carril 1 muestra el marcador de tamaño. Los Carriles 2, 5 y 8 muestran en sobrenadante de cultivo sin procesar.

Los Carriles 3, 6 y 9 muestran fracciones periplásmicas sin procesar. Los Carriles 4, 7 y 10 muestran CTB purificada eluida. El Carril 11 muestra CTB marcada con His purificada por IMAC.

DESCRIPCIÓN DETALLADA

5 En el presente documento se desvelan realizaciones detalladas de las presentes proteínas recombinantes o vacunas, sin embargo, se debe entender que las realizaciones que se desvelan son simplemente a modo de ejemplo, que se pueden realizar de diversas formas. Por lo tanto, los detalles funcionales específicos desvelados en el presente documento no se deben interpretarse como limitantes, sino simplemente como base para las reivindicaciones y como base representativa para enseñar a un experto en la materia a emplear de diversas formas la proteína recombinante que se desvela en el presente documento.

15 La presente divulgación proporciona una proteína recombinante homogénea para mejorar la presentación del número máximo de epítomos de factores de crecimiento, epítomos de antígenos tumorales y/o sitios de unión al receptor como elementos de una proteína recombinante inmunogénica. En una realización ilustrativa, se describe una proteína recombinante que expresa toda o partes de una toxina B del cólera (CT-B) y un factor de crecimiento epidérmico humano (EGF). En realizaciones ilustrativas alternativas, la proteína puede expresar además otras proteínas recombinantes inmunogénicas que se modelan basándose en proteínas inmunogénicas conocidas. Dentro del ámbito de la divulgación se contempla que tales proteínas recombinantes serán expresiones de polipéptidos que son altamente inmunogénicos para el sistema inmunitario humano. Preferentemente, las proteínas recombinantes confieren propiedades adicionales a la proteína quimérica, por ejemplo, alto rendimiento de expresión y facilidad de fabricación, estabilidad oral y la capacidad de hacer un cruce desde el intestino al torrente sanguíneo, y/o uso previo seguro en seres humanos.

25 Las proteínas recombinantes desveladas en el presente documento pueden incluir o expresar una alta proporción de una secuencia proteica derivada de autoantígenos diana, como una función del peso molecular total. Esto se puede conseguir, por ejemplo, usando un modelo de proteína grande que contiene múltiples epítomos de factores de crecimiento. Estos epítomos de factores de crecimiento pueden ser copias múltiples de todo o parte de un factor de crecimiento único, o copias de todo o parte de más de un factor de crecimiento diferente.

30 De acuerdo con la divulgación, las expresiones de los epítomos del factor de crecimiento se deberían plegar permitiendo que su conformación natural fuera retenida sustancialmente y presentada a los componentes del sistema inmunitario del hospedador de tal manera que se provocara una respuesta inmunitaria robusta del hospedador a dichos epítomos. Los ejemplos de modelos de proteínas naturales adecuadas para modelar un dominio de soporte de epítomo de una proteína recombinante incluyen, pero no se limitan a, subunidad B de la toxina del cólera, subunidades B de enterotoxina LT y LT-II termolábiles de *E. coli*, veratoxina, toxina de *pertussis*, enterotoxina de *C. jejuni*, toxina de Shiga, toxina de listeria, toxoide del tétano, toxoide de difteria, proteína de la membrana externa de *N. meningitidis*, proteína de cubierta de bacteriófago, adenovirus y otras proteínas de cubierta viral. Alternativamente, un componente no propio de la proteína puede ser pequeño. Como mínimo, la secuencia o secuencias no propias deberían tener una longitud comprendida entre aproximadamente 9, 10, 11 o más aminoácidos, e incluir total o parcialmente al menos un epítomo de linfocitos T humanos. Alternativamente, se pueden usar polipéptidos "sintéticos" no naturales que cumplan los requisitos de conferir inmunogenicidad a la proteína completa y permitir la presentación apropiada del factor o factores de crecimiento, receptores, antígenos tumorales o epítomos de los mismos al sistema inmunitario del hospedador.

45 En una realización ilustrativa, el dominio de soporte del epítomo de la proteína recombinante, ya sea derivado de una secuencia polipeptídica natural o sintética, debería tener la capacidad de autoensamblarse en multímeros oligoméricos en condiciones químicas/ambientales adecuadas, o de reducirse a monómeros en condiciones alternativas. Idealmente, los dominios de multimerización se ensamblarán en multímeros estables con un número discreto de subunidades, por ejemplo dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, etc., de manera que se genere un producto de tamaño homogéneo. Los ejemplos de polipéptidos naturales incluyen, pero no se limitan a, cremalleras de leucina, proteína represora lac, estreptavidina/avidina, subunidad B de la toxina del cólera, subunidades B de otras toxinas AB₅, dominio de trimerización de *Pseudomonas* y proteínas de la cápside viral.

55 De acuerdo con la divulgación, las proteínas recombinantes, ya sean factores de crecimiento o partes de los mismos, receptores celulares o partes de los mismos, antígenos tumorales o partes de los mismos, están relacionados con una amplia gama de rutas celulares implicadas en enfermedades crónicas o cánceres para factores de crecimiento y receptores y para la gama más amplia posible de tumores sólidos para uso de antígenos tumorales dentro de dichas proteínas sintéticas. Las proteínas están en forma de proteína recombinante y pueden ser útiles en el tratamiento de enfermedades crónicas, por ejemplo, cánceres de mama, pulmón, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, colorrectal, intestinal, de cabeza y cuello y esófago. Como se pueden expresar diferentes antígenos tumorales y múltiples receptores celulares y factores de crecimiento sobreexpresados en dichas enfermedades, las proteínas que se describen a continuación pueden contener uno o más antígenos tumorales diferentes, uno o más receptores o factores de crecimiento diferentes de una o múltiples rutas celulares asociadas con la enfermedad. Estas proteínas se denominan "multivalentes".

5 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa uno o más dominios de neutralización del factor de crecimiento epidérmico (EGF). La proteína está en forma de una proteína recombinante y puede ser útil en el tratamiento de enfermedades crónicas, por ejemplo, cánceres de mama, pulmón, vejiga, ovario, vulva, colon, pulmón, cerebro, colorrectal, cabeza y cuello, y esófago. La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de EGF y secuencias de CT-B.

10 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor de crecimiento de fibroblastos (FGF). Se desvela una proteína que es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de FGF y secuencias de CT-B.

15 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor-Beta 1 de crecimiento transformante (TGF- β 1). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de TGF- β 1 y secuencias de CT-B.

20 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor-Beta 1 de crecimiento transformante (TGF- β 1). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de TGF- β 1 y secuencias de CT-B.

25 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor 1 de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de IGF-1 y secuencias de CT-B.

30 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor de crecimiento de hepatocitos (HGF). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de HGF y secuencias de CT-B.

35 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor 1 de crecimiento de tipo insulínico (IGF-1) y un factor 2 de crecimiento de tipo insulínico. La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de IGF-1, secuencias de IGF-2 y secuencias de CT-B.

40 Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A) y un factor C de crecimiento endotelial vascular (VEGF-C). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de dominio de neutralización de VEGF-A, secuencias de VEGF-C y secuencias de CT-B.

45 Para determinar la región o regiones codificantes apropiadas del HuEGF a expresar o incluir, se analizan las secuencias y estructuras de moléculas de EGF de una serie de organismos. Por referencia a la Fig. 1 se describe una tabla que ilustra secuencias y estructuras de moléculas de EGF de una serie de organismos. Como se ilustra en la Fig. 1, una caja 100 incluye una parte de la secuencia de las moléculas de EGF de la serie de organismos, que representa el epítipo del dominio de neutralización de las moléculas de EGF. Aunque hay una cantidad significativa de conservación entre los epítipos del dominio de neutralización de las moléculas de EGF de diferentes especies, también hay una gran cantidad de variación entre especies. De forma notable para estudios *in vivo*, un dominio de neutralización (secuencia 100 en la caja) está totalmente conservado entre primates, pero es diferente en roedores y otras especies. Del mismo modo, las diferentes secuencias de las moléculas de EGF equivalen a diferencias en la estructura terciaria.

50 Por referencia a la Fig. 2 se describe una estructura de la molécula de EGF humano, que incluye el dominio de neutralización de EGF, de acuerdo con una realización ilustrativa. La molécula de EGF contiene seis restos de cisteína incluyendo Cys6, Cys14, Cys20, Cys31, Cys33, y Cys42. Los seis restos de cisteína son importantes para determinar el plegamiento de la molécula de EGF. El dominio 200 de neutralización de EGF (ilustrado como una lámina β anti-paralela) está limitado por dos pares de cisteína unidos por disulfuro separados, Cys6-Cys20 y Cys14-Cys31. Los dos pares de cisteína unidos por disulfuro, Cys6-Cys20 y Cys14-Cys31 son importantes porque estos dos pares definen la secuencia mínima o el número mínimo de péptidos de la molécula de EGF que presenta el dominio 200 de neutralización de EGF en la conformación correcta.

55 Por referencia a la Fig. 3 se describe una estructura lineal simplificada de los pares de cisteína de la molécula de EGF, incluyendo el bucle B de EGF 200, de acuerdo con una realización ilustrativa. Como se ilustra en la Fig. 3, Cys6 se une a Cys20, Cys14 se une a Cys31, y Cys33 se une a Cys42. El bucle B de EGF 200 está situado entre Cys20 y Cys31. Por lo tanto, la secuencia mínima o el número de péptidos mínimo 400 de la molécula de EGF que presenta el dominio 200 de neutralización de EGF en la conformación correcta es la secuencia de Cys6 a Cys31, como se ilustra en la Fig. 4.

60 Por referencia a la Fig. 5 se describe una estructura de una molécula de proteína recombinante modificada de acuerdo con la divulgación que expresa al menos una parte de la molécula de EGF, que incluye el dominio de neutralización de EGF de acuerdo con una realización ilustrativa. En Cys33 de la molécula de EGF se realiza una sola mutación o cambio para producir la molécula sintética modificada cambiando Cys33 por Ala33 para eliminar la

Cys33 para evitar cualquier posible problema de plegamiento erróneo.

La alanina se usa porque la alanina es bastante 'neutra' en términos de características funcionales y tiene la cadena lateral más pequeña aparte de la glicina. Por lo tanto se considera que la alanina es el resto con menor probabilidad de impartir cualquier característica no nativa a la proteína recombinante modificada. Dentro del ámbito de la divulgación se contempla que potencialmente se podría usar cualquier otro resto, o incluso no realizar ningún cambio.

En una realización ilustrativa, cualquier parte de la molécula de EGF se podría usar desde la región definida en la reivindicación 1 hasta toda la secuencia de EGF. Las secuencias seleccionadas para expresión en las proteínas EGF-CT-B recombinantes en los ejemplos incluyen todo de la secuencia EGF, y separadamente una región que se cree que es necesaria para corregir la presentación del dominio de neutralización definido como un dominio de neutralización en el contexto usado, y no incluye ninguna otra parte del EGF que no se considera necesaria para conseguir esto.

Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa un dominio de neutralización del factor A de crecimiento endotelial vascular (VEGF-A). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de VEGF-A y secuencias de CT-B. La secuencia de VEGF-A puede incluir el dominio de neutralización que comprende la secuencia de Cys57 a Cys104 de la proteína madura y puede incluir uno o más restos de flanqueo que se extienden hasta Val14 y Lys108.

Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa el dominio de unión a ligando del receptor II de TGF-Beta. La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de TGFB-RII y secuencias de CT-B. La secuencia de TGFB-RII incluirá cualquier secuencia del dominio extracelular entre Thr23 y Gln 166.

Se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea que expresa el dominio de unión a ligando del receptor de HGF (c-Met). La proteína es una proteína recombinante que expresa o que incluye secuencias de receptor de HGF y secuencias de CT-B. La secuencia del receptor de HGF puede incluir cualquier secuencia del dominio de SEMA extracelular entre Lys27 y Leu515.

Ejemplo I: Protocolos de ELISA

Para determinar si las proteínas recombinantes, tales como las proteínas EGF-CT-B sintéticas de acuerdo con la divulgación, pueden presentar el bucle B de EGF en la conformación correcta, se obtuvieron dos anticuerpos monoclonales comerciales (Santa Cruz Antibodies, N.ºs de Cat. 10825 y 10827) que se conocen porque bloquean la unión de EGF al receptor de EGF. Sin desear quedar ligado a ninguna teoría en particular, a partir del número de fuentes se postula que la unión al receptor de EGF se consigue en parte a través de la región definida por los restos Met21-Ala30.

En una realización ilustrativa, concentraciones de 1 ug/ml y 2 ug/ml de mAb 10825 y mAb 10827 se usaron para unir a una proteína de EGF (rEGF) recombinante en ELISA, y la densidad óptica (DO) se midió a 450 nm. Los resultados se ilustran en un gráfico de barras por referencia a la Fig. 6. Como se ilustra en la Fig. 6, el rEGF retiene su conformación natural cuando se adsorbe sobre una placa de ELISA y 1 ug/ml de cualquiera de mAb 10825 o mAb 10827 es suficiente para obtener una buena señal.

Para evaluar el reconocimiento de los restos Met21-Ala30, una placa se revistió con aproximadamente 100 ul/pocillo de proteína (rEGF) a aproximadamente 1 ug/ml y se incubó a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1 h. La placa se lavó dos veces con aproximadamente 200 ul/pocillo de PBS-Tween al 0,5 % (PBST), a continuación dos veces con aproximadamente 200 ul de PBS. La placa se bloqueó con aproximadamente 200 ul/pocillo de PBS-leche en polvo al 2 % (MPBS) y se incubó durante aproximadamente 1 hora a aproximadamente 37 °C. A continuación la placa se lavó dos veces con PBST y dos veces con PBS, como anteriormente. Aproximadamente 100 ul de los anticuerpos de ensayo se añadieron a cualquiera de aproximadamente 1 ug/ml o aproximadamente 2 ug/ml y se incubó durante aproximadamente 1 hora aproximadamente a temperatura ambiente (TA). La placa se lavó de nuevo como se describió anteriormente. En segundo lugar, un anticuerpo (específico para Fc anti-ratón marcado con HRP, código de producto A0168 de Sigma) se añadió a una dilución de aproximadamente 1/1000, aproximadamente 100 ul/pocillo y se incubó durante aproximadamente 1 h a aproximadamente TA. La placa se lavó de nuevo como anteriormente, y se desarrolló con aproximadamente 100 ul/pocillo de sustrato Sureblue TMB hasta el desarrollo del color (normalmente aproximadamente 5-10 min). La reacción se detuvo con aproximadamente 50 ul/pocillo de H₂SO₄ 1 M, y se hizo la lectura de la placa a aproximadamente 450 nm.

Además, se llevó a cabo un ELISA de unión competitiva. En el segundo ELISA, la unión de cada uno de los anticuerpos mAb 10825 y mAb 10827 a rEGF se evaluó en presencia de cualquiera de péptido soluble libre correspondiente al epítipo de interés (secuencia peptídica MYIEALDKYA) o un péptido de control irrelevante (secuencia peptídica SLAGSSGALSK). Los ELISA se llevaron a cabo con aproximadamente 100 ul/pocillo aproximadamente 1 ug/ml de mAb 10825 más aproximadamente 1 ug/ml del péptido soluble libre correspondiente al

epítipo diana, aproximadamente 1 ug/ml de mAb 10827 más aproximadamente 1 ug/ml del péptido soluble libre Met21-Ala30, aproximadamente 1 ug/ml de mAb 10825 más aproximadamente 1 ug/ml del péptido de control irrelevante, y aproximadamente 1 ug/ml de mAb 10827 más aproximadamente 1 ug/ml del péptido de control irrelevante.

5 La densidad óptica (DO) se midió a 450 nm. Los resultados se ilustran en un gráfico de barras por referencia a la Fig. 7. Como se ilustra en la Fig. 7, de los dos anticuerpos, mAb 10825 y mAb 10827, es evidente que el anticuerpo mAb 10827 se une al epítipo de neutralización de Met21-Ala30 y el anticuerpo mAb 10825 no lo hace. El anticuerpo mAb 10825 se neutraliza probablemente en virtud del impedimento estérico de la unión al receptor mediante el
10 bloqueo de una región de EGF conformacionalmente proximal a la región definida por los restos Met21-Ala30. Por lo tanto, el anticuerpo mAb 10827 se une al epítipo Met21-Ala30 de neutralización de rEGF en su estado nativo, y se usó en el siguiente análisis de los precursores de vacuna de EGF-CT-B sintética.

Ejemplo II: Presentación de epítipo de neutralización de EGF

15 Para determinar si o no la vacuna de proteína recombinante EGF-CT-B que expresa el EGF en un extremo terminal de la secuencia de CT-B interfiere con o, de otro modo, influye en cualquiera de las características inherentes deseadas del dominio o dominios de EGF, específicamente la presentación conformacional correcta del epítipo Met21-Ala30 de EGF, y la capacidad de los monómeros de CT-B para ensamblarse en multímeros (anillos
20 pentaméricos) en condiciones fisicoquímicas apropiadas, se crearon seis proteínas recombinantes que expresaban toda la región codificante de EGF en la secuencia de CT-B en cualquiera de los extremos N (Ensayo 1-Ensayo 3) o C-terminales (Ensayo 4-Ensayo 6).

25 El Ensayo 1 y el Ensayo 4 incluyen la vacuna de proteína recombinante EGF-CT-B que expresa la secuencia de EGF de longitud completa directamente en el dominio de CT-B. El Ensayo 2 y el Ensayo 5 incluyen la vacuna de EGF-CT-B sintética que expresa la secuencia de EGF de longitud completa separada del dominio de CT-B por una secuencia peptídica corta de 3 aminoácidos. La vacuna de proteína recombinante EGF-CT-B que expresa la secuencia de EGF en el extremo N-terminal, incluye SerGlyGly como la secuencia específica de 3 aminoácidos, e
30 incluye un sitio de restricción KpnI. La vacuna de proteína recombinante EGF-CT-B que expresa la secuencia de EGF en el extremo C-terminal, incluye SerSerGly como la secuencia peptídica de 3 aminoácidos, e incluye un sitio de restricción XhoI.

35 El Ensayo 3 y el Ensayo 6 incluyen la proteína recombinante EGF-CT-B que expresa la secuencia de EGF de longitud completa del dominio CT-B mediante una secuencia peptídica corta de 5 aminoácidos. La proteína recombinante EGF-CT-B que expresa la secuencia de EGF en el extremo N-terminal, incluye GlyGlySerGlyGly como la secuencia peptídica de 5 aminoácidos, e incluye un sitio de restricción KpnI. La EGF-CT-B sintética que expresa la secuencia de EGF en extremo C-terminal, incluye SerSerGlyGlyGly como la secuencia peptídica de 5 aminoácidos, e
40 incluye un sitio de restricción XhoI. Las secuencias peptídicas cortas de 3 y 5 aminoácidos sirven tanto para separar el dominio del factor de crecimiento de la secuencia de CT-B, como también para permitir un grado de libertad de movimiento de un dominio con respecto al otro, reduciendo de ese modo cualquier impedimento estérico potencial.

45 Cada una de las seis proteínas recombinantes EGF-CT-B se clonaron en un vector de expresión bacteriano (pIMS147), de modo que las proteínas EGF-CT-B recombinantes sintéticas se pudieron expresar en periplasma de *E. coli*, y se purificaron mediante la inclusión de una etiqueta de 6xHis C-terminal. Cada secuencia de EGF-CT-B recombinantes se expresó, se purificó, y se cuantificó por medio de un ensayo de proteína en gel/Bradford.

50 La presentación del epítipo Met21-Ala30 de neutralización de EGF en cada una de las seis proteínas EGF-CT-B recombinantes determinó mediante ELISA. Las proteínas EGF-CT-B recombinantes, incluyendo un dominio de EGF terminal se inmovilizaron sobre una placa de ELISA. Los epítopos Met21-Ala30 de EGF se detectaron con el anticuerpo mAb 10827 (Santa Cruz).

55 La placa de ELISA se revistió con diluciones 2 veces en serie de proteínas sintéticas EGF-CT-B purificadas con 6-His y se incubó a aproximadamente 37 °C durante aproximadamente 1 hora. La placa se lavó y se bloqueó con aproximadamente un 2 % de MPBS, como se describió anteriormente. El lavado implicó el pipeteo de aproximadamente 200 ul de PBS o PBST en cada pocillo, volteando la placa y dando golpecitos para vaciar los pocillos, y con repetición. El anticuerpo mAb 10827 a continuación se añadió a todos los pocillos a aproximadamente 1 µg/ml y se incubó a aproximadamente temperatura ambiente durante aproximadamente 1 hora. La placa se lavó una vez más y se añadió peroxidasa de rábano picante (HRP) anti-ratón a los bolsillos y se incubó durante
60 aproximadamente 1 hora adicional. La placa se lavó de nuevo y se desarrolló usando SureBlue TMB.

