

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 375 018**

51 Int. Cl.:
C07K 16/24 (2006.01)
C07K 16/00 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/32 (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)
G01N 33/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **08863248 .4**
96 Fecha de presentación: **17.12.2008**
97 Número de publicación de la solicitud: **2231706**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **29.09.2010**

54 Título: **BIOCINÉTICA DE POLIPÉPTIDOS DE ELIMINACIÓN RÁPIDA.**

30 Prioridad:
19.12.2007 US 2972

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
24.02.2012

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
24.02.2012

73 Titular/es:
GENERAL ELECTRIC COMPANY
1 River Road
Schenectady, NY 12345, US

72 Inventor/es:
LENDEL, Christofer;
GUNNERIUSSON, Elin;
LINDBORG, Malin;
LEE, Brian Duh-Lan;
CASTLE, Jason William;
SYUD, Faisal Ahmed y
MARINO, Michael Ernest

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

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).

ES 2 375 018 T3

DESCRIPCIÓN

Biocinética de polipéptidos de eliminación rápida

Campo

5 En general el campo de la invención se refiere a polipéptidos que son capaces de unirse a una diana. Más específicamente, el campo de la invención se refiere a agentes de unión de bajo peso molecular que demuestran una biocinética favorable y a procedimientos de formación de imágenes que usan dichos agentes de unión de eliminación rápida.

Antecedentes

10 La unión específica de una diana en una muestra puede lograrse usando una diversidad de agentes de unión, por ejemplo, anticuerpos, aficuerpos, anticalinas, aptámeros. Los agentes de unión de alto peso molecular tales como anticuerpos se desaprueban para algunas aplicaciones *in vivo* (por ejemplo, para aplicaciones de formación de imágenes) porque necesitan mucho tiempo para migrar al sitio diana, demuestran una escasa penetración tisular, permanecen en el sujeto durante mucho tiempo, se eliminan principalmente a través del hígado y es más probable que produzcan una respuesta inmune que agentes de unión de menor tamaño. Por consiguiente, para algunas
15 aplicaciones *in vivo*, se prefieren agentes de unión de bajo peso molecular de eliminación rápida para una migración rápida a un sitio diana, penetración tisular y eliminación rápida del cuerpo.

20 Un agente de unión de eliminación rápida es el aficuerpo, un polipéptido de 7 kDa basado en el dominio z de la proteína A. Todos los aficuerpos comparten un plegamiento proteico de triple hélice común. Los aficuerpos contra nuevas dianas se generan por aleatorización de los 13 restos de aminoácidos en la superficie de unión a IgG usando técnicas de presentación en fago o levadura. Las proteínas maduras por afinidad se producen como un solo dominio de 7 kDa (aficuerpo monovalente) o como dos dominios de 7 kDa en tándem (aficuerpo bivalente).

25 Los agentes de unión de eliminación rápida que están particularmente bien adaptados para algunas aplicaciones *in vivo* debido a su penetración tisular y baja antigenicidad, pueden no obstante eliminar un cuerpo de un modo que interfiera con aplicaciones deseadas. Por ejemplo, la eliminación a través del hígado podría interferir con aplicaciones de formación de imágenes basadas en el hígado; la eliminación a través del riñón de un agente de unión radiomarcado podría dar como resultado una dosis de radiación inaceptable en los riñones; o la eliminación rápida desde la sangre podría tener que ralentizarse para conseguir la penetración de tejidos difíciles de acceder. El documento de JEONG y col. vol. 21, 107, 1 Oct. 1994, páginas 935-940 estudia el efecto en el pl sobre la biodistribución *in vivo* de avidina, y también aborda la cuestión de reducir la asimilación hepática y renal.

30 Por consiguiente, existe la necesidad de procedimientos para modificar la biocinética de agentes de unión de eliminación rápida. Además, existe la necesidad de agentes de unión de eliminación rápida afinados biocinéticamente para la formación de imágenes *in vivo* que puedan usarse para una diversidad de modalidades de formación de imágenes para la formación de imágenes preclínicas o de diagnóstico.

Breve descripción

35 En el presente documento se proporcionan procedimientos de reducción de la asimilación hepática de un polipéptido de eliminación rápida que se une específicamente a una diana, que comprenden: proporcionar un polipéptido que se une específicamente a una diana; y sustituir al menos un resto de aminoácido básico o al menos un resto de aminoácido neutro con un resto de aminoácido ácido para producir un polipéptido modificado, en los que el polipéptido modificado demuestra un punto isoelectrico de al menos 0,05-0,1 puntos de pH menos que el punto isoelectrico del polipéptido nativo.
40

En algunas realizaciones, la semivida en sangre del polipéptido modificado es sustancialmente la misma que la semivida en sangre del polipéptido nativo y la asimilación hepática del polipéptido modificado se reduce sustancialmente respecto al polipéptido nativo.