65 Después de añadir el sustrato SureBlue TMB, la HRP conjugada con el anticuerpo secundario procesa el sustrato de forma enzimática para proporcionar un producto de color azul. La reacción se observó y se monitorizó hasta que se decidió que la intensidad del color había alcanzado un nivel suficiente. (Si el color comienza a aparecer en los pocillos de control, que no contienen anticuerpo primario, entonces la reacción se detiene en este punto). La reacción se detiene mediante la adición de aproximadamente 50 ul de H₂SO₄ que destruye la actividad de la HRP.

También cambia el color del producto de reacción de azul a amarillo. A continuación esto se puede medir en un lector de placas a una Absorbancia de aproximadamente 450 nm.

5 Los resultados de los ELISA de unión se ilustran en un gráfico de líneas por referencia a la Fig. 8. Como se ilustra en la Fig. 8, el anticuerpo mAb 10827 fue capaz de unirse a las seis proteínas recombinantes EGF-CT-B purificadas con 6-His, lo que demuestra que, en cada formulación, el epítipo EGF-Met21-Ala30 se presenta en su conformación nativa y es accesible a componentes del sistema inmunitario.

10 Para confirmar que la proteína EGF-CT-B sintética recombinante incluía a expresiones del dominio de EGF y la secuencia de CT-B, se llevó a cabo un segundo ELISA de modo que, en lugar de adsorber la proteína recombinante directamente sobre las placas, la proteína recombinante era capturada en su lugar usando un anticuerpo anti-CT-B de conejo (Antibodies On-Line), como se muestra en la Fig 9. Dado que este anticuerpo de 'captura' es específico para CT-B nativa, el ensayo demuestra que los dominios de neutralización de EGF detectados son componentes de una proteína recombinante más grande que incluye un dominio de CT-B plegado de forma correcta.

15 Ejemplo III: Ensamblaje de multímero de proteína EGF-CT-B

20 Para examinar el efecto de la expresión de un dominio estructural que comprende un factor de crecimiento en los extremos terminales de la proteína recombinante derivada de CT-B en el ensamblaje de multímeros de subunidades monoméricas, las proteínas sintéticas del Ensayo 1 - Ensayo 6 se desarrollaron en un gel de SDS-PAGE en condiciones nativas (sin reducción, sin ebullición). Las proteínas EGF-CT-B recombinantes sintéticas a continuación se transfirieron sobre una membrana de nitrocelulosa mediante electro-transferencia, y se sometieron a ensayo usando un anticuerpo anti-CT-B de conejo (como se ha descrito anteriormente en el ejemplo II). La unión de un anticuerpo secundario anti-conejo marcado con HRP se detectó mediante la luz emitida usando el sustrato ECL sobre una película de autorradiografía. Como se ilustra en la Fig. 10, la transferencia de Western confirma la presencia de CT-B de alto peso molecular, lo que indica que las proteínas monoméricas EGF-CT-B sintéticas son capaces de ensamblarse en multímeros a través del dominio CT-B.

30 En un experimento separado, se incubaron muestras duplicadas de proteína CT-B nativa (sin ebullición o reducida) durante 5 minutos en un intervalo de diferentes valores de pH de 1,0 a 7,0. Después de la incubación, una de cada muestra duplicada se neutralizó de nuevo a pH 7,0 durante una hora. A continuación, todas las muestras se desarrollaron en un gel de SDS-PAGE, se llevó a cabo una transferencia de Western y se detectaron las proteínas con anticuerpo anti-CTB (Fig. 16). Esto demuestra que i) los pentámeros de CTB se pueden reducir a monómeros a un pH de 3,0 o inferior en 5 minutos, y ii) que el retorno a un pH neutro restaura la formación de pentámeros. Se ha demostrado previamente que se puede preparar una proteína quimérica que comprende una proteína CT-B fusionada a un sitio de unión de anticuerpo de camélido y etiquetas a través de un conector adecuado (peso molecular de ~ 16 kDa) para formar pentámeros funcionalmente activos (Li *et al.*, 2009 Molecular Immunology 46; 1718-1726).

40 Ejemplo IV: Proteínas EGF-CT-B sintéticas bivalentes

45 En una realización ilustrativa, se crearon dos proteínas EGF-CT-B sintéticas recombinantes adicionales, en las que i) un gen del EGF de longitud completa se expresa en los extremos tanto N- como C-terminales, separados del gen de CT-B por la secuencia de tres aminoácidos como se describió para el Ensayo 2 y el Ensayo 5 mencionados anteriormente, y se denomina 'E2', o ii) un EGF truncado que incluye el epítipo de neutralización Met21-Ala30 se expresa en ambos extremos del gen de CT-B como se mencionó anteriormente, y se denomina 'B2'. Ambas proteínas recombinantes se clonaron en el vector pIMS147 de expresión de *E. coli* como se describió anteriormente. Ambas proteínas EGF-CT-B recombinantes se expresaron y se purificaron como se describió anteriormente, y se sometieron a ensayo para la presencia del dominio de CT-B plegado correctamente y la presentación del epítipo de neutralización Met21-Ala30 de EGF en la conformación correcta. Los resultados se ilustran en un gráfico de líneas por referencia a la Fig. 11. Como se ilustra en la Fig. 11, ambas proteínas EGF-CT-B recombinantes E2 y B2 comprenden tanto un dominio de CT-B como al menos epítipo Met21-Ala30 de EGF funcionalmente correcto presentado de modo que pueda ser accesible para un anticuerpo.

55 El análisis adicional implicó el desarrollo de muestras de proteínas EGF-CT-B recombinantes E2 y B2 purificadas en geles de SDS-PAGE no desnaturalizantes a pH 7,0 sin ebullición previa de las muestras y su transferencia a membranas de nitrocelulosa mediante electro-transferencia. Las proteínas transferidas se detectaron usando el anticuerpo policlonal de conejo anti-CT-B AbOL (Antibodies On-Line) y un anticuerpo anti-conejo marcado con HRP. Como se ilustra en la Fig. 12, la transferencia de Western indica que las proteínas recombinantes que contienen el dominio de CT-B existen tanto como monómeros, y también se han formado en una serie de multímeros oligoméricos que comprenden dímeros, trímeros, tetrámeros y pentámeros.

Ejemplo V: Secuencia proteica de EGF-CT-B

65 En la Fig. 13 se ilustra un ejemplo de una secuencia de una proteína EGF-CT-B sintética. Como se ilustra en la Fig. 13, la secuencia de la muestra ilustra la secuencia de la proteína sintética que incluye dos secuencias de EGF de

longitud completa, que están subrayadas, y una secuencia de CT-B, que se presenta en letra cursiva.

Ejemplo VI: Secuencia proteica de EGF-CT-B

5 En la Fig. 14 se ilustra otro ejemplo de una secuencia de una proteína EGF-CT-B sintética recombinante. Como se ilustra en la Fig. 14, la secuencia de la muestra ilustra la secuencia proteica que incluye dos secuencias de dominio de neutralización de EGF, que están subrayadas, y una secuencia de CT-B, que se presenta en letra cursiva.

Ejemplo VII: Secuencia proteica de EGF-CT-B

10 Además, en la Fig. 15 se ilustra otro ejemplo de una secuencia de una proteína EGF-CT-B recombinante. Como se ilustra en la Fig. 15, la secuencia de la muestra ilustra la secuencia proteica que incluye secuencias parciales de la molécula de EGF que incluye el dominio de neutralización de EGF (Cys6 a Cys31), que está subrayado, y una secuencia de CT-B, que se presenta en letra cursiva.

15 Ejemplo VIII: Secuencias proteicas EGF-CT-B incluyendo conectores

En otras realizaciones ilustrativas, en el presente documento se desvelan proteínas EGF-CT-B recombinantes adicionales que incluyen uno o más conectores o espaciadores. Una o más de las realizaciones descritas anteriormente incluyen EGF fusionado a CT-B en uno o ambos extremos de CT-B de manera que un gen se encuentre directamente en el siguiente. Estas proteínas recombinantes o químicas resultantes incluían esencialmente EGF fusionado directamente a CT-B. En otras realizaciones ilustrativas, los componentes EGF y CT-B de la proteína química están separados eficazmente por 3 o 5 aminoácidos, que forman un espaciador o conector flexible entre los dos dominios. Los siguientes aminoácidos que se pueden usar como conectores incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: SSG, SSGGG, SGG, GSGGG, y GGGGS

La adición de los conectores puede reducir las interferencias, por ejemplo, del impedimento estérico, y ayudar en la formación de pentámeros por el dominio CT-B. Los conectores también permitieron introducir sitios de restricción únicos dentro de los conectores para permitir la posterior manipulación de las construcciones genéticas. En este ejemplo, se describen ocho construcciones (T1-T6, E2 y B2), con las secuencias enumeradas en la Tabla ilustrada en la Fig. 17. En una realización ilustrativa, los sitios de restricción incluyen, pero no se limitan a, los siguientes: XhoI, KpnI, BspEI y SpeI.

35 Se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western de las construcciones T1-T6, E2 y B2 y se describen a continuación en relación con la Fig. 18. Como se ilustra en la Fig. 18, parece que, en la transferencia de Western de las construcciones E2 y B2, hay alguna interferencia, por ejemplo, impedimento estérico y/u otra interferencia, que hizo que las proteínas producidas estuvieran compuestas por una variedad de oligómeros, por ejemplo, monómero, dímero, trímero, etc. Alternativamente, la concentración de proteína presente en las muestras puede tener influencias en la oligomerización, ya que es un factor dependiente de la pentamerización de la CTB nativa.

40 Las bandas más bajas corresponden a los monómeros, las siguientes a los dímeros, etc. Como B2 incluye EGF truncados, parece ser más pequeño que E2, lo que se ilustra por el hecho de que B2 está en una posición más baja en la transferencia de Western.

45 Un resultado similar se encuentra para las construcciones T1-T6, aunque los números y proporciones de los oligómeros varían de una construcción a otra. Inicialmente, parecía que las proteínas con EGF en el extremo N-terminal, incluyendo los conectores de aminoácidos, podrían dar una mayor proporción de pentámero. Sin embargo, posteriormente se encontró que la proporción de pentámero variaba de un lote a otro.

50 Dado que inicialmente se postuló que la fusión en uno u otro extremo favorece la pentamerización, se construyeron dos fusiones en tándem además de la construcción E2 y se ilustran en la Fig. 19. La primera fusión en tándem, denominada E2N, incluye dos EGF consecutivos en el extremo N-terminal de CT-B, en el que L-3 es SGG, L-4 es GSSG. La segunda fusión, denominada E2C, incluye dos EGF consecutivos en el extremo C-terminal de CT-B en el que L-3 es SSG, L-5 es GSGGG.

55 En una realización ilustrativa, las longitudes del conector de aminoácido en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal se extendieron para determinar si o no la longitud del conector de aminoácido en cada extremo proporciona solamente pentámero, o quizá que un extremo, el extremo N-terminal o el extremo C-terminal, proporciona solo una proporción de pentámero más elevada. Haciendo referencia a la Fig. 20, los conectores de aminoácido en el extremo N-terminal y en el extremo C-terminal se extendieron usando las construcciones T2/3 y T4/5, respectivamente. La ilustración (Fig. 20) se refiere a la fusión E2C c-terminal. En este ejemplo ilustrativo, L3 es SSG, L5 es SSGGG, L8 es SSGGGSGG y L10 es SSGGGGSGGG. En la versión N-terminal, los espaciadores de conector insertados tenían una longitud de aproximadamente 7 y 9 restos. En ese ejemplo, los 4 conectores podrían ser: L3 SGG, L5 GSGGG, L7 TSGGGSGG y L9 TSGGGGSGG. Cada uno de los espaciadores de conector se pueden insertar en cada uno de los conectores L3 y L5 más cortos. Como resultado, tanto la inserción de L7 en L5 como la de L9 en L3 proporcionan conectores de 12 restos, SIN EMBARGO podrían tener diferentes secuencias, denominadas 'a' y 'b' a continuación.

Los conectores N-terminales también se extendieron hasta 10, 12 y 14 aminoácidos, y los del extremo C-terminal se extendieron hasta 11, 13 y 15 aminoácidos, como se ilustra en la Fig. 20. En este ejemplo ilustrativo L10 es SSSGGSSGSSG, L12a es GSSGGTSSGGSSG, L12b es SGGTSSGGSSGG, y L14 es GSSGGTSSGGSSGG. Del mismo modo, L11 es SSSGGSSGSSG, L13a SSSGGSSGSSGG, L13b SSSGGSSGSSGG, y L15 SSSGGSSGSSGG.

Haciendo referencia a la Fig. 21, el análisis de transferencia de Western de las fusiones de EGF en tándem, E2N y E2C, en comparación con la construcción bivalente original con el E2 original demuestran que tanto E2 como E2C producen muchos oligómeros. E2N también produce oligómeros, sin embargo existe una fuerte indicación de que el primer dominio de EGF ya se está expresando como una proteína truncada, o se está escindiendo en alguna etapa durante la expresión/purificación.

También se llevó a cabo un análisis de transferencia de Western comparativo en las construcciones de "T" monovalentes con los conectores extendidos, y se ilustra en la Fig. 22. Cuando las extensiones de conector mencionadas anteriormente se introdujeron en las construcciones ya denominadas T2 y T3 (N-terminal, conectores de 3 y 5 aa respectivamente), los investigadores obtuvieron T2SL (conector extendido corto, es decir, L10), T2LL (conector largo, L12a) T3SL (conector corto L12b), y T3LL (conector largo L14). Del mismo modo, las construcciones T5 y T6 N-terminales se convierten en T5SL (con L11), T5LL (con L13a), T6SL (con L13b) y T6LL (con L15).

Cuando se insertan los espaciadores del conector, en realidad se pueden clonar en cualquiera de dos direcciones, dando secuencias bastante diferentes. Siempre que fue posible, se secuenciaron suficientes clones para encontrar uno con la inserción en la dirección deseada. En el caso de T3LL-Rev, los investigadores solo tenían inicialmente un clon con la longitud de conector deseada (es decir, 14 aa) pero con la inserción en la orientación 'incorrecta'. Sirve para ilustrar cómo las secuencias precisas de estos conectores no son necesariamente críticas, al menos en lo que respecta a la actuación como un espaciador físico. La secuencia del conector real de T3LL-Rev podría ser GSSGGTRPSTAATS. (subrayada = sección invertida).

Como se ilustra en la transferencia de Western ilustrada en la Fig. 22, N y R se refieren a proteína nativa y reducida/desnaturalizada, respectivamente. Los dos primeros carriles ilustran CT-B de tipo silvestre como un pentámero (nativo) y un monómero (reducido). Como se ilustra en los otros carriles, se puede observar que T3 (incluyendo el conector de 5 aminoácidos) produjo algunos oligómeros de varios tamaños; sin embargo, todas las construcciones del extremo N-terminal con conectores más largos producen principalmente pentámero cuando se desarrollan en condiciones nativas.

Por el contrario, como se ilustra en la Fig. 23, la transferencia de Western de las construcciones del extremo C-terminal produjo múltiples bandas en condiciones nativas incluso con conectores extendidos.

Basándose en estos datos, parece que la fusión N-terminal en tándem de EGF a CT-B es de interés significativo. Además, el primer conector (entre los dos dominios de EGF) se puede extender para intentar prevenir el truncamiento/proteólisis descrito anteriormente con la construcción E2N, y para permitir flexibilidad al introducir factores de crecimiento alternativos. La secuencia para la FUSIÓN N-terminal de EGF a CT-B con el primer conector extendido) es la y sigue a continuación:

HHHHHHIEGRNSDSECPLSHDGYCLHDGVC MYI
 EALDKYACNCVVG YIGERCQYRDLKWWELRGGSSG
 TSSGGSSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSY
 TESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQ
 KKAIERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHA
 IAAISMAN

Aunque las proteínas recombinantes homogéneas que expresan o incorporan epítopos del bucle B de EGF se han descrito e ilustrado en relación con ciertas realizaciones, muchas variaciones y modificaciones serán evidentes para las personas con experiencia en la materia y se pueden llevar a cabo sin apartarse del espíritu y ámbito de la divulgación.

Ejemplo IX: Proteína IGF1-EGF-CTB biespecífica (a).

Para establecer la viabilidad del direccionamiento a más de un factor de crecimiento con una proteína recombinante

5 sintética única, se sintetizó un gen que codifica el factor 1 de crecimiento de tipo insulínico humano (IGF1) que incluye regiones flanqueantes cortas para permitir la clonación en la construcción E2N que se describe en el ejemplo VIII. En resumen, el gen de EGF N-terminal se escindió del vector dirigiendo el ADN con las endonucleasas de restricción NcoI y XhoI. A continuación se reemplazó con el gen IGF1 humano digerido de manera similar usando métodos familiares para las personas con experiencia en la materia. El vector de ADN resultante se secuenció para confirmar que codificaba el gen recombinante requerido de tal manera que permitiera que la proteína recombinante se expresara como se había diseñado. La secuencia de la nueva proteína recombinante se ilustra en la Fig.24.

10 Posteriormente, la proteína generada por la expresión del vector mencionado anteriormente se analizó mediante ELISA para demostrar que ambos factores de crecimiento se pueden presentar simultáneamente a componentes (es decir, anticuerpos) del sistema inmunitario de los mamíferos. En resumen, los pocillos de una placa de ELISA se revistieron con una dilución apropiada de anticuerpo anti-CTB y a continuación se bloquearon con PBS que contenía leche en polvo al 2 % como se describió anteriormente. Se aplicaron muestras de la proteína recombinante a la placa y se incubaron durante 1 hora a temperatura ambiente. Después del lavado, diferentes pocillos preparados como se ha descrito se incubaron con 1/1000 (o de acuerdo con las recomendaciones del proveedor) de i) anticuerpo AbOL 10827 anti-EGF de ratón o ii) anticuerpo IGF1 2o anti-humano de conejo. Después del lavado, los pocillos se incubaron con una dilución apropiada de i) anticuerpo anti-ratón marcado con HRP o ii) anticuerpo anti-conejo marcado con HRP y a continuación se desarrollaron como se ha descrito previamente. Como se ilustra en la Fig. 25, las señales generadas confirmaron que tanto IGF como EGF se presentan en sus configuraciones nativas. La señal generada por el anticuerpo anti-IGF también confirma que las secuencias de IGF, EGF y CTB están presentes en la misma molécula debido a las posiciones relativas de las secuencias de ADN codificantes en el vector de expresión.

25 Ejemplo X: Proteína IGF1-EGF-CTB biespecífica (b).

30 Para demostrar que usando la característica natural de CTB se pueden generar proteínas recombinantes biespecíficas para formar oligómeros, el gen de IGF descrito en el ejemplo IX se modificó mediante PCR usando técnicas familiares para las personas con experiencia en la materia para permitir su clonación en la construcción T5, reemplazando el gen de EGF. La proteína recombinante resultante incluía secuencias de IGF C-terminales para secuencias de CTB, y separadas por un conector de 3 aminoácidos (Fig. 26).

35 Las muestras de la proteína recombinante mencionada anteriormente se combinaron por separado con cantidades iguales (molares) de i) proteína T2 y ii) proteína T5. Cada una de las mezclas se ajustó a pH 3,0 mediante la adición de Tris-HCl 10 mM tamponado según fuera necesario y se incubó a 4 °C durante 15 min para disociar cualquier oligómero presente. A continuación, las mezclas de proteínas se neutralizaron y la incubación continuó durante 60 minutos para estimular la oligomerización. Para detectar la presencia de hetero-oligómeros, los pocillos de una placa de ELISA se revistieron con anticuerpo anti-EGF de ratón o anticuerpo anti-IGF de conejo y se bloquearon. Después del lavado, la mezcla de IGF-CTB/T2 y la mezcla de IGF-CTB/T5 se aplicaron por separado a los pocillos revestidos con anticuerpo anti-EGF o con anticuerpo anti-IGF, y se incubaron durante 60 minutos a temperatura ambiente.

40 Después del lavado, el anticuerpo específico del factor de crecimiento no dirigido por el anticuerpo de revestimiento se añadió y se incubó durante 60 minutos. Por lo tanto, el anticuerpo anti-IGF de conejo se aplicó a los pocillos revestidos con anticuerpo anti-EGF de ratón y viceversa. Después de lavar para eliminar el anticuerpo 2o no unido, se aplicó el anticuerpo anti-ratón marcado con HRP o anti-conejo marcado con HRP según fuera apropiado para dirigirse al anticuerpo 2o. Los resultados se ilustran en la Fig. 27 y demuestran que el anticuerpo de revestimiento anti-EGF puede capturar e inmovilizar proteínas que contienen secuencias de IGF. De manera similar, el anticuerpo anti-IGF puede capturar e inmovilizar proteínas que incluyen secuencias de EGF. En ambos casos, esto está causado por la oligomerización de monómeros que contienen IGF y EGF de manera que ambos están presentes. Además, los hetero-oligómeros se pueden formar cuando ambos factores de crecimiento están ubicados en extremos opuestos del componente CTB (es decir, IGF-CTB y T2) y cuando ambos factores de crecimiento están en el mismo (C) extremo (es decir, IGF-CTB y T5). El ensayo también funciona en cualquier orientación.

Ejemplo XI: Presentación de factores de crecimiento diversos

55 Con el fin de demostrar aún más la flexibilidad de la presente invención, se generó un panel de proteínas recombinantes que incluía una secuencia derivada de CTB junto con una secuencia adicional derivada de uno o más de un rango de factores de crecimiento y que representa un rango de dominios de tamaño variable de acuerdo con la Figura 28 usando técnicas convencionales familiares para las personas con experiencia en la materia. Las muestras de cada una de las proteínas se prepararon mediante la expresión de la construcción genética en *E. coli* y se purificaron usando IMAC mediante la etiqueta N-terminal de hexa-histidina para cada proteína. Las proteínas recombinantes purificadas se sometieron a ensayo mediante ELISA para demostrar que cada una de las diferentes secuencias estaba presente y que se presentaba correctamente usando anticuerpos específicos para cada secuencia (Figura 29). Se desarrolló una proteína nativa con muestras de la proteína recombinante que incluían secuencias derivadas de mTGF B1 y CTB y se preparó una transferencia de Western (Figura 30). La proteína se detectó con el anticuerpo α -CTB y mostró que, en las condiciones usadas, la proteína quimérica recombinante era capaz de formar pentámeros estables, conservando esta característica de CTB.

Ejemplo XII: Presentación del receptor del factor de crecimiento

Para demostrar que la tecnología que se describe en la presente divulgación se puede aplicar a la presentación funcional de proteínas distintas a los factores de crecimiento, se generaron proteínas recombinantes incluyendo secuencias derivadas de receptores de factor de crecimiento y CTB, y se mostró que presentaban tales secuencias en una conformación natural en conjunto con secuencias de CTB. El ADN que codifica la secuencia proteica del TGF-beta humano se clonó cadena arriba del gen de CTB reemplazando el ADN que codifica EGF Del clon T3LL usando técnicas convencionales familiares para las personas con experiencia en la materia. Esta construcción se usó para generar una proteína recombinante incluyendo secuencias tanto de TGF-beta humano como de CTB (Figura 31a). Del mismo modo, se generó una segunda proteína recombinante que incluía secuencias del dominio de unión a ligando extracelular del receptor 2 Beta de TGF humano y CTB (Figura 31b).

La presentación simultánea de secuencias tanto de TGF-Beta R2 como de CTB en una proteína recombinante única se estableció mediante ELISA de captura. En resumen, los pocillos de una placa de ELISA se revistieron con i) anticuerpo anti-CTB de ratón o ii) anticuerpo anti-TGF Beta R2 de cabra y se bloquearon con PBS que contenía leche en polvo. Las muestras de la proteína recombinante de acuerdo con la Figura 31b se pusieron a continuación en contacto con los pocillos y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Después del lavado, los pocillos se pusieron en contacto con i) anticuerpo anti-TGF Beta R2 de cabra o ii) anticuerpo anti-CTB de ratón respectivamente y se incubaron durante 1 hora. Después del lavado, los pocillos se pusieron en contacto con i) anticuerpo anti-oveja (cabra) marcado con HRP y ii) anticuerpo anti-ratón marcado con HRP respectivamente y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. La placa se desarrolló con sustrato TMB y la intensidad del color se midió a 450 nm. El ensayo demostró que las secuencias tanto de TGF-beta R2 como de CTB estaban presentes en la misma proteína recombinante quimérica (Figura 32).

Con el fin de demostrar que tanto TGF-Betal como TGF Beta R2 estaban presentes por separado con secuencias de CTB en una configuración nativa, la interacción entre TGF betal y su receptor natural se determinó mediante ELISA. En resumen, los pocillos de una placa de ELISA se revistieron con anticuerpo anti-CTB de ratón como se bloquean. A continuación los pocillos se ponen en contacto con la proteína recombinante que contiene secuencias de TGF-beta humano y CTB como se describe en la Figura 31a y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Después del lavado, los pocillos se pusieron en contacto con la proteína recombinante que contenía secuencias de TGF-betaR2 humano y CTB como se describe en la Figura 31b y se incubaron durante aproximadamente 1 hora. Los pocillos se lavaron y a continuación se pusieron en contacto con anticuerpo anti-TGF Beta R2 de cabra durante 1 hora. Por último, los pocillos se lavaron y se pusieron en contacto con anticuerpo anti-oveja (cabra) marcado con HRP durante aproximadamente 1 hora. La placa se desarrolló con sustrato TMB Y se hizo su lectura a 450 nm. La Figura 33 ilustra que las dos proteínas recombinantes son capaces de reproducir la interacción de unión receptor-ligando natural, y que esto no se ve alterado por el anticuerpo anti-receptor usado en el ensayo.

Ejemplo XIII: Respuestas inmunitarias de ratones a formulaciones de proteína recombinante

En otros grupos de experimentación, los ratones se inmunizaron con proteínas recombinantes que incluyen secuencias de CTB y uno o más factores de crecimiento de acuerdo con la presente divulgación con el fin de evaluar los efectos de diversas formulaciones en las respuestas inmunitarias de dichos ratones. Seis grupos de ratones, cada uno comprendiendo seis ratones, se inmunizaron con una formulación de proteína recombinante diferente de acuerdo con la programación que se describe a continuación.

A menos que se indique de otro modo, los ratones inmunizaron con 25 µg de proteína recombinante en 75 µl de tampón, emulsionado en 75 µl del adyuvante Montanide. Los inmunógenos se administraron mediante inyección i.m. el día 0 y el día 14. Se tomaron muestras de suero el día 0 (antes de la inmunización) y el día 28 y se analizaron para la presencia de anticuerpos IgG contra las secuencias del factor de crecimiento contenido dentro de la proteína recombinante de inmunización. Los grupos de ratones se inmunizaron con los siguientes antígenos:

Grupo 1: SB1, 75 µl (25 µg) de proteína recombinante que incluye secuencias de IGF humano y CTB de acuerdo con la Figura 26 emulsionado con 75 µl de Montanide;

Grupo 2: SB2, 75 µl (25 µg) de proteína recombinante que incluye secuencias de EGF humano y CTB como se describe en el ejemplo VIII y denominado T3LL, emulsionado con 75 µl de Montanide;

Grupo 3: SB3, 75 µl (25 µg) de proteína recombinante que incluye secuencias de IGF humano, EGF humano y CTB de acuerdo con la Figura 24 y como se describe en el ejemplo IX, emulsionado con 75 µl de Montanide;

Grupo 4: SB4, 37,5 µl (12,5 µg) de SB1 y 37,5 µl (12,5 µg) de SB2 combinados con el método como se describe en el ejemplo X y que incluye oligómeros que contienen tanto IGF-CTB como EGF-CTB, emulsionado con 75 µl de Montanide;

Grupo 5: SB5, 75 µl (25 µg) de SB1, al igual que para el Grupo 1, excepto porque se emulsiona con 20 µl de adyuvante Matrix-M; y

Grupo 6: SB6, 37,5 µl (12,5 µg) de SB1 emulsionado con 37,5 µl de Montanide, seguido después de 5 minutos por 37,5 µl (12,5 µg) de SB2 emulsionado con 37,5 µl de Montanide y administrado a través de una ubicación diferente.

Inmediatamente antes, y 14 días después de la inmunización, se tomaron muestras de sangre y el suero se analizó mediante ELISA para determinar la presencia y títulos relativos de anticuerpos IgG contra el componente del factor de crecimiento de los antígenos inmunizantes de proteína recombinante. Las placas de ELISA se revistieron con IGF o EGF humano recombinante disponible en el mercado a una concentración de 1 µg/ml. Después de bloquear y lavar, el suero de los ratones objeto se aplicó a diversas diluciones a los pocillos y se incubó durante 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo no unido y otras proteínas se eliminaron mediante lavado y la IgG de ratón unida se detectó con anticuerpo anti-ratón marcado con HRP.

Los seis grupos incluían animales que producían una respuesta inmunitaria específica para el componente del factor de crecimiento de las proteínas quiméricas recombinantes inmunogénicas. Es evidente que se observan respuestas más fuertes al EGF que para el IGF en todo momento, incluyendo los grupos en los que se incluyeron secuencias de un solo factor de crecimiento (Grupos 1 y 2, Figs. 34 y 35). Sin quedar ligado a ninguna teoría en particular, esto es probablemente un reflejo de los grados de homología entre las proteínas de ratón y humanas, por lo que los EGF difieren en 15/53 restos y los IGF solo difieren en 4 de 70 restos. También es notable que las diferencias entre las respuestas de animales individuales dentro de un grupo a menudo sean mayores que las diferencias entre grupos al mismo antígeno.

El uso de Matrix-M en lugar de Montanide como adyuvante (Grupo 5 en comparación con el Grupo 1, Figs. 40 y 34) dio como resultado una respuesta más pobre, con uno de los ratones que no respondió en absoluto, y otras cuatro muestras que necesitaban ser examinadas en concentraciones mucho más altas que con Montanide.

Los Grupos 3, 4 y 6 recibieron proteínas que incluían secuencias tanto de EGF como de IGF, siendo la diferencia la formulación o la administración. Los ratones del Grupo 3, que recibieron proteína recombinante que incluía secuencias de EGF e IGF en cada molécula de proteína, respondieron todos a EGF, aunque dos de los seis no mostraron una respuesta α-IGF (Figs. 36 y 37). Todos los ratones de los Grupos 4 y 6 también generaron anticuerpos contra EGF (Figs. 38, 39 y 41). En el Grupo 4, un animal no respondió al IGF y otro dio solo una respuesta muy débil. Solo en el Grupo 6, en el que las proteínas que contienen EGF e IGF se administraron por separado y en diferentes ubicaciones, los 6 animales presentaron una respuesta al IGF.

Ejemplo XIV: Purificación genérica en una sola etapa

Se desea un proceso de purificación en una sola etapa simple que se pueda aplicar a todas y cada una de las proteínas recombinantes inmunogénicas detalladas en la presente divulgación. Idealmente, la purificación no requerirá la inclusión de una etiqueta de afinidad como hexahistidina, MBP, FLAG, etc. Las proteínas recombinantes de la presente divulgación están relacionadas porque todas incluyen al menos alguna secuencia derivada de la subunidad CT-B de la toxina de *Vibrio cholera*, o un equivalente funcional sintético. Se prevé que la purificación se pueda conseguir mediante el uso de anticuerpos monoclonales o policlonales, sin embargo, los anticuerpos monoclonales tienen un coste de producción elevado. Los anticuerpos policlonales tienen un coste menos elevado, sin embargo, es probable que se vean variaciones en el rendimiento entre lotes del mismo animal y entre animales individuales. La purificación por inmunoafinidad también requiere condiciones severas, como pH bajo, para eluir la proteína diana que puede influir de forma adversa en la proteína diana, y limitará la reutilización de la matriz de afinidad. También implica la introducción de proteínas adicionales en el proceso de producción, que preferentemente se evita.

En la holotoxina CT nativa, la toxina se une al mono-gangliósido Gml (Figura 42) encontrado en la superficie de la mayoría de las células de mamífero, incluyendo las células epiteliales del tracto respiratorio y del intestino. La unión se lleva a cabo mediante la subunidad CT-B, y solo los oligómeros de CT-B se unen a Gml. Por lo tanto se prevé que la CTB inmovilizada sobre un soporte adecuado se pueda usar para la purificación de las proteínas recombinantes inmunogénicas de la presente divulgación. Sin embargo no se cree que el uso de CTB sea un método preferente por varias razones, en particular porque CTB solo está disponible en el mercado como un material purificado a partir de cerebro bovino. El uso de material animal, y el uso de tejido de cerebro bovino en particular no es adecuado para su uso en la producción de productos terapéuticos.

Se sabe que la unión de CTB a Gml implica un resto de galactosa terminal en la glico-molécula ramificada Gml que se une a dos subunidades de CTB adyacentes. Por lo tanto se prevé que la galactosa inmovilizada sobre un soporte sólido pueda proporcionar un medio genérico para purificar las proteínas recombinantes de la presente divulgación. Para evaluar la aplicabilidad de este enfoque, el gen que codifica CTB se clonó en un vector de expresión de proteína bacteriana diseñado para recuperación de proteína periplásmica usando técnicas familiares para las personas con experiencia en la materia, y se transforma en diversas cepas de bacterias de *E. coli*. La resina de galactosa-Sepharose (Figura 43) se obtuvo en Pierce (N.º de Cat. 20372 de Pierce). Se desarrollaron cultivos de cincuenta mililitros de los clones de expresión de CTB en las cepas XL1-Blue, BL21 y TG1 de *E. coli* y se indujeron para expresar CTB recombinante durante la noche a 37 °C. Las células se recogieron mediante centrifugación y los medios aclarados se retuvieron para la extracción de CTB. Los contenidos periplásmicos de los sedimentos celulares se liberaron mediante choque osmótico usando métodos convencionales familiares para las personas con experiencia en la materia proporcionando 10 ml por cultivo.

La resina de galactosa Sepharose se lavó con NaCl 200 mM, Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM a pH 7,5 (tampón TEN) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. NaCl, Tris-HCl a pH 7,5 y EDTA se añadieron a los medios acondicionados y las fracciones periplásmicas hasta una concentración final de NaCl 200 mM, Tris-HCl 50 mM y EDTA 5 mM. A cada medio acondicionado se añadieron 0,5 ml de galactosa Sepharose y fracción periplásmica, y se incubó con agitación a 4 °C durante 2-3 h. La resina se recuperó en columnas BioRad y se lavó con 30 volúmenes de lecho de tampón TEN enfriado con hielo. La proteína unida se eluyó mediante la resuspensión de la resina en 0,5 ml de galactosa 1 M en PBS e incubando durante 10 min. La columna se drenó y el eluato se retuvo para análisis. La etapa de elución se repitió varias veces, y las fracciones se analizaron para la presencia de CTB. Casi toda la proteína CTB expresada se encontró en el medio de cultivo. Las muestras de los medios acondicionados antes de la purificación y fracción periplásmica, junto con eluatos de la columna combinados que contenían CTB purificada (de los medios) se analizaron mediante SDS-PAGE y se compararon con CTB marcada con His y se purificó mediante IMAC (Figura 44). Se puede observar la obtención de CTB altamente purificada a partir de los sobrenadantes de cultivo de las tres cepas, con las células XL1-Blue dando los rendimientos más elevados (Carriles 4, 7 y 10). La pureza se compara bien con la observada a partir de la purificación por IMAC (Carril 11), e incluye una cantidad significativa de proteína pentamérica.

Realizaciones adicionales

En otra realización ilustrativa, en el presente documento se desvela una vacuna formada por una proteína recombinante homogénea para mejorar la presentación de, y el aumento del número de epítopos de antígeno tumoral, como elementos de una proteína recombinante inmunogénica sintética. En una realización ilustrativa, en el presente documento se describe una vacuna formada a partir de una proteína recombinante que expresa toda o partes de una secuencia polipeptídica y un antígeno tumoral.

En una realización ilustrativa, las proteínas recombinantes que se desvelan en el presente documento pueden incluir o expresar una proporción elevada de una secuencia proteica derivada de antígenos tumorales y/o epítopos de los mismos, como una función del peso molecular total. Estos epítopos de antígeno tumoral pueden ser múltiples copias de todo o parte de un antígeno tumoral único, o copias de todo o parte de más de un antígeno tumoral diferente.

En una realización ilustrativa, la proteína recombinante es una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una toxina B del cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* o un equivalente sintético, y que expresa una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo.

En una realización ilustrativa, la secuencia del antígeno tumoral puede incluir una secuencia de un antígeno específico de próstata (PSA) o parte del mismo. En otras realizaciones ilustrativas, el antígeno tumoral puede incluir una longitud completa o parte del mismo de uno o más de los siguientes antígenos tumorales, incluyendo, pero sin limitarse a, PSA, y otros antígenos tumorales.

En otra realización ilustrativa, en el presente documento se desvela una proteína formada por una proteína recombinante homogénea para mejorar la presentación de, y el aumento del número de sitios de unión a receptor como elementos de una proteína recombinante inmunogénica. En una realización ilustrativa, en el presente documento se describe una proteína recombinante que expresa toda o partes de una secuencia polipeptídica y un receptor.

En una realización ilustrativa, las proteínas recombinantes que se desvelan en el presente documento pueden incluir o expresar una proporción elevada de una secuencia proteica derivada de receptores y/o sitios de unión de los mismos, como una función del peso molecular total. Estos sitios de unión pueden ser múltiples copias de todo o parte de un receptor único, o copias de todo o parte de más de un receptor diferente.

En una realización ilustrativa, la proteína recombinante es una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una toxina B del cólera (CT-B) de *Vibrio cholera* o un equivalente sintético, y que expresa una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo.

En una realización ilustrativa, la secuencia del receptor puede incluir una secuencia de un receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her2) o parte del mismo y/o un receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her3) o parte del mismo. En otras realizaciones ilustrativas, el receptor puede incluir una longitud completa o parte del mismo de uno o más de los siguientes receptores, incluyendo, pero sin limitarse a, Her2, Her3, y otros receptores.

En otras realizaciones ilustrativas, la proteína recombinante es una molécula proteica inmunogénica que expresa una o más secuencias que se pliegan en una estructura física, por ejemplo, que expresa una o más secuencias de una CT-B o una variante modificada sintética, y que expresa diversas combinaciones de una o más secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo, una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o

partes del mismo, y una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo.

En una realización ilustrativa, la proteína recombinante incluye expresiones o secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo y una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo. En una realización, la proteína recombinante incluye una o más secuencias de una CT-B o una variante modificada sintética, un PSA o parte del mismo, y un IGF-1 o parte del mismo.

En otra realización ilustrativa, la proteína recombinante incluye expresiones o secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo y una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo. En una realización, la proteína recombinante incluye una o más secuencias de una CT-B o una variante modificada sintética, un Her2 o parte del mismo, y un IGF-1 o parte del mismo. En otra realización, la proteína recombinante incluye una o más secuencias de una CT-B o una variante modificada sintética, un Her2 o parte del mismo, un Her2 o parte del mismo, y un PDGF o parte del mismo.

En otra realización ilustrativa, la proteína recombinante incluye expresiones o secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo y una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo.

Además en otra realización ilustrativa, la proteína recombinante incluye expresiones o secuencias de uno o más factores de crecimiento o partes del mismo, una o más secuencias de uno o más antígenos tumorales o partes del mismo, y una o más secuencias de uno o más receptores o partes del mismo.

En cualquiera de las realizaciones que se han descrito anteriormente, además de expresar una o más copias de un solo antígeno tumoral, receptor, y/o factor de crecimiento, presentado como un solo antígeno tumoral, receptor, y/o factor de crecimiento o parte del mismo por sitio físico, y/o como cadenas de secuencias repetitivas de antígeno tumoral, receptor, y/o factor de crecimiento (por ejemplo, $n = 1$ a 10) las proteínas recombinantes de acuerdo con la divulgación también pueden incluir expresiones de uno o más dominios de neutralización o sitios de unión de dos o más antígenos tumorales, receptores, y/o factores de crecimiento diferentes presentes como únicos o como cadenas en diferentes posiciones dentro de las secuencias de las proteínas recombinantes. Por ejemplo, las proteínas recombinantes pueden incluir expresiones o secuencias de una longitud completa o una parte de dos a cuatro antígenos tumorales, receptores, y/o factores de crecimiento diferentes, y/o una longitud completa o una parte de uno o más antígenos tumorales, receptores, y/o factores de crecimiento como epítomos o sitios de unión únicos o como dos o más repeticiones en tándem.