45 En algunas realizaciones, el polipéptido consiste esencialmente en aproximadamente 60 restos de aminoácidos que comprenden un plegamiento alfa helicoidal o aproximadamente 120 restos de aminoácidos que comprenden un par de segmentos de plegamiento alfa helicoidal. Como alternativa, el polipéptido puede consistir esencialmente en aproximadamente 160 restos de aminoácidos que comprenden un plegamiento de tipo barril beta.

En todas las realizaciones, el polipéptido modificado conserva la afinidad de unión por su diana nativa y, por lo tanto, se une a la diana con una especificidad de al menos el 50%, 75%, 90% del polipéptido no modificado.

50 En algunas realizaciones, los restos de aminoácidos básicos se seleccionan de histidina, lisina y arginina y los restos de aminoácidos ácidos se seleccionan de ácido aspártico o ácido glutámico. Los restos de aminoácidos neutros pueden seleccionarse de cualquier resto de aminoácido distinto de histidina, lisina, arginina, ácido aspártico o ácido glutámico y los restos de aminoácidos ácidos se seleccionan de ácido aspártico o ácido glutámico, y derivados de los mismos.

Puede añadirse un generador de señal tal como un generador de señal opaca radiactiva, fluorescente, magnética, radiopaca (por ejemplo, ^{99m}Tc o ^{18}F), luminescente, fosforescente, isotópica o de ultrasonidos al polipéptido modificado. Opcionalmente, o además, se añade un resto de dirección al polipéptido modificado.

5 También se proporcionan en el presente documento polipéptidos generados de acuerdo con los procedimientos desvelados, incluyendo un polipéptido aislado que consiste esencialmente en los restos de aminoácidos de las SEC ID números 1-9. También se proporcionan composiciones farmacéuticas que comprenden los polipéptidos modificados de la invención.

También se proporcionan en el presente documento agentes de formación de imágenes *in vivo* que comprenden el polipéptido modificado y el generador de señal.

10 También se proporcionan en el presente documento procedimientos de reducción de las interferencias de fondo en el hígado durante un procedimiento de formación de imágenes *in vivo* usando un polipéptido que se une a una diana.

FIGURAS

15 La FIG. 1 muestra la eliminación sanguínea para 5 aficuerpos monoméricos que se han modificado de acuerdo con las enseñanzas del presente documento. El porcentaje de la cantidad inyectada total de aficuerpo que queda en la sangre (en circulación) se muestra en el eje y. El tiempo post-inyección se muestra en el eje x. Los datos demuestran que a pesar de la variación de secuencia, los aficuerpos muestran unas características de eliminación similares.

20 La FIG. 2 muestra la eliminación renal y hepática para 5 aficuerpos monoméricos. El porcentaje de la cantidad inyectada total de aficuerpo que queda en cada gramo de tejido se muestra para el hígado (panel 2A) y para el riñón (panel 2B), representado frente al tiempo transcurrido después de la inyección. Los datos demuestran un amplio intervalo de valores de retención, que muestran que la variabilidad de secuencia dentro del panel de aficuerpos es suficiente para dirigirlos al hígado o a los riñones para su eliminación.

25 La FIG. 3 muestra la correlación de la eliminación de aficuerpos mediado por hígado y riñón. Los dos están inversamente correlacionados, mostrando que los aficuerpos se eliminan del torrente sanguíneo tanto por el hígado como por los riñones, y que la variación de secuencia en este panel de aficuerpos es suficiente para desplazar esta eliminación de un modo u otro.

30 La FIG. 4 muestra la correlación de la asimilación hepática y del punto isoelectrico. El punto isoelectrico y la retención hepática observada a las 2 horas post-inyección se representan y se ajustan con una regresión lineal. La correlación tiene un valor de r cuadrado de más de 0,98.

La FIG. 5 muestra la eliminación sanguínea para 2 aficuerpos diméricos. El porcentaje de la cantidad inyectada total de aficuerpo que queda en la sangre (en circulación) se muestra en el eje y. El tiempo post-inyección se muestra en el eje x. Los datos demuestran que a pesar de la variación de secuencia, los aficuerpos muestran características de eliminación similares.

35 La FIG. 6 muestra la eliminación renal y hepática para aficuerpos diméricos. El porcentaje de la cantidad inyectada total de aficuerpo que queda en cada gramo de tejido se muestra para hígado (izquierda) y riñón (derecha) representado frente al tiempo transcurrido después de la inyección. Los datos demuestran un amplio intervalo de valores de retención, demostrando que la variabilidad de secuencia dentro del panel de aficuerpos es suficiente para dirigirlos al hígado o a los riñones para su eliminación.

40 La FIG. 7 muestra la correlación de la asimilación hepática y del punto isoelectrico. El punto isoelectrico y la retención hepática observada a las dos 2 horas post-inyección confirman que el uso del punto isoelectrico para dirigir la eliminación lejos de órganos específicos es eficaz y que puede usarse también para fines de selección descendente o selección de agente candidato principal.