Las proteínas resultantes son polipéptidos individuales que expresan un antígeno tumoral, receptor y/o factor de crecimiento o uno o más epítomos o sitios de unión de los mismos dentro de la secuencia de las proteínas recombinantes. En una realización ilustrativa, las secuencias de las proteínas recombinantes expresan una o más partes de una secuencia de CT-B y presentan la expresión del antígeno, receptor y/o factor de crecimiento tumoral incluyendo al menos una o más expresiones de epítomos o sitios de unión de los mismos sobre una superficie de las proteínas recombinantes inmunogénicas en una conformación natural.

De acuerdo con la divulgación, las expresiones de los epítomos de antígeno tumoral, sitios de unión a receptor y/o epítomos del factor de crecimiento se deberían plegar permitiendo que su conformación natural se mantuviera sustancialmente y se presentara a los componentes del sistema inmunitario del hospedador de un modo tal que provocara una sólida respuesta inmunitaria del hospedador. Los ejemplos de modelos de proteínas naturales adecuados incluyen, pero no se limitan a, subunidad B de la toxina del cólera, listeria, toxoide del tétano, toxoide de difteria, proteína de cubierta de bacteriófago, adenovirus y otras proteínas de cubierta viral. Alternativamente, se pueden usar polipéptidos "sintéticos" no naturales que cumplan los requisitos de conferir inmunogenicidad a la proteína completa y permitir la presentación apropiada de epítomos de antígenos tumorales, sitios de unión a receptores y/o epítomos de factores de crecimiento al sistema inmunitario del hospedador.

Adyuvante

Ciertas realizaciones ilustrativas como se proporcionan en el presente documento incluyen proteínas recombinantes de acuerdo con la divulgación dentro de composiciones de vacuna y composiciones de adyuvantes inmunológicos, incluyendo composiciones farmacéuticas, que contienen, además de proteínas recombinantes, al menos un adyuvante, que se refiere a un componente de tales composiciones que tiene actividad adyuvante. Un adyuvante que tiene tal actividad adyuvante incluye una composición que, cuando se administra a un sujeto tal como un ser humano (por ejemplo, un paciente humano), un primate no humano, un mamífero u otro organismo eucariota superior que tiene un sistema inmunitario reconocido, es capaz de alterar (es decir, aumentar o disminuir de una manera estadísticamente significativa, y en ciertas realizaciones preferentes, potenciar o aumentar) la potencia y/o longevidad de una respuesta inmunitaria. En ciertas realizaciones ilustrativas desveladas en el presente documento, un antígeno y/o antígenos deseados contenidos dentro de una proteína vehículo, y opcionalmente uno o más adyuvantes, pueden alterar de ese modo, por ejemplo, provocar o mejorar, una respuesta inmunitaria que se dirige contra el antígeno y/o antígenos deseados que se pueden administrar al mismo tiempo o se pueden separar en el tiempo y/o en el espacio (por ejemplo, en un sitio anatómico diferente) en su administración, pero no se pretende que ciertas realizaciones ilustrativas estén tan limitadas, y por lo tanto también se contempla la administración de

proteína recombinante en un composición que no incluye un antígeno específico pero que también puede incluir, pero no se limita a, uno o más coadyuvantes, un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina.

En consecuencia, y como se ha indicado anteriormente, los adyuvantes incluyen composiciones que tienen efectos adyuvantes, tales como saponinas y miméticos de saponina, incluyendo los miméticos QS21 y QS21 (véanse, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.057.540; documento EP 0 362 279 B1; documento WO 95/17210), alumbre, alcaloides vegetales tales como tomatina, detergentes tales como (pero no limitados a) saponina, polisorbato 80, Span 85 y estearil tirosina, una o más citoquinas (por ejemplo, GM-CSF, IL-2, IL-7, IL-12, TNF-alfa, IFN-gamma), un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina, y un modificador inmunitario de tallo y bucle doble (dSLIM, por ejemplo, Weeratna *et al.*, 2005 Vaccine 23: 5263).

Los detergentes que incluyen saponinas se enseñan en, por ejemplo, documento de Patente de Estados Unidos N.º 6.544.518; Lacaille-Dubois, M y Wagner H. (1996 Phytomedicine 2: 363-386), documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.057.540, Kensil, Crit. Rev Ther Drug Carrier Syst, 1996, 12 (1-2): 1-55, y el documento EP 0 362 279 B1. Las estructuras de partículas, denominadas complejos estimulantes inmunitarios (ISCOMS), que comprenden fracciones de Quil A (saponina) son hemolíticas y se han usado en la fabricación de vacunas (Morein, B., documento EP 0 109 942 B1). Se ha informado que estas estructuras tienen actividad adyuvante (documento EP 0 109 942 B1; documento WO 96/11711). Las saponinas hemolíticas QS21 y QS17 (fracciones de Quil A purificadas por HPLC) se han descrito como adyuvantes sistémicos potentes, y el método de su producción se desvela en el documento de Patente de Estados Unidos N.º 5.057.540 y en el documento EP 0 362 279 B1. En estas referencias también se describe el uso de QS7 (una fracción no hemolítica de QuilA) que actúa como un adyuvante potente para vacunas sistémicas. El uso de QS21 se describe además en Kensil *et al.* (1991. J. Immunology 146: 431-437). También se conocen combinaciones de QS21 y polisorbato o ciclodextrina (documento WO 99/10008). Los sistemas adyuvantes de partículas que comprende fracciones de QuilA, tales como QS21 y QS7 se describen en el documento WO 96/33739 y en el documento WO 96/11711. Otras saponinas que se han usado en estudios de vacunación sistémica incluyen las derivadas de otras especies vegetales tales como Gypsophila y Saponaria (Bomford *et al.*, Vaccine, 10 (9): 572-577, 1992).

La escina es otro detergente relacionado con las saponinas para su uso en las composiciones de adyuvante de las realizaciones que se desvelan en el presente documento. La escina se describe en el índice Merck (12.sup.th Ed.: entrada 3737) como una mezcla de saponina que se producen en la semilla del castaño de Indias, *Aesculus hippocastanum*. Su aislamiento se describe mediante cromatografía y purificación (Fiedler, Arzneimittel-Forsch. 4, 213 (1953)), y mediante resinas de intercambio iónico (Erbring *et al.*, documento de Patente de Estados Unidos N.º 3.238.190). Las fracciones de escina (también conocida como aescina) se han purificado y se muestra que son biológicamente activas (Yoshikawa M, *et al.* (Chem Pharm Bull (Tokio) agosto de 1996; 44 (8): 1454-1464)). La digitonina es otro detergente, que también se describe en el índice Merck (12ª Ed., entrada 3204) como una saponina, que se deriva de las semillas de *Digitalis purpurea* y se purifica de acuerdo con el procedimiento descrito por Gisvold *et al.*, J. Am. Pharm. Assoc, 1934, 23, 664; y Rubenstroth-Bauer, Physiol. Chem., 1955, 301, 621.

Otros adyuvantes o coadyuvantes para su uso de acuerdo con ciertas realizaciones que se desvelan en el presente documento incluyen un copolímero de bloques o polímero biodegradable, que se refiere a una clase de compuestos poliméricos con los que estarán familiarizados las personas con experiencia en la materia. Los ejemplos de un copolímero de bloques o polímero biodegradable que se puede incluir en una composición de vacuna o un adyuvante inmunológico incluyen Pluronic.RTM. L121 (BASF Corp., Mount Olive, N.J.; véase, por ejemplo, Yeh *et al.*, 1996 Pharm. Res. 13: 1693).

Ciertas realizaciones ilustrativas adicionales contemplan adyuvantes inmunológicos que incluyen, pero no se limitan a, un aceite, que en algunas de tales realizaciones puede contribuir a la actividad coadyuvante y en otras de tales realizaciones puede proporcionar además o alternativamente un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Se conoce cualquier número de aceites adecuados y se pueden seleccionar para su inclusión en composiciones de vacuna y composiciones de adyuvantes inmunológicos basándose en la presente divulgación. Los ejemplos de tales aceites, a modo de ilustración y no de limitación, incluyen escualeno, escualano, aceite mineral, aceite de oliva, colesterol y un monooleato de manida.

En la técnica se conocen modificadores de la respuesta inmunitaria tales como modificadores de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina también y en ciertas realizaciones que se desvelan en la actualidad también se pueden incluir como adyuvantes o coadyuvantes.

Como también se indicó anteriormente, un tipo de adyuvante o coadyuvante para uso en una composición de vacuna de acuerdo con la divulgación como se describe en el presente documento pueden ser los coadyuvantes de aluminio, que generalmente se denominan "alumbre". Los coadyuvantes de alumbre se basan en los siguientes: oxihidróxido de aluminio; hidroxifosfato de aluminio; o diversas sales patentadas. Los coadyuvantes de alumbre son ventajosos porque tienen un buen historial de seguridad, aumentan las respuestas de los anticuerpos, estabilizan los antígenos y son relativamente simples para la producción a gran escala (Edelman 2002 Mol. Biotechnol. 21: 129-148; Edelman, R. 1980 Rev. Infect. Dis. 2: 370-383).

Composiciones farmacéuticas

- 5 En ciertas realizaciones ilustrativas, la composición farmacéutica es una composición de vacuna que comprende tanto la proteína recombinante de acuerdo con la divulgación y además también puede comprender uno o más componentes, como se proporciona en el presente documento, que se seleccionan entre agonista de TLR, coadyuvante (que incluye, por ejemplo, un citoquina, un modificador de la respuesta inmunitaria de imidazoquinolina y/o un dSLIM) y similares y/o una construcción de expresión recombinante, en combinación con un vehículo, excipiente o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 10 Los vehículos ilustrativos no serán tóxicos para los receptores en las dosificaciones y concentraciones empleadas. Para las vacunas que comprenden proteína recombinante, se administrarán de aproximadamente 0,01 .mu.g/kg a aproximadamente 100 mg/kg de peso corporal, por lo general mediante las vías intradérmica, subcutánea, intramuscular o intravenosa, o mediante cualquier otra vía.
- 15 Para las personas con experiencia en la materia será evidente que el número y la frecuencia de administración dependerán de la respuesta del hospedador. Los "vehículos farmacéuticamente aceptables" para uso terapéutico se conocen bien en la técnica farmacéutica y se describen, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. (A. R. Gennaro edit. 1985). Por ejemplo, se puede usar solución salina estéril y solución salina tamponada con fosfato a pH fisiológico. En la composición farmacéutica se pueden proporcionar conservantes, estabilizantes, colorantes e incluso agentes aromatizantes. Por ejemplo, como conservantes se pueden añadir benzoato de sodio, ácido ascórbico y ésteres de ácido p-hidroxibenzoico. Además, se pueden usar antioxidantes y agentes de suspensión.
- 20 Las composiciones farmacéuticas pueden estar en cualquier forma que permita que la composición se administre a un paciente. Por ejemplo, la composición puede estar en forma de sólido, líquido o gas (aerosol). Las vías de administración habituales incluyen, pero no se limitan a, oral, tópica, parenteral (por ejemplo, por vía sublingual o bucal), sublingual, rectal, vaginal e intranasal (por ejemplo, como una pulverización). El término parenteral, como se usa en el presente documento, incluye la administración con microaguja, sonoforética iontoforética, pasiva transdérmica y también inyecciones subcutáneas, intravenosa, intramuscular, intraesternal, intracavernosa, intratecal, intrameatal, intrauretral o técnicas de infusión. En una realización particular, una composición, como se describe en el presente documento (incluyendo vacunas y composiciones farmacéuticas), se administra por vía intradérmica mediante una técnica seleccionada entre iontoforesis, microcavitación, sonoforesis o microagujas.
- 25 La composición farmacéutica se formula para permitir que los principios activos contenidos en la misma estén biodisponibles después de la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un paciente toman la forma de una o más unidades de dosificación, en las que, por ejemplo, un comprimido puede ser una sola unidad de dosificación, y un recipiente de uno o más compuestos de la invención en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación.
- 30 Para la administración oral, puede estar presente un excipiente y/o aglutinante. Los ejemplos son sacarosa, caolín, glicerina, dextrinas de almidón, alginato sódico, carboximetilcelulosa y etilcelulosa. Pueden estar presentes agentes colorantes y/o aromatizantes. Se puede emplear una cubierta de revestimiento.
- 35 La composición puede estar en forma de líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para administración mediante inyección, como dos ejemplos. Cuando están destinadas a la administración oral, las composiciones preferentes contienen uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y potenciador del sabor. En una composición destinada a su administración mediante inyección, se pueden incluir uno o más de un tensioactivo, conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.
- 40 Una composición farmacéutica líquida como se usa en el presente documento, ya sea en forma de solución, suspensión u otra forma similar, puede incluir uno o más de los siguientes vehículos o excipientes: diluyentes estériles como agua para inyección, solución salina, preferentemente solución salina fisiológica, solución de Ringer, cloruro sódico isotónico, aceites no volátiles tales como escualeno, escualano, aceite mineral, un monooleato de manida, colesterol y/o mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes tales como ácido etilendiamintetraacético; tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro sódico o dextrosa. La preparación parenteral puede incluirse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples fabricados con vidrio o plástico. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.
- 45 En una realización particular, una composición farmacéutica o de vacuna de la invención comprende una suspensión acuosa estable de menos de 0,2 um y además comprende al menos un componente seleccionado entre el grupo que consiste en fosfolípidos, ácidos grasos, tensioactivos, detergentes, saponinas, lípidos fluorados, y similares.
- 50
- 55
- 60
- 65

En una vacuna o composición farmacéutica también puede ser deseable incluir otros componentes, tales como vehículos de administración que incluyen, pero no se limitan a, sales de aluminio, emulsiones de agua en aceite, vehículos oleosos biodegradables, emulsiones de aceite en agua, microcápsulas biodegradables y liposomas. Los ejemplos de sustancias inmunoestimulantes adicionales (coadyuvantes) para su uso en tales vehículos también se han descrito anteriormente y pueden incluir N-acetilmuramil-L-alanina-D-isoglutamina (MDP), glucano, IL-12, GM-CSF, gamma interferón e IL-12.

Aunque en las composiciones farmacéuticas de la presente invención se puede emplear cualquier vehículo adecuado conocido por las personas con experiencia en la materia, el tipo de vehículo variará dependiendo del modo de administración y de si se desea una liberación sostenida. Para la administración parenteral, tal como una inyección subcutánea, el vehículo comprende preferentemente agua, solución salina, alcohol, una grasa, una cera o un tampón. Para la administración oral, se puede emplear cualquiera de los vehículos mencionados anteriormente o un vehículo sólido, tal como manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, talco, celulosa, glucosa, sacarosa y carbonato de magnesio. Como vehículos para las composiciones farmacéuticas de la presente invención también se pueden emplear microesferas biodegradables (por ejemplo, galactida poliláctica).

Las composiciones farmacéuticas también pueden contener diluyentes tales como tampones, antioxidantes como ácido ascórbico, polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos), proteínas, aminoácidos, carbohidratos que incluyen glucosa, sacarosa o dextrinas, agentes quelantes como EDTA, glutatión y otros estabilizantes y excipientes. La solución salina tamponada neutra o la solución salina mezclada con albúmina sérica inespecífica son diluyentes apropiados ejemplares. Preferentemente, el producto se puede formular como un liofilizado usando soluciones de excipientes apropiadas (por ejemplo, sacarosa) como diluyentes.

En una realización ilustrativa, el epítipo o dominio de soporte del receptor de la proteína recombinante, ya sea derivado de una secuencia polipeptídica natural o sintética, debería tener la capacidad de autoensamblarse en multímeros oligoméricos en condiciones químicas/ambientales apropiadas, o de reducirse a monómeros en condiciones alternativas. Idealmente, los dominios de multimerización se ensamblarán en multímeros estables con un número discreto de subunidades, por ejemplo dímeros, trímeros, tetrámeros, pentámeros, etc., de manera que se genere un producto de tamaño homogéneo. Los ejemplos de polipéptidos naturales incluyen, pero no se limitan a, cremalleras de leucina, proteína represora lac, estreptavidina/avidina, subunidad B de toxina del cólera, dominio de trimerización de Pseudomonas y proteínas de la cápside viral.

En una realización ilustrativa, se desvela un proceso para preparar una molécula multivalente. En esta realización ilustrativa, el proceso incluye ensamblar multímeros a partir de subunidades monoméricas para formar una proteína sintética que incluye uno o más antígenos tumorales, receptores y/o factores de crecimiento o partes de los mismos.

En otra realización ilustrativa, se desvela un proceso para preparar una formulación de vacuna. En esta realización ilustrativa, el proceso incluye mezclar uno o más multímeros monovalentes individuales juntos preparando una vacuna multivalente que incluye una proteína recombinante que incluye uno o más antígenos tumorales, receptores y/o factores de crecimiento o partes de los mismos.

Además en otra realización ilustrativa, se desvela un proceso para tratar a un paciente. En esta realización ilustrativa, el proceso incluye administrar por separado al paciente una o más monovalentes, un antígeno tumoral, receptor, y/o factor de crecimiento, proteínas recombinantes en el mismo día o en días o momentos alternos durante un periodo de vacunación.

Aunque se describe que la proteína recombinante incluye o expresa una o más de toda o una parte de al menos una secuencia de los antígenos tumorales, los factores de crecimiento, y/o los receptores, y la secuencia de CT-B, la proteína recombinante puede incluir la secuencia de CT-B natural o una secuencia sustancialmente similar a la secuencia de CT-B natural y/o una secuencia sintética.

Aunque se describe que la proteína recombinante incluye o que expresa la secuencia de CT-B, la proteína recombinante puede incluir o expresar una derivación de la secuencia de CT-B o una secuencia que es sustancialmente similar a la secuencia de CT-B.

Aunque las proteínas recombinantes homogéneas que expresan o que incorporan uno o más antígenos tumorales, factores de crecimiento, y/o receptores se han descrito e ilustrado en conexión con ciertas realizaciones, muchas variaciones y modificaciones serán evidentes para las personas con experiencia en la materia y se pueden llevar a cabo sin apartarse del espíritu y el ámbito de la divulgación. Por lo tanto la divulgación no se limita a los detalles precisos de la metodología o la construcción que se presentaron anteriormente ya que se pretende que tales variaciones y modificaciones queden incluidas dentro del ámbito de la divulgación.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína recombinante, que comprende:
 - 5 una secuencia polipeptídica inmunogénica que incluye la subunidad B de la toxina del cólera (CT-B) o la subunidad B LT termolábil (LT-B) de *E. coli*;
 - un espaciador peptídico configurado para reducir el impedimento estérico y seleccionado entre el grupo que consiste en SSGGGSGG, SSGGGGSGGG, TSGGGSG, TSGGGGSGG, SSGGGSGGSSG, GGSGGTSGGGSG, SGGTSGGGGSGG, GGSGGTSGGGGSGG, SSGGGGSGGGSSG, SSGGGSGGSSGGG, SSGGGGSGGGSSGG, y GGSGGTRPSTAATS; y
 - 10 una secuencia polipeptídica que comprende de Cys 6 a Cys 31 del factor de crecimiento epidérmico; en la que dicha secuencia polipeptídica está separada de dicha secuencia polipeptídica inmunogénica mediante dicho espaciador peptídico.
- 15 2. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia polipeptídica inmunogénica además comprende una secuencia que comprende al menos una parte de un antígeno tumoral.
3. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia polipeptídica inmunogénica además comprende una secuencia que comprende al menos una parte de un receptor.
- 20 4. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, en la que la secuencia polipeptídica inmunogénica además comprende una secuencia que comprende al menos una parte de un antígeno tumoral y una secuencia que comprende al menos una parte de un receptor.
- 25 5. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una longitud completa o una parte de al menos dos factores de crecimiento diferentes.
6. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 1, que comprende una longitud completa o una parte de uno o más factores de crecimiento en dicha proteína como un dominio único o como dos o más repeticiones en tándem.
- 30 7. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 5, que comprende una longitud completa o una parte de uno o más de los siguientes factores de crecimiento: IGF-1, IGF-2, FGF1, FGF2, TGF- α , TGF- β , VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, PDGF, NGF, EGF, HGF, las BMP, y las IL 1-6.
- 35 8. La proteína recombinante de acuerdo con la reivindicación 2, en la que dicha al menos una parte de dicho antígeno tumoral incluye una longitud completa o una parte de dos a cuatro antígenos tumorales diferentes, o una longitud completa o una parte de uno o más antígenos tumorales presentes como epítopos únicos o como dos o más repeticiones en tándem.
- 40 9. La proteína recombinante de la reivindicación 4, en la que dicha al menos una parte de dicho receptor incluye una longitud completa o parte del mismo del receptor 2 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her 2) o del receptor 3 del factor de crecimiento epidérmico humano (Her 3).
- 45 10. La proteína recombinante de la reivindicación 4 en la que dicha longitud completa o parte de dicho receptor incluye una longitud completa o parte de dos a cuatro receptores diferentes, o una longitud completa o parte de uno o más receptores como epítopos únicos o como dos o más repeticiones en tándem.
- 50 11. Un proceso para preparar una molécula multivalente que comprende: ensamblar multímeros de una o más proteínas recombinantes de acuerdo con la reivindicación 1.

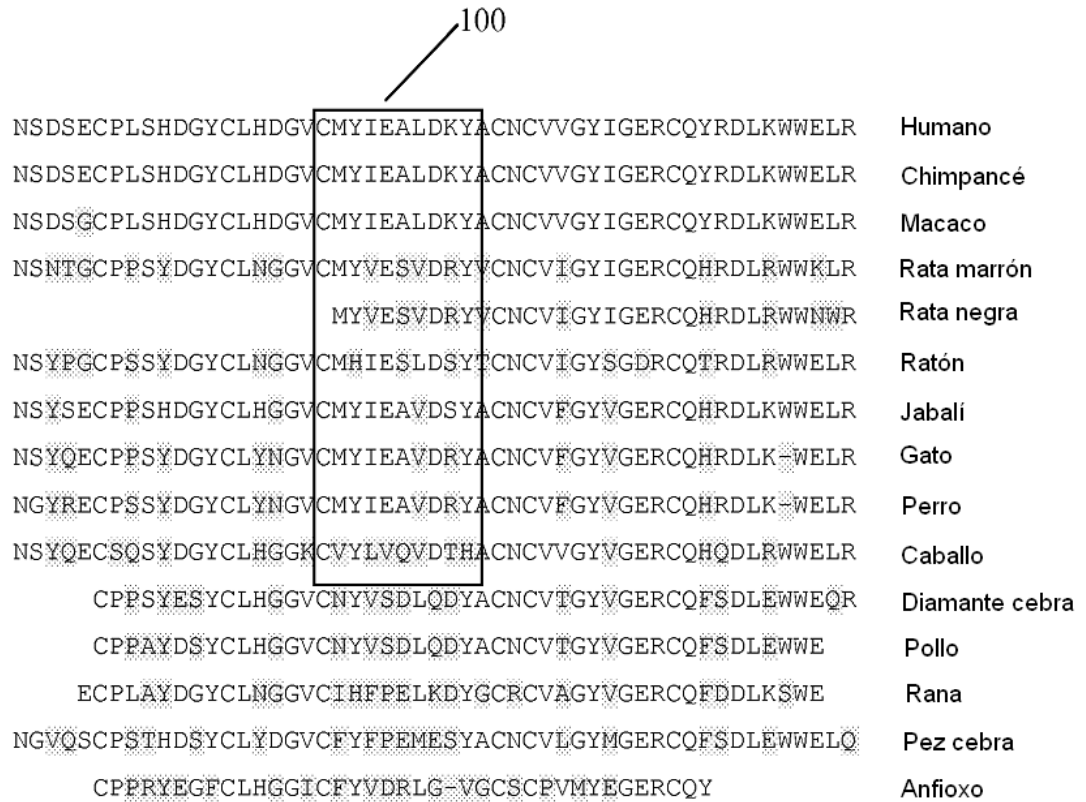


FIG. 1

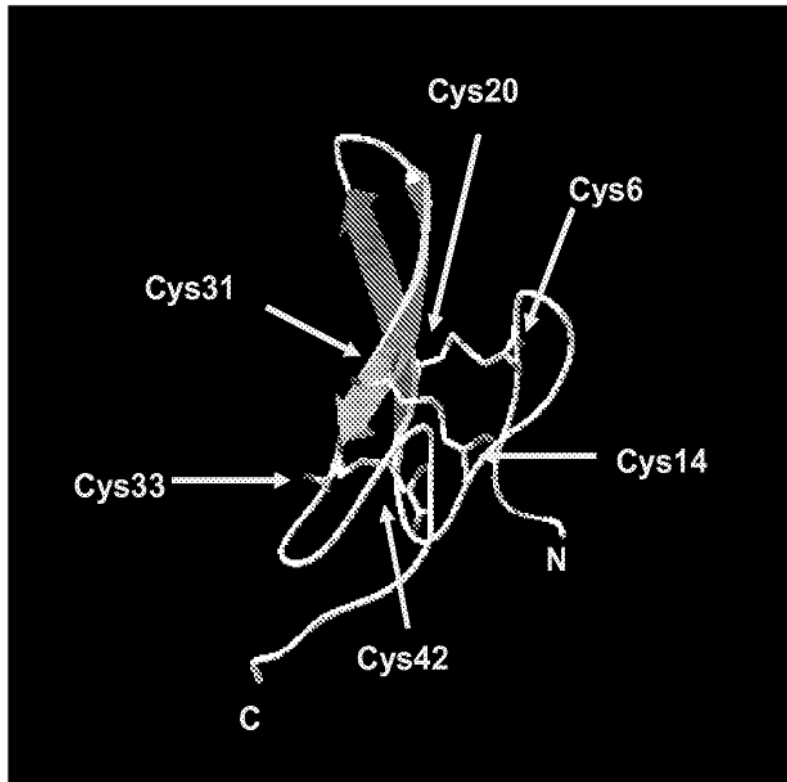


FIG. 2

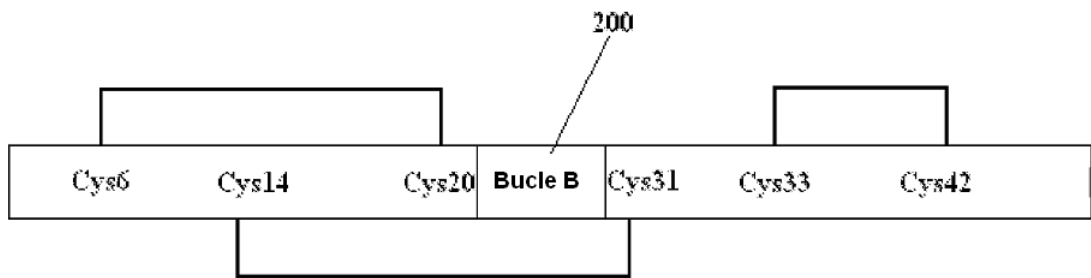


FIG. 3

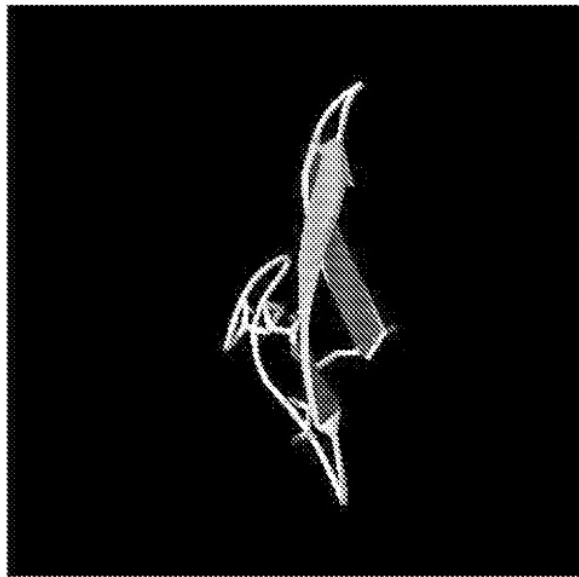


FIG. 4

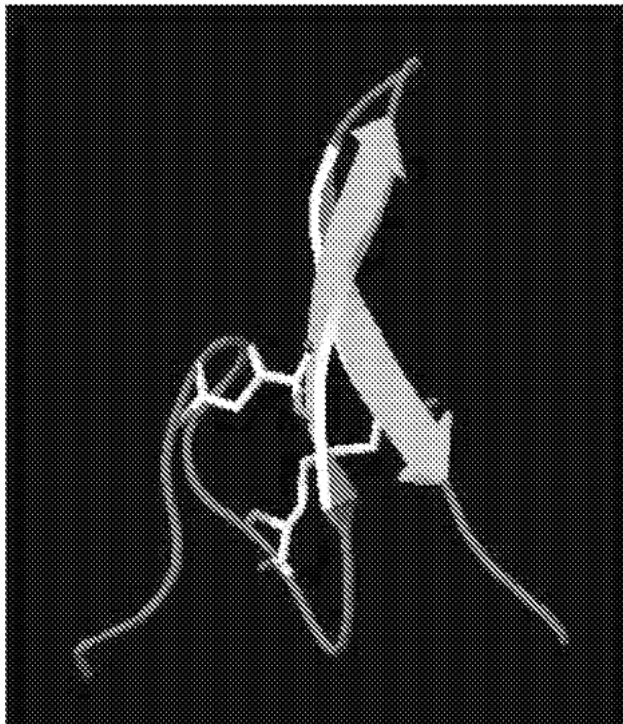


FIG. 5

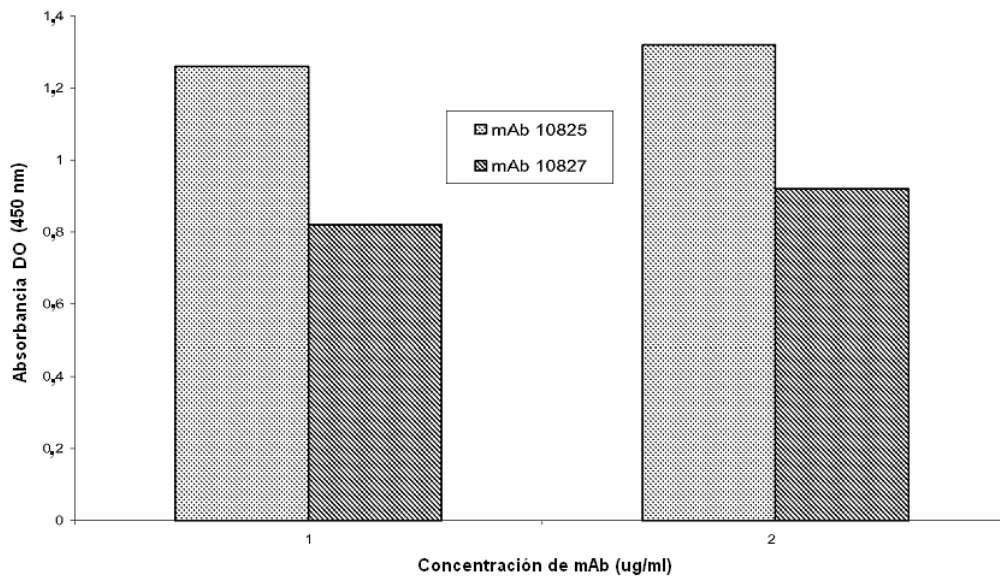


FIG. 6

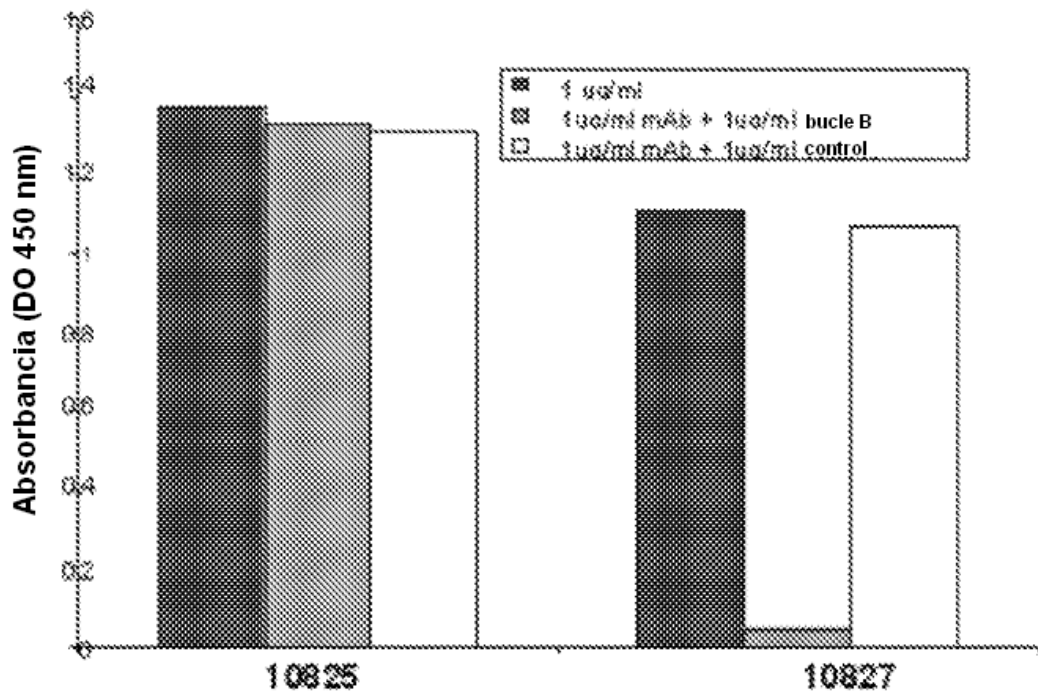


FIG. 7

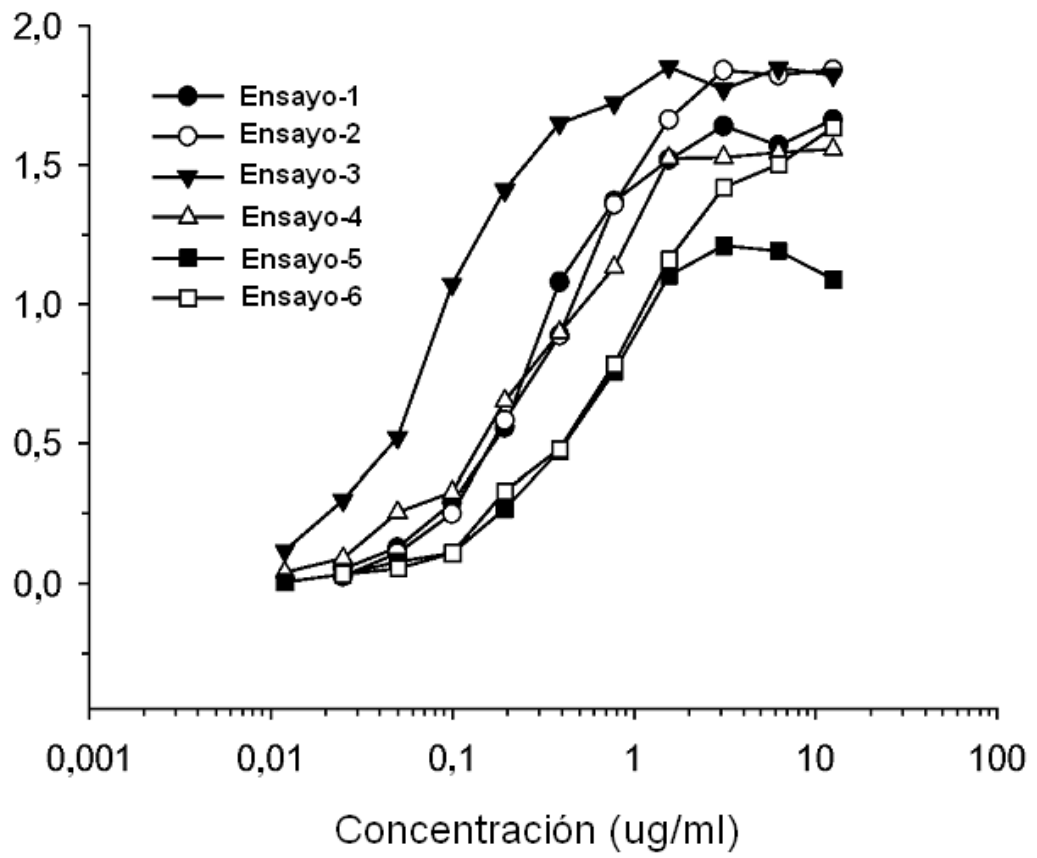


FIG. 8

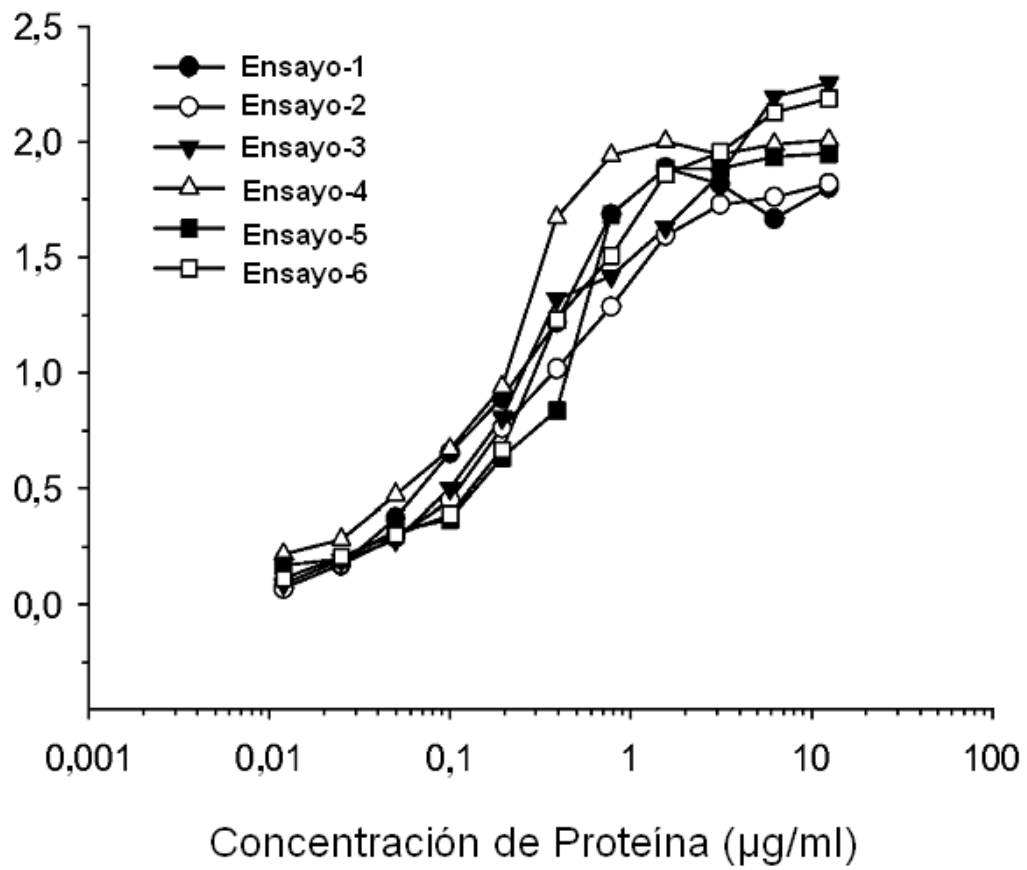


FIG. 9

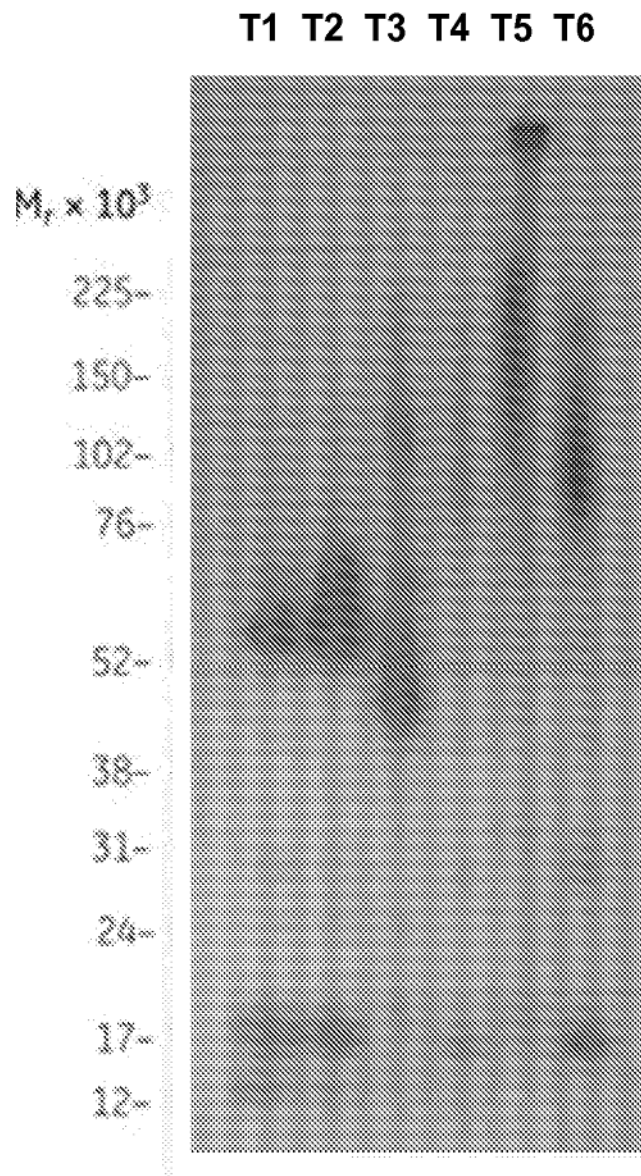


FIG. 10

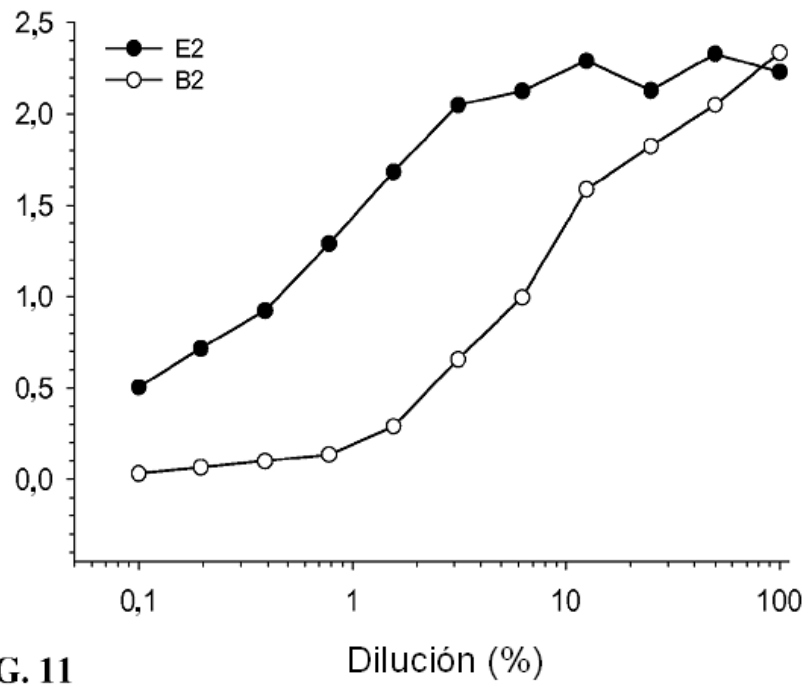


FIG. 11

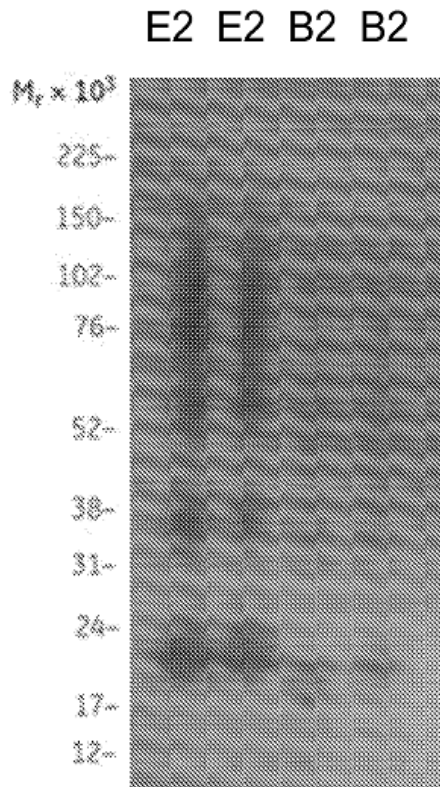


FIG. 12

HHHHHHIEGRNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE
ALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWWELRSGGTPQN
ITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKN
GATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVE
KLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGNSDSECPLSHDGYCL
HDGVCMYIEALDKYACNCVVGYIGERCQYRDLKWW
ELR

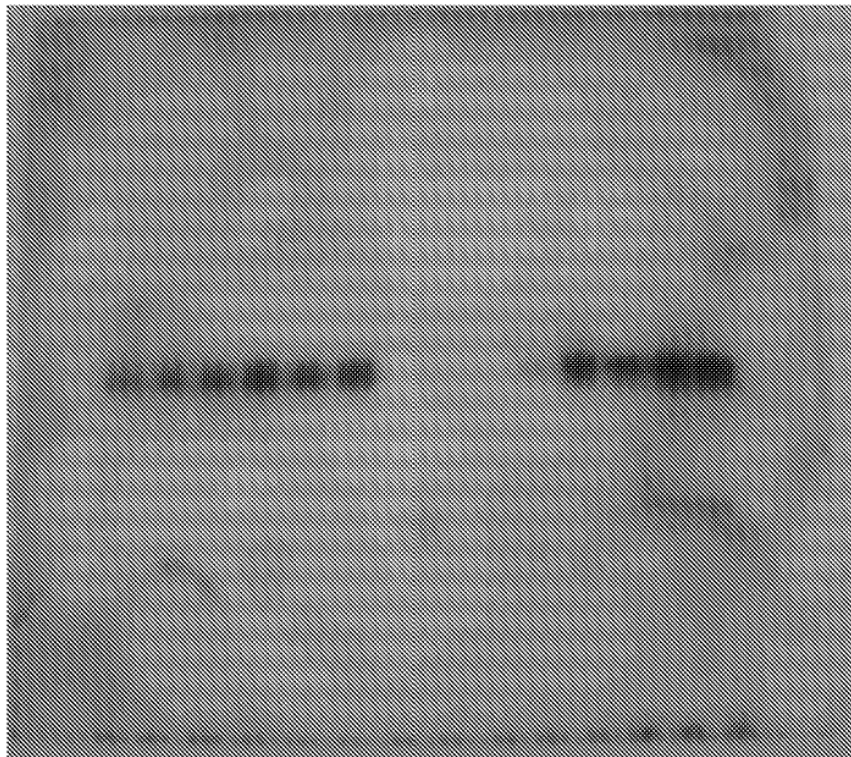
FIG. 13

HHHHHHIEGRCMYIEALDKYSGGTPQNITDLCAE
YHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQV
EVPGSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVW
NNKTPHAIAAISMANSSGCMYIEALDKY

FIG. 14

HHHHHHIEGRCPLSHDGYCLHDGVCMYIEALDK
YACSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG
KREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERMKDT
LRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGCPLS
HDGYCLHDGVCMYIEALDKYAC

FIG. 15



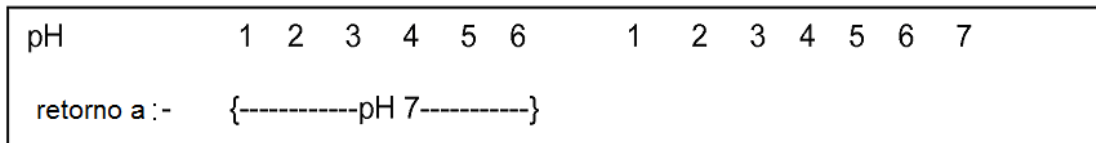


FIG. 16

Construcción	Secuencia
T1	EGF fusionado directamente al extremo N-terminal de CT-B.
T2	EGF fusionado al extremo N-terminal de CT-B y separado de la CT-B por conectores de 3 aminoácidos.
T3	EGF fusionado al extremo N-terminal de CT-B y separado de la CT-B por conectores de 5 aminoácidos.
T4	EGF fusionado directamente al extremo C-terminal de CT-B.
T5	EGF fusionado al extremo C-terminal de CT-B y separado de la CT-B por conectores de 3 aminoácidos.
T6	EGF fusionado al extremo C-terminal de CT-B y separado de la CT-B por conectores de 5 aminoácidos.
E2	EGF de longitud completa en ambos extremos de CT-B cada uno separado de la CT-B por conectores de 3 aminoácidos.
B2	EGF truncado (por ejemplo, la secuencia de EGF de Cys6 a Cys31) en ambos extremos de CT-B cada uno separado de la CT-B por conectores de 3 aminoácidos.

FIG. 17

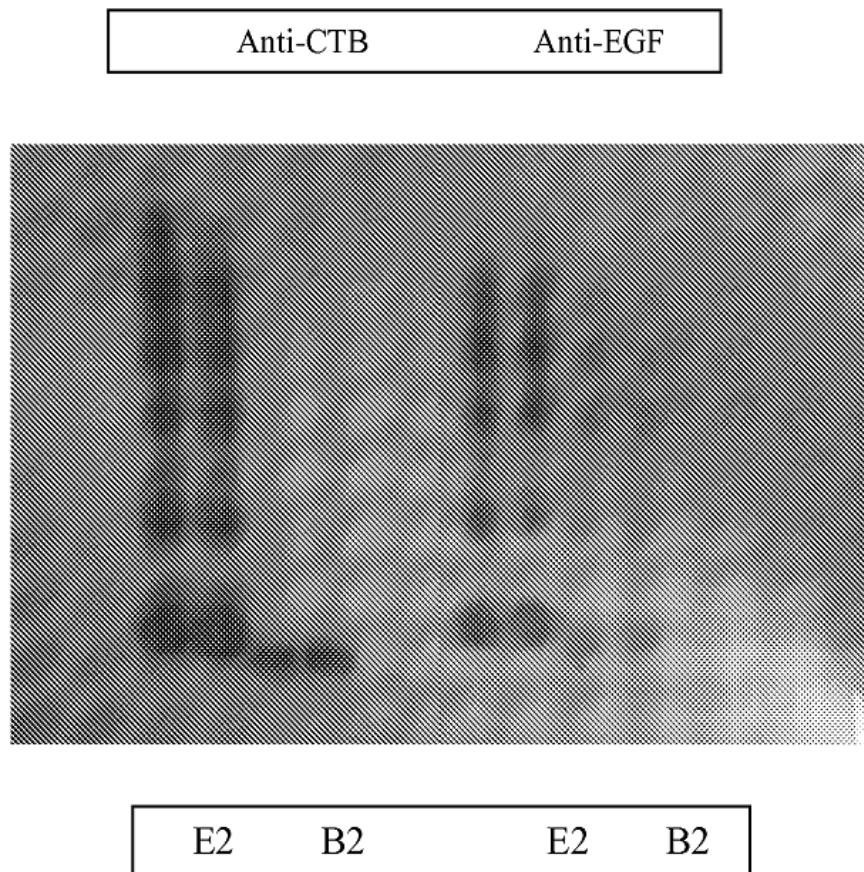


FIG. 18

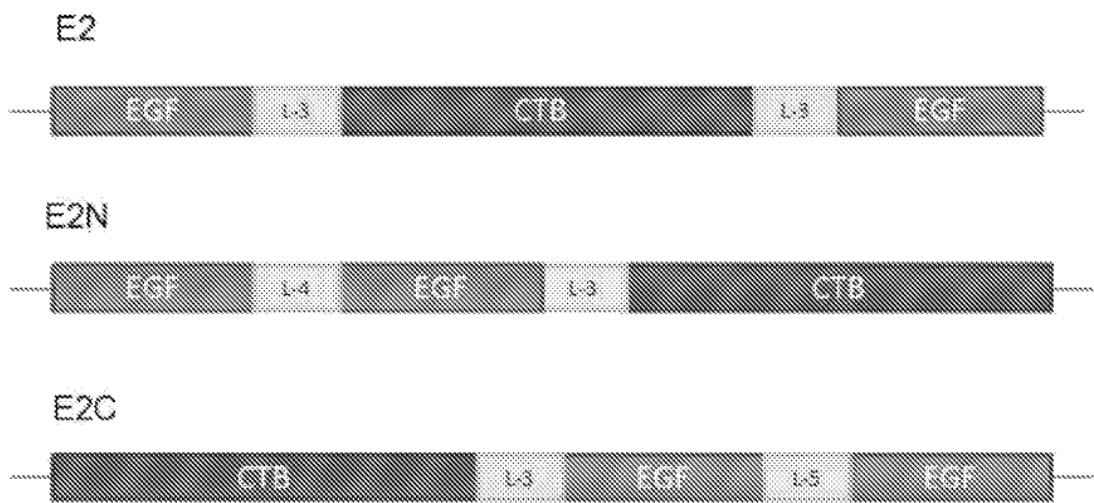


FIG. 19

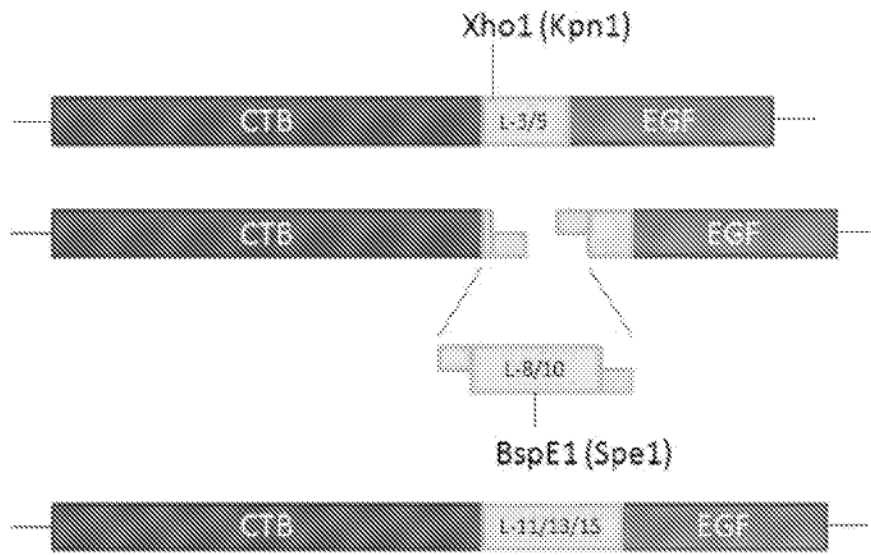


FIG. 20

Western α -EGF

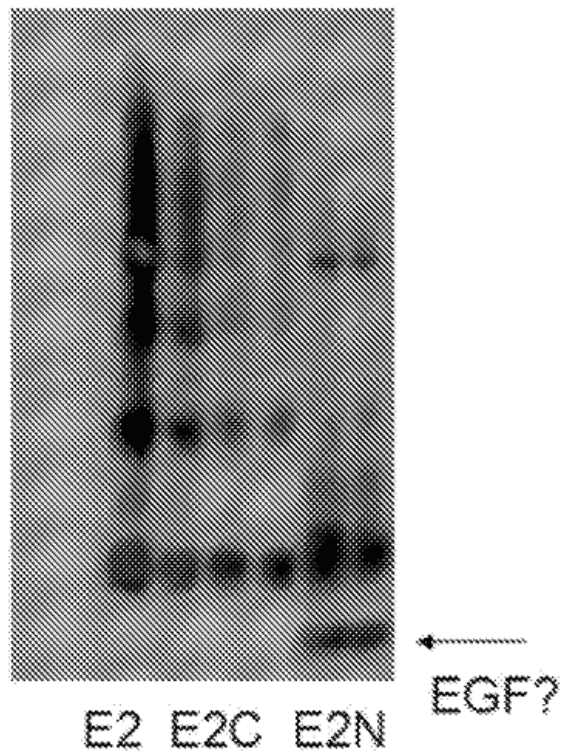


FIG. 21

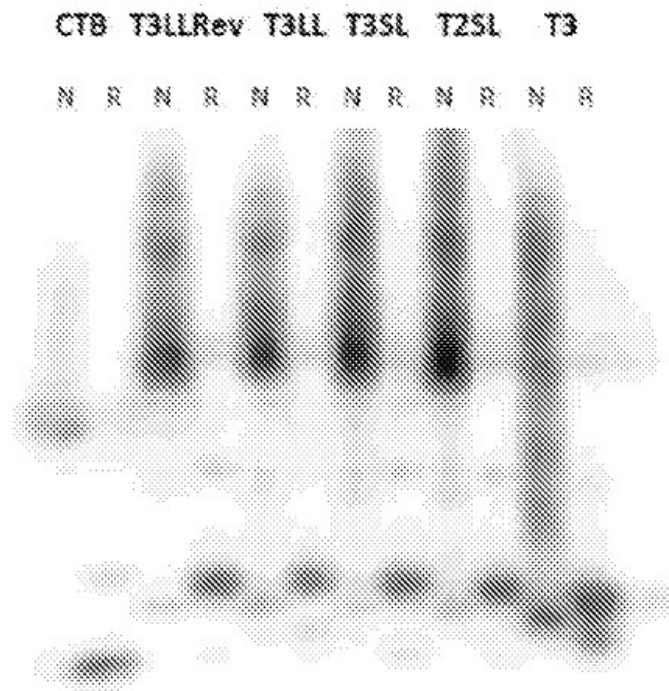


FIG. 22

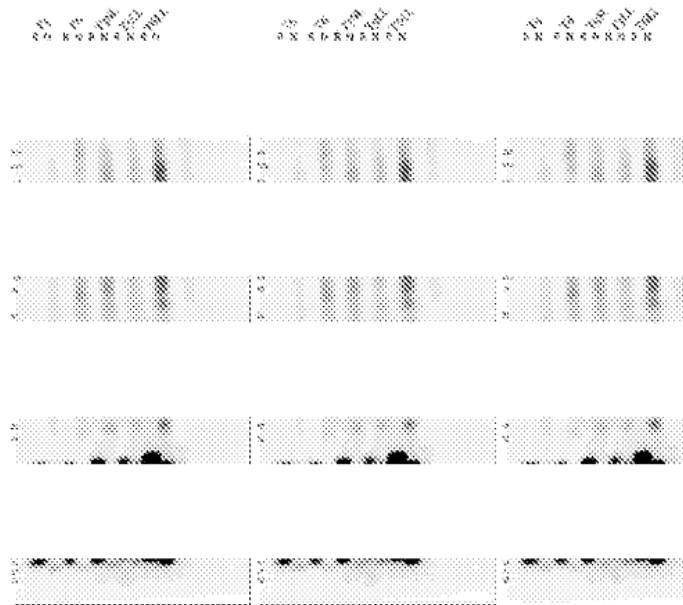


FIG. 23

HHHHHHIEGRGPETLCGAELVDALQFVCGDRGF
YFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMY
CAPLKPAKSAGSSGNSDSECPLSHDGYCLHDGVCMYIE
ALDKYACNCVVG YIGERC OYRDLKWWELRGGSGGTSG
GGGGSGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAG
KREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMKDTLR
IAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

FIG. 24

ELISA de Captura 'mediante diseño' de Proteína Quimérica Biespecífica

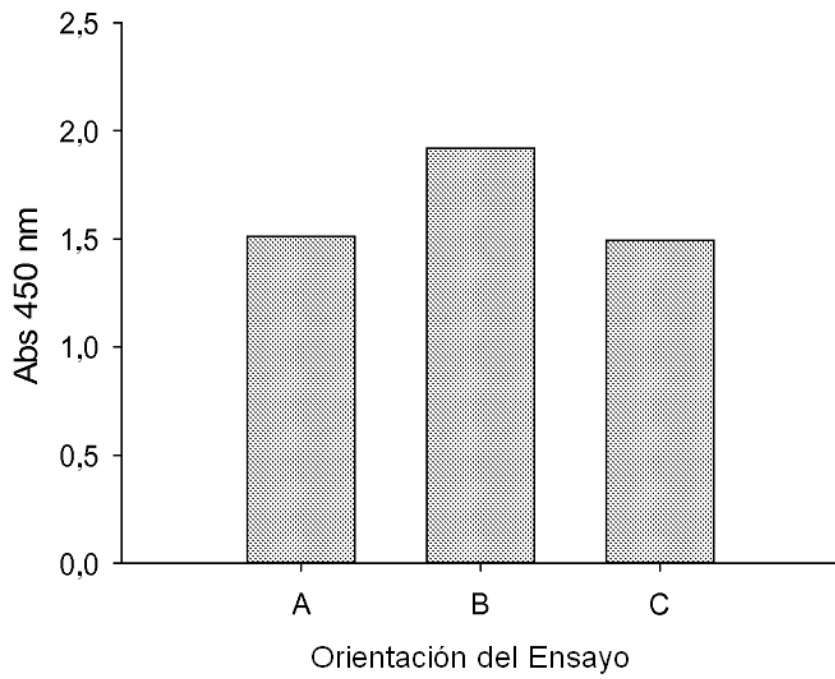


FIG. 25

HHHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTE
SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPSQHIDSQKKAIERMK
DTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANS SG GP
ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA

FIG. 26

ELISA de Captura mediante proceso de Proteína Quimérica Biespecífica

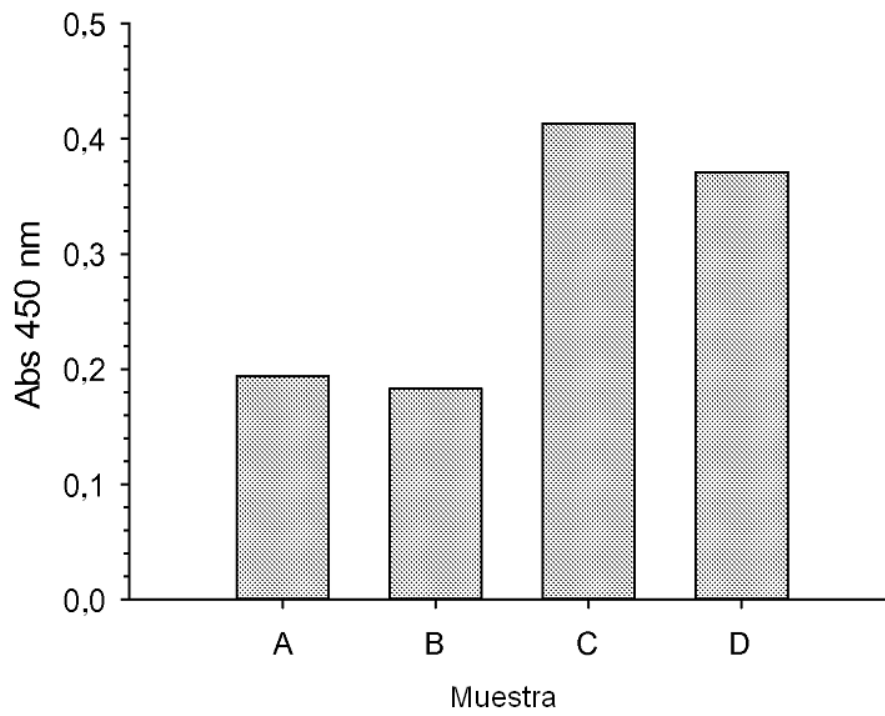


FIG 27

a) mTGF-Beta1

HHHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN
SSGALDTNYCFSSTEKNCCVRQLYIDFRKDLGWKWI
HEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVLALYNQHN
PGASASPCCVPOALEPLPIVYYVGRKPKVEQLSNMIV
RSCKCS

b) mFGF2

HHHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFSYTE
SLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKAIERM
KDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMANSSGP
ALPEDGGAAFPPGHFKDPKRLYCKNGGFFLRIHPDGR
VDGVREKSDPHVKLQLQAEERGVSISIKGVCANRYLA
MKEDGRLLASKCVTEECFFFERLESNNYNTYRSRKYS
SWYVALKRTGOYKLGSKTGPGQKAILFLPMSAKS

c) mHGF

HHHHHHHQKKRRNTLHEFKKSAKTTLTKEDPLLKIKT
KKVNSADECANRCIRNRGFTFTCKAFVFDKSRKRCY
WYPFNSMSSGVKKGFGHEFDLYENKDYIRNCIIGKGG
SYKGTVSITKSGIKCQPWNSMIPHEHSFLPSSYRGKDL
QENYCRNPRGEEGGPWCFTSNPEVRYEVCDIPQCSGG
SGGTSGGGGSGGTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIFS
YTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN

d) mIGF-1/2

HHHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMAN
SSGGPETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSS
IRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPTKAA
GGSA YGPGETLCGGELVDTLQFVCSDRGFYFSRPSSR
ANRRSRGIVEECCFRSCDLA LLETYCATPAKSE

e) mVEGF-A/C

HHHHHHHIEGRTPQNITDLCAEYHNTQIHTLNDKIF
SYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVPGSQHIDSQKKA
IERMKDTRLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTPHAIAAISMA
NSSGVIKFMDVYQRSYCRPIETLVDIFQEYPDEIEYIFK
PSCVPLMRCAGCCNDEALECVPTSES NITMQIMRIKP
HQSQHIGEMSFLQHSRCECRPKKTEILKSIDNEWKTKO
CMPREVCIDVGKEFGAATNTFFKPPCVSVYRCGGCCNS
EGLQCMNTSTGYLSKTLFEITVPLSQGPKPVTISFANHT
SCRCMS

FIG 28

ELISA de Captura de Proteína Quimérica Recombinante

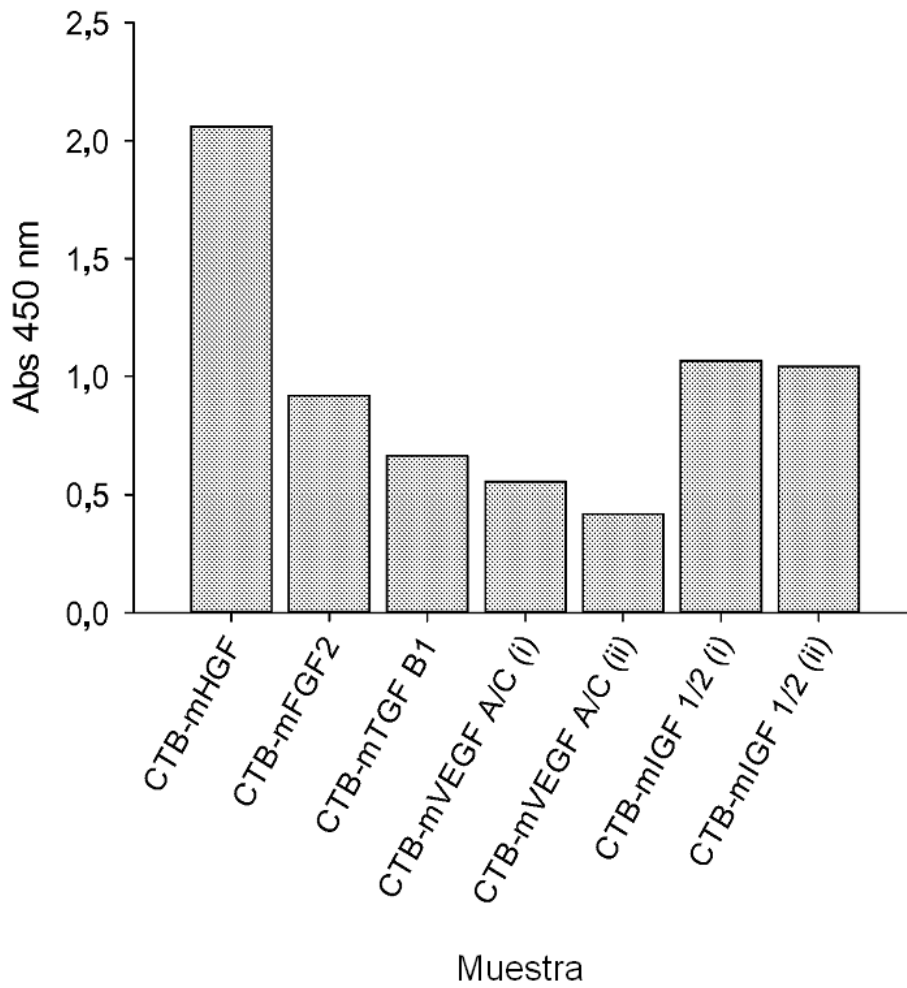


FIG 29

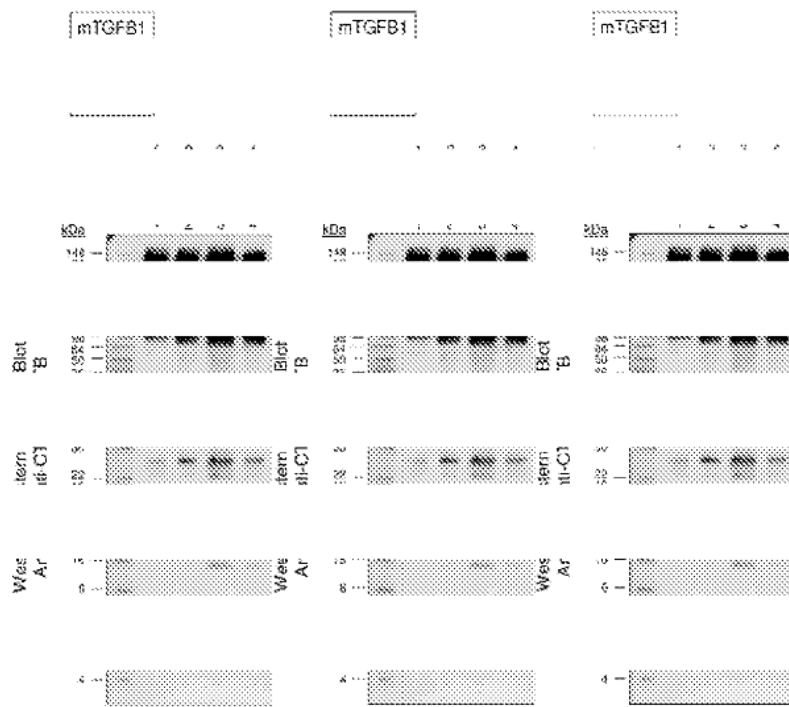


FIG 30

a) HuTGF-Beta1
HHHHHHALDTNYCFSSTEKNCCVRQ LYIDFRKD
LGWKWIHEPKGYHANFCLGPCPYIWSLDTQYSKVL
LYNQHNPGASAAPCCVPQALEPLPIVYYVGRKPKVE
QLSNMIVRSCKCSGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCA
EYHNTQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQ
VEVPSQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWN
NKTPHAIAAISMANN

b) Hu-TGF-Beta-R2
HHHHHHIEGRAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSC
MSNCSITSICEKPOEVCVAVWRKNDENITLETVCHDP
KLPYHDFILEDAA SPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD
ECNDNIIFSEGGSGGTSGGGGGSGTPQNITDLCAEYHN
TQIHTLNDKIFSYTESLAGKREMAIITFKNGATFQVEVP
SQHIDSQKKAIERMKDTLRIAYLTEAKVEKLCVWNNKTP
HAIAAISMANN

FIG 31

ELISA de captura del Receptor 2 de TGF-Beta

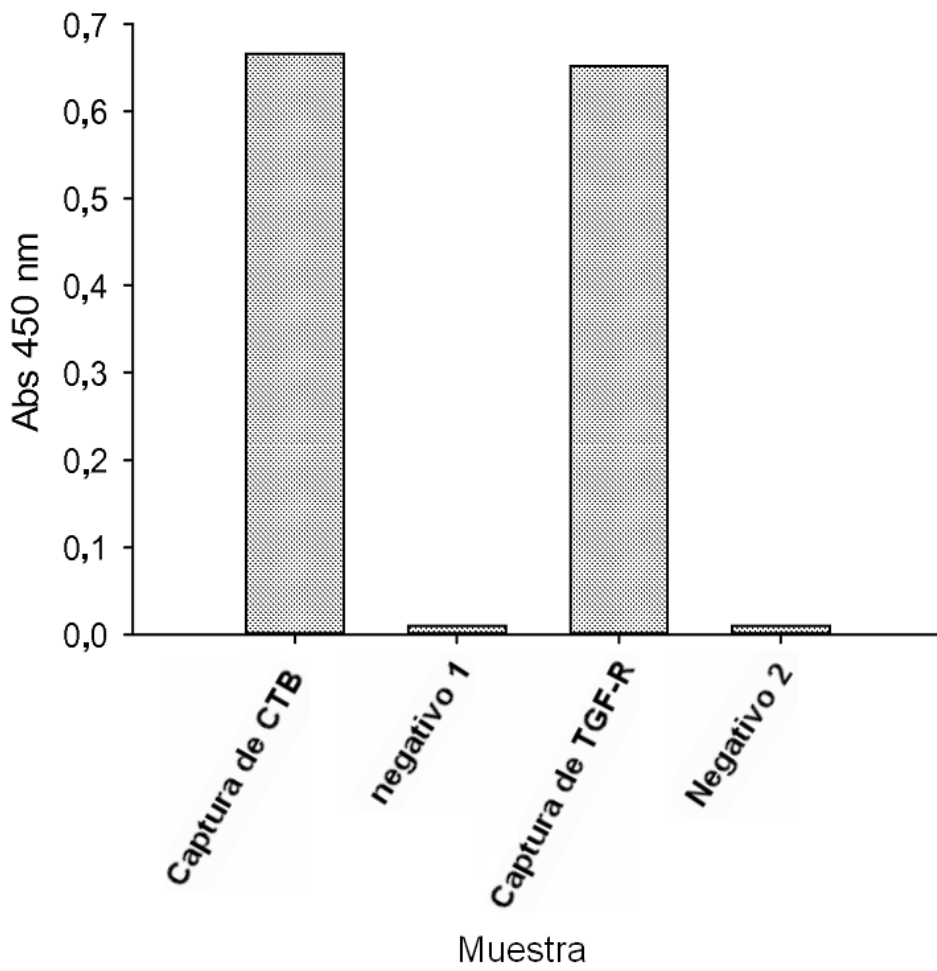


FIG 32

Unión de la secuencia de HuTGF-Beta a la Secuencia del Receptor 2 de TGF-Beta

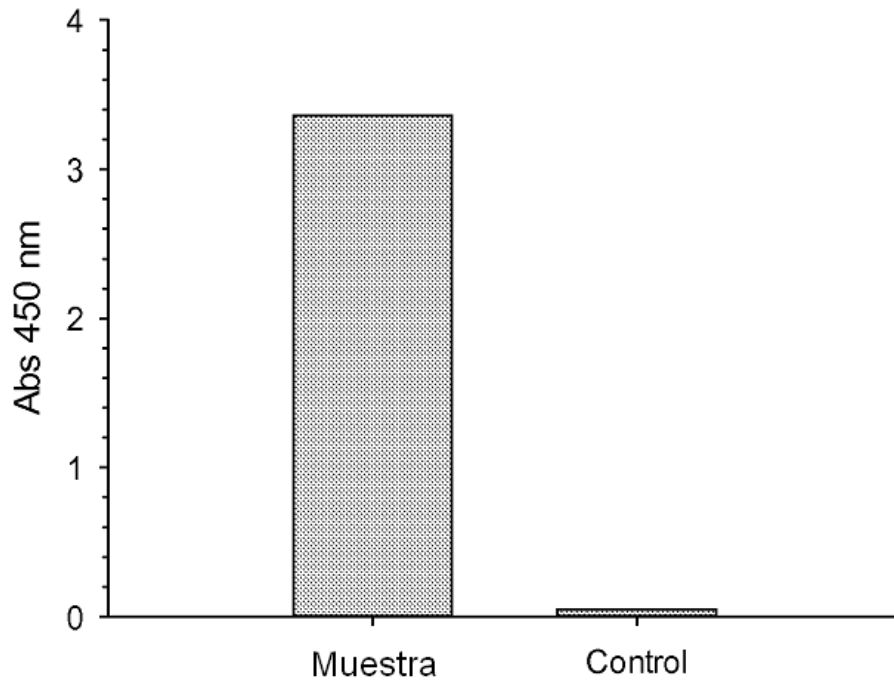


FIG. 33

Unión de Sueros del Grupo 1 a una dilución de 1/100 a rhIGF

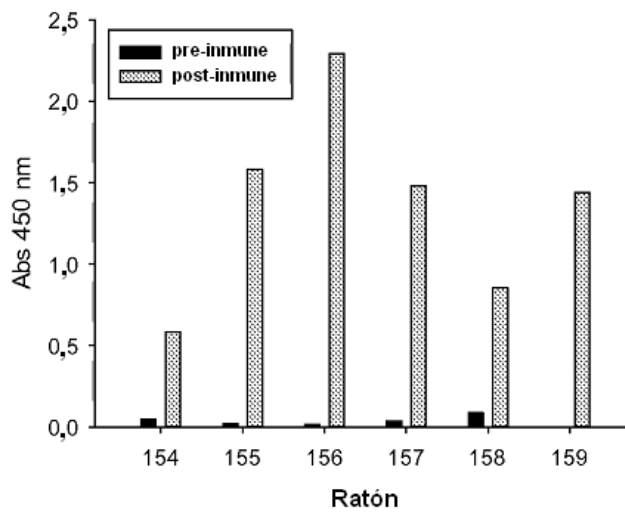


FIG. 34

Unión de Sueros del Grupo 2 a una dilución de 1/100 a rhEGF

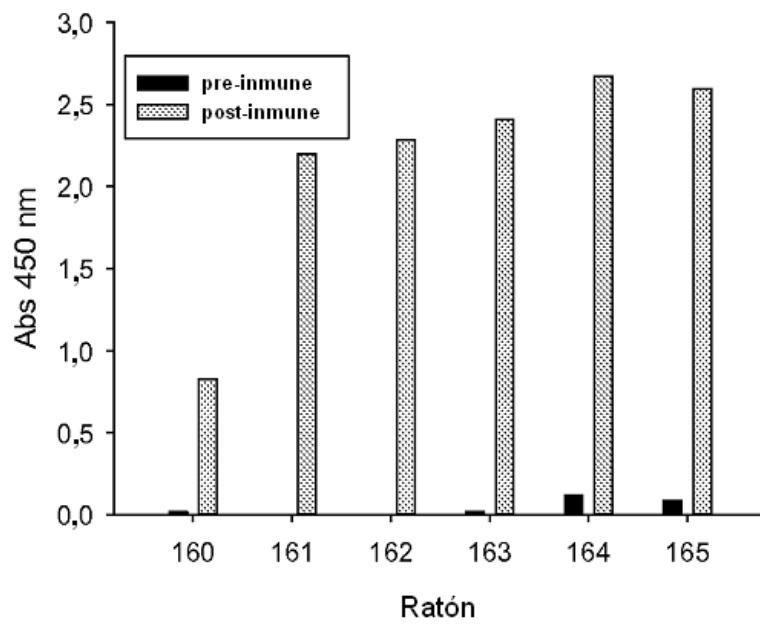
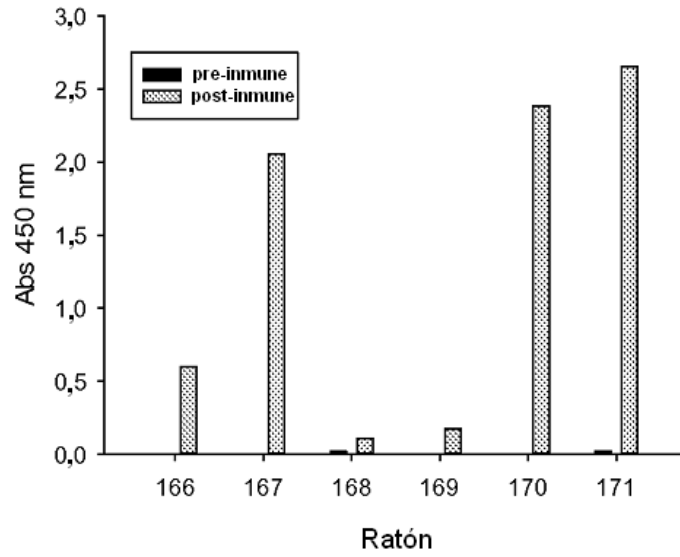


FIG. 35

a)

Unión de Sueros del Grupo 3 a una dilución de 1/100 a rHu-EGF



b)

Unión de Sueros del Grupo 3 a una dilución de 1/8 a rHu-EGF

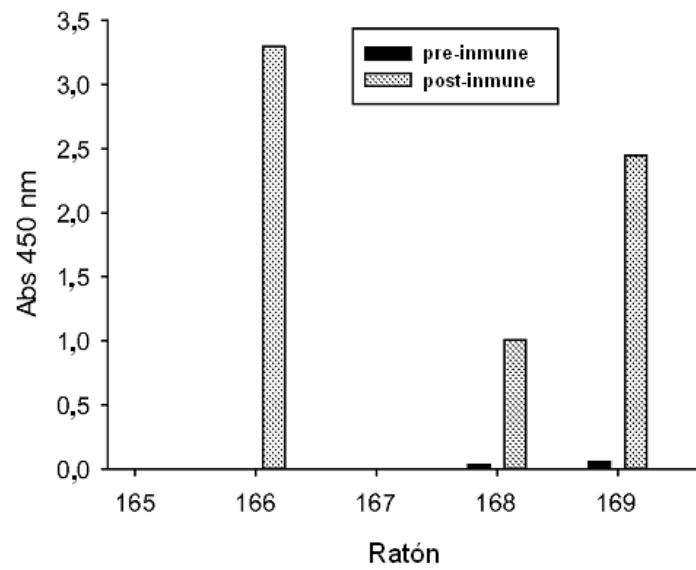
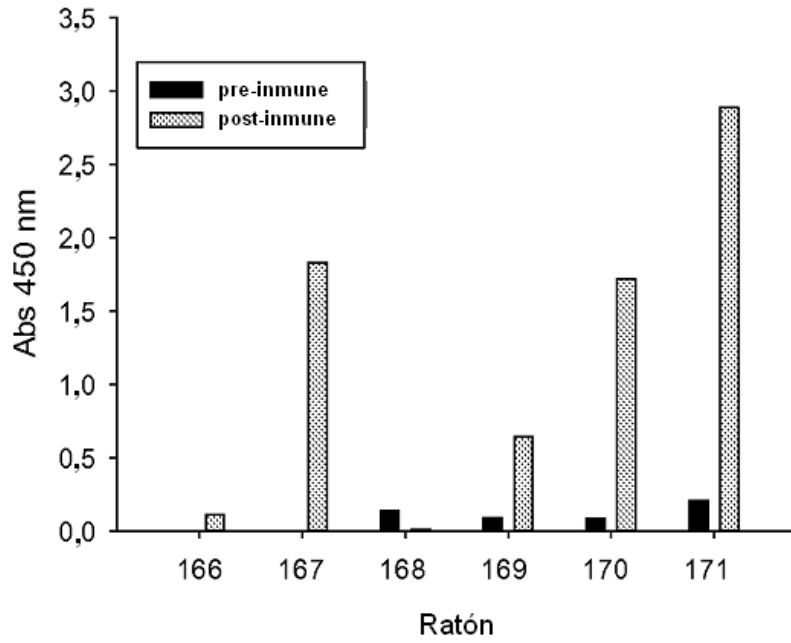


FIG. 36

a)

Unión de Sueros del Grupo 3 a una dilución de 1/100 a rHu-IGF



b)

Unión de Sueros del Grupo 3 a una dilución de 1/8 a rHu-IGF

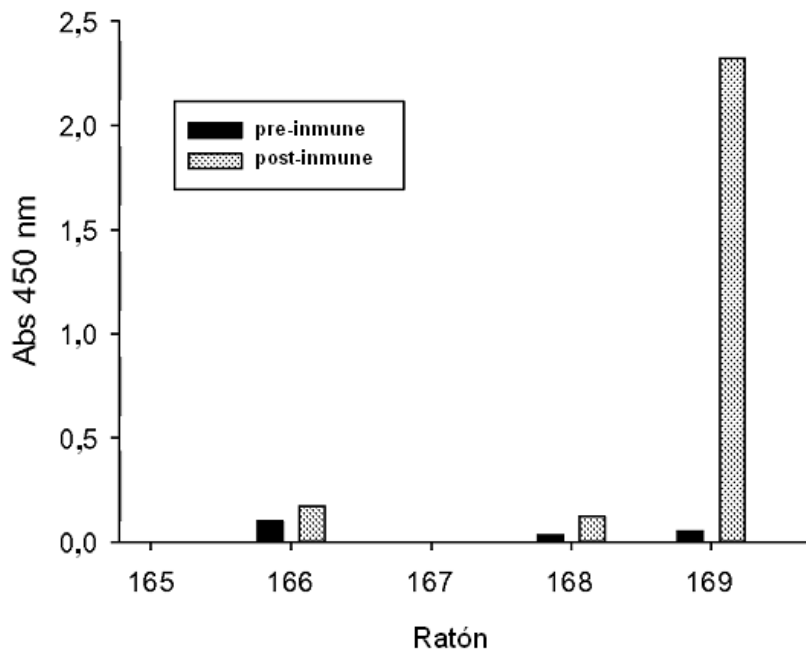
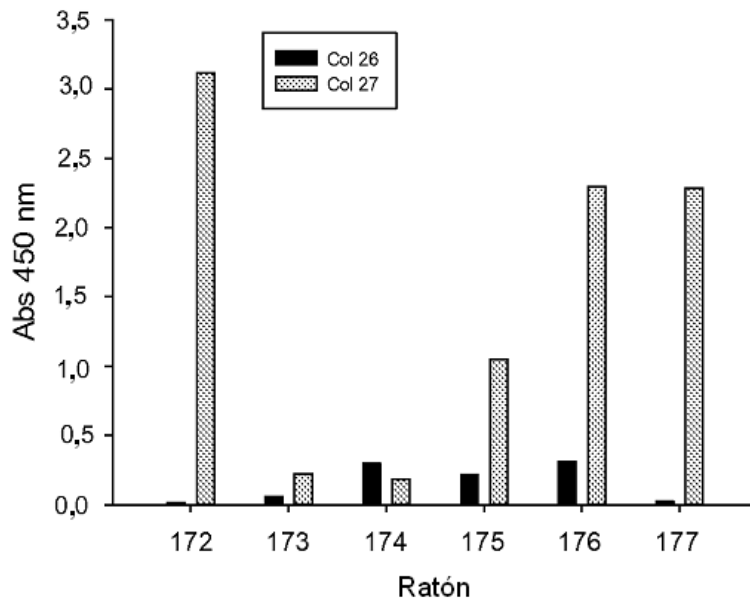


FIG. 37

a)

Unión de Sueros del Grupo 4 a una dilución de 1/100 a rHu-EGF



b)

Unión de Sueros del Grupo 4 a una dilución de 1/8 a rHu-EGF

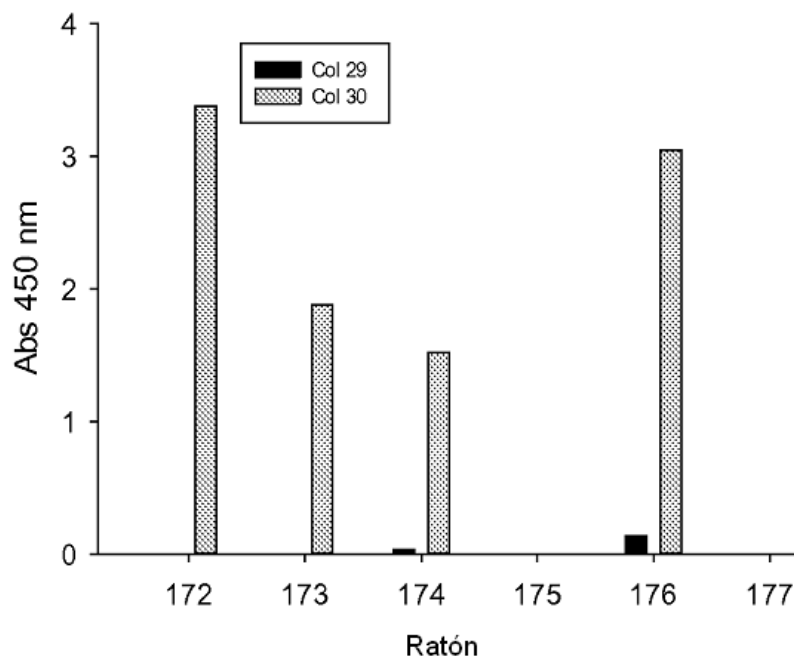
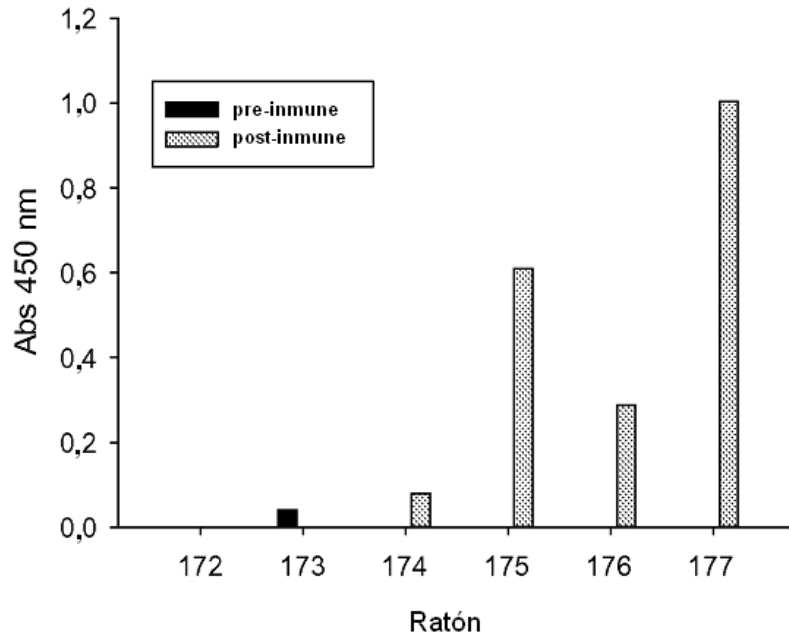


FIG. 38

a)

Unión de Sueros del Grupo 4 a una dilución de 1/100 a rHu-IGF



b)

Unión de Sueros del Grupo 4 a una dilución de 1/8 a rHu-IGF

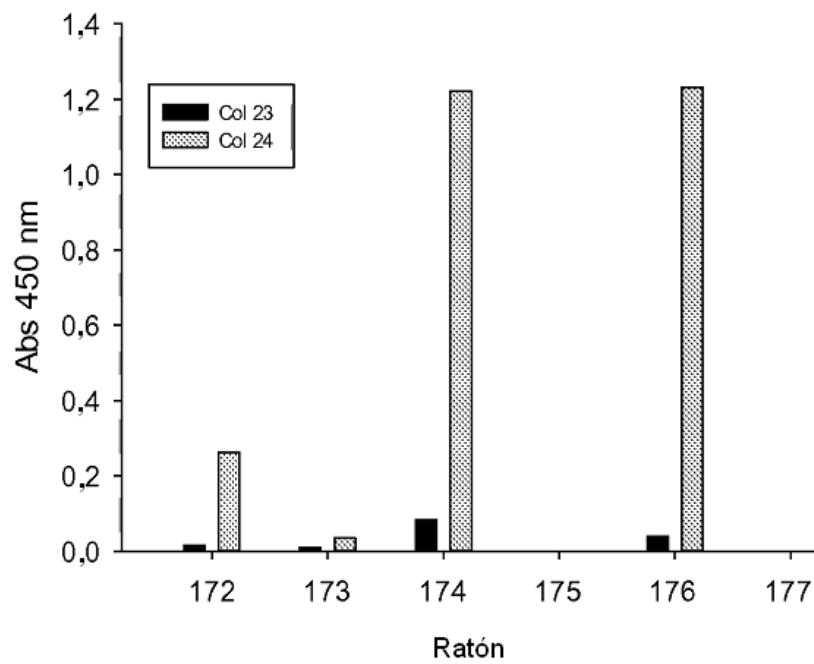


FIG. 39

Unión de Sueros del Grupo 5 a una dilución de 1/8 o 1/100 a rHuIGF

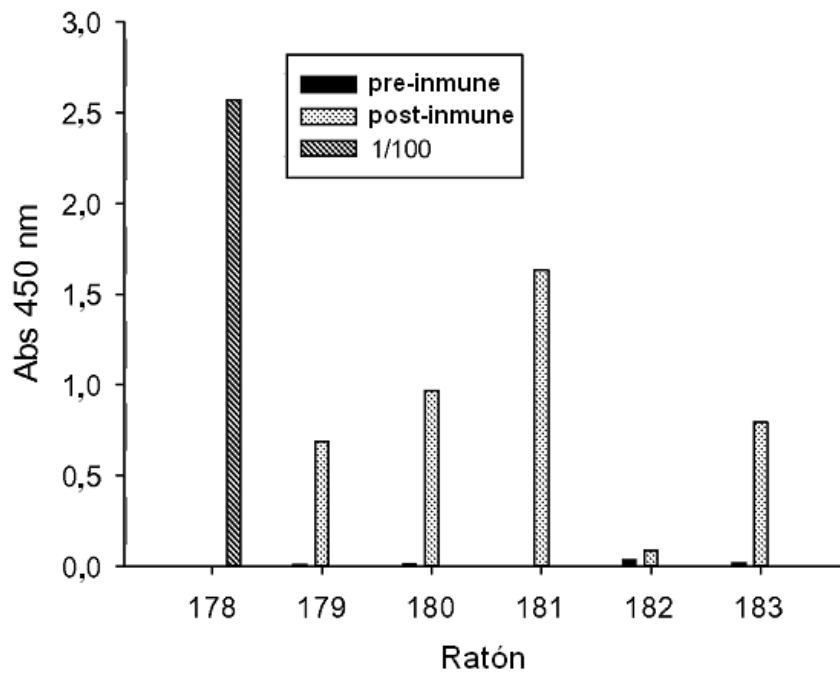
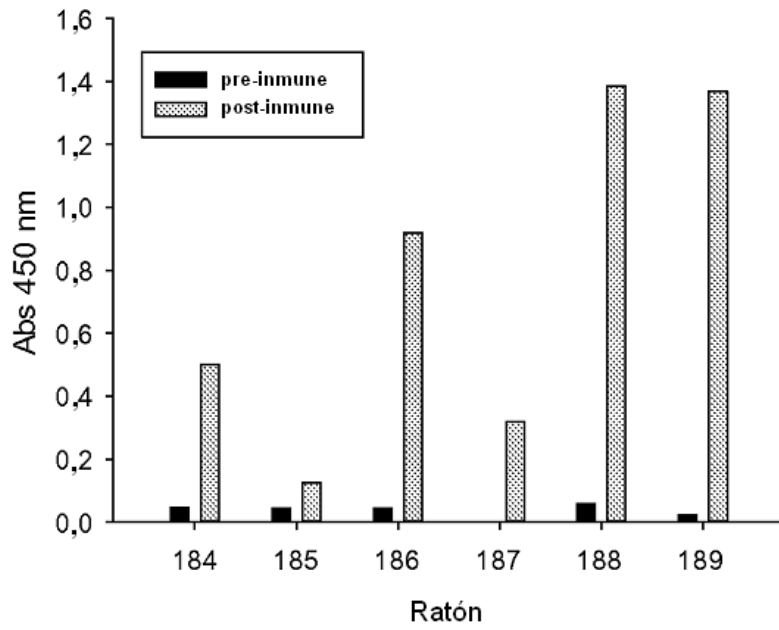


FIG. 40

a)

Unión de Sueros del Grupo 6 a una dilución de 1/100 a rHu-IGF



b)

Unión de Sueros del Grupo 6 a una dilución de 1/100 a rHu-EGF

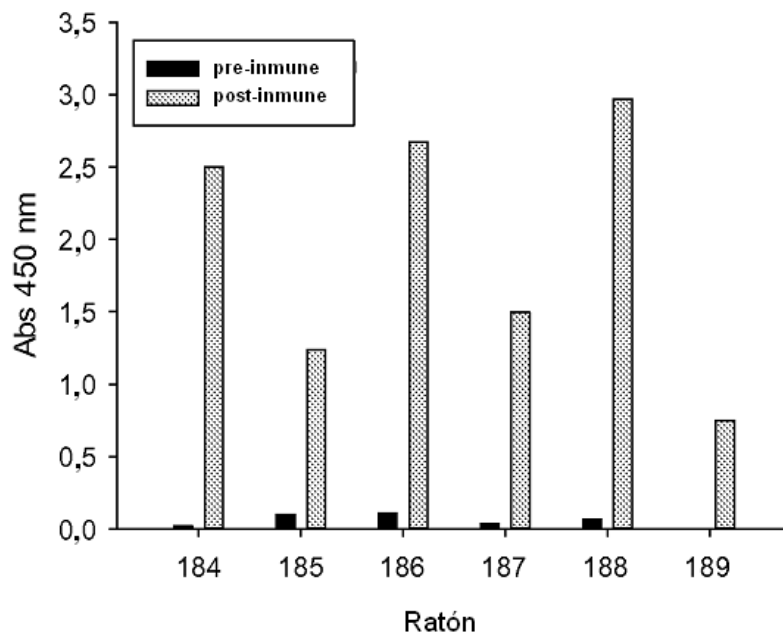


FIG. 41

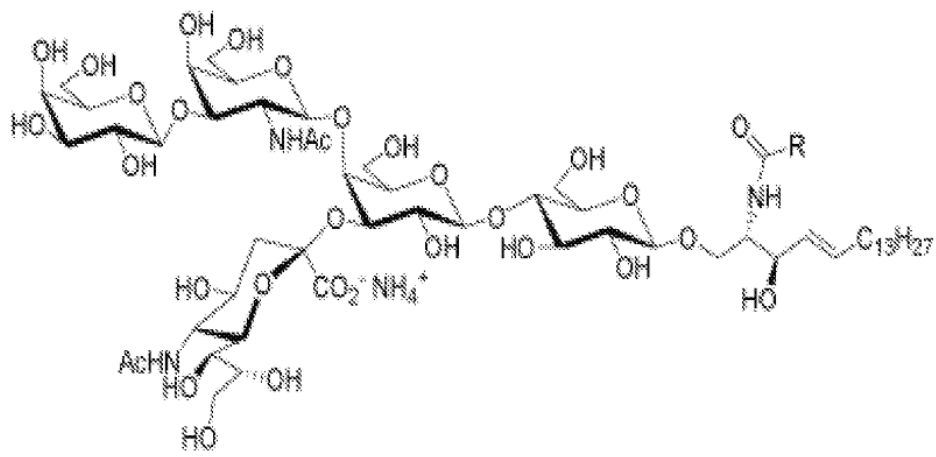


FIG. 42



FIG. 43

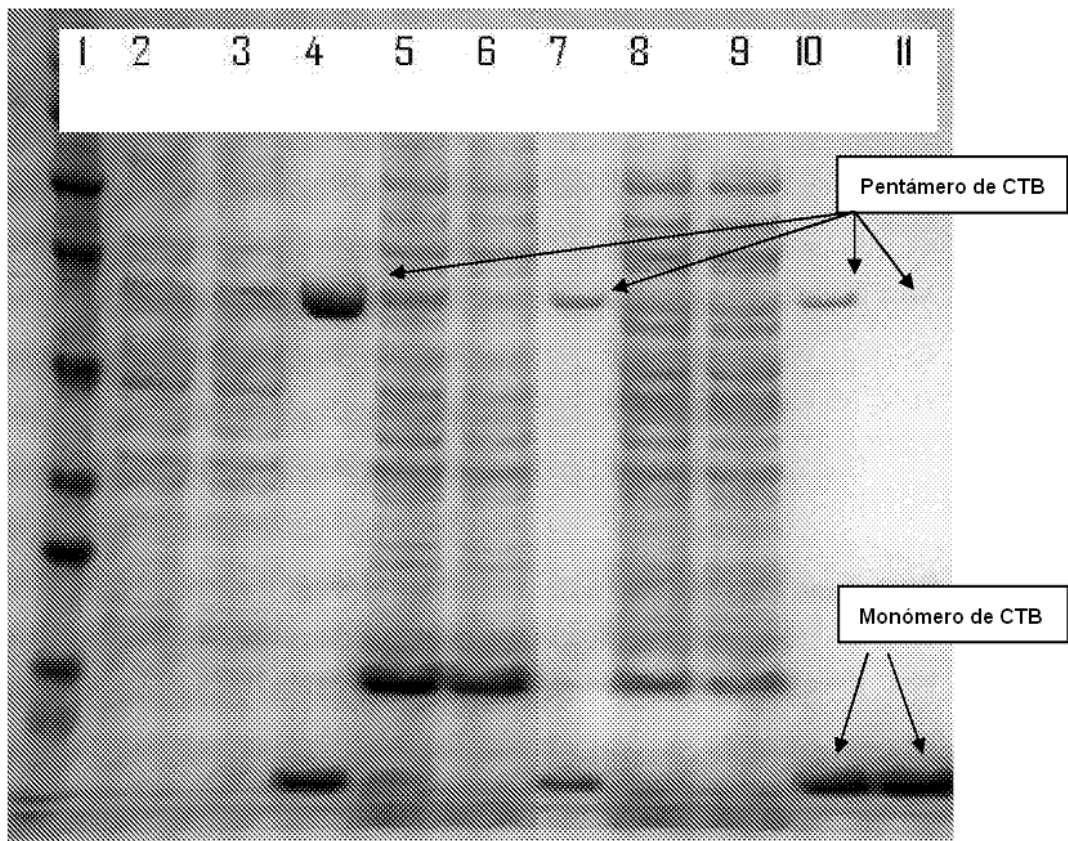


FIG. 44