Descripción detallada

45 En un primer aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de reducción de la asimilación hepática *in vivo* de un polipéptido que se une específicamente a una diana, que comprende:

(a) proporcionar un polipéptido que se une específicamente a una diana; y

(b) sustituir al menos un resto de aminoácido básico o al menos un resto de aminoácido neutro del polipéptido nativo de la etapa (a) con un resto de aminoácido ácido para producir un polipéptido modificado,

50 en el que el polipéptido modificado demuestra un punto isoelectrico de al menos 0,05-0,1 puntos de pH menos que el punto isoelectrico del polipéptido nativo de la etapa (a).

El término "aminoácido" se refiere a aminoácidos de origen natural y sintéticos, así como análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos que funcionan de una forma similar a los aminoácidos de origen natural. Los aminoácidos de origen natural son los codificados por el código genético, así como los aminoácidos que se modifican posteriormente, por ejemplo, hidroxiprolina, γ -carboxiglutamato, O-fosfoserina, fosfotreonina y fosfotirosina. Las categorías de aminoácidos definidas en el presente documento no son mutuamente excluyentes. Por lo tanto, los aminoácidos que tienen cadenas laterales que presentan dos o más propiedades físico-químicas pueden incluirse en múltiples categorías. Por ejemplo, las cadenas laterales de aminoácidos que tienen restos aromáticos que están adicionalmente sustituidos con sustituyentes polares, tales como Tyr (Y), pueden presentar tanto propiedades hidrófobas aromáticas como propiedades hidrófilas o polares, y por lo tanto pueden incluirse en las categorías tanto aromática como polar. La categorización apropiada de cualquier aminoácido será evidente para los expertos en la materia, a la luz de la divulgación detallada proporcionada en el presente documento. La expresión "aminoácido ácido" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de cadena lateral de menos de 7. Los aminoácidos básicos tienen típicamente cadenas laterales cargadas negativamente a pH fisiológico debido a la ionización del grupo ácido. La expresión "aminoácido básico" se refiere a un aminoácido hidrófilo que tiene un valor de pK de cadena lateral de más de 7. Los aminoácidos básicos tienen típicamente cadenas laterales cargadas positivamente a pH fisiológico debido a la asociación de ión hidronio. Los aminoácidos básicos codificados genéticamente incluyen His (H), Arg (R) y Lys (K). La expresión "aminoácido neutro" se refiere a aminoácidos que no son básicos ni ácidos, y que por lo tanto no se ionizan eficazmente en condiciones fisiológicas. Se detallan ejemplos específicos de aminoácidos ácidos, básicos y neutros en la Tabla 2 (a continuación).

La expresión "diana de unión" se refiere a cualquier agente que pueda unirse por un agente de unión. Una diana de unión puede incluir uno o más de péptidos, proteínas (por ejemplo, anticuerpos), ácidos nucleicos (por ejemplo, polinucleótidos, ADN, ARN o aptámeros); polisacáridos (por ejemplo, lectinas o azúcares), lípidos, enzimas, sustratos enzimáticos, ligandos, receptores, antígenos o haptenos. La diana puede incluir un resto químico discreto o un componente tridimensional (por ejemplo, estructuras 3D que surgen del plegamiento de péptidos).

El término "unión" se refiere a la capacidad de un agente de unión para unirse preferentemente a una diana con una afinidad que es al menos dos veces superior a su afinidad por su unión a una diana inespecífica (por ejemplo, BSA o caseína) distinta de la diana predeterminada o una diana estrechamente relacionada. Los agentes de unión proporcionados en el presente documento se unen a sus respectivas dianas con una afinidad con un valor de KD menor de aproximadamente $1 \times 10^6 \text{ M}^{-1}$, más preferentemente menor de aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$ y más preferentemente menor de aproximadamente $1 \times 10^8 \text{ M}^{-1}$. De forma similar, la expresión "unión específica" se refiere a la propiedad de un agente de unión para unirse a un antígeno predeterminado con una afinidad con un valor de KD menor de aproximadamente $1 \times 10^7 \text{ M}^{-1}$.

Como se usa en el presente documento, la expresión "semivida en sangre" se refiere al tiempo necesario para que la concentración en plasma de un agente disminuya la mitad cuando la eliminación es de primer orden o pseudo-primer orden. En el caso de múltiples fases de degradación, la expresión "semivida en sangre" se refiere a la semivida aparente (si las semividas de degradación para diferentes fases son similares) o la semivida dominante (que representa la mayor parte de la eliminación) si las semividas diferentes son distintas.

Como se usa en el presente documento, el término "fluoróforo" se refiere a un compuesto químico, que cuando se excita por exposición a una longitud de onda de luz particular, emite luz (a una longitud de onda diferente). Los fluoróforos pueden describirse en términos de su perfil de emisión o "color". Los fluoróforos verdes (por ejemplo Cy3, FITC y Oregon Green) pueden caracterizarse por su emisión a longitudes de onda generalmente en el intervalo de 515-540 nanómetros. Los fluoróforos rojos (por ejemplo, Texas Red, Cy5 y tetrametilrodamina) pueden caracterizarse por su emisión a longitudes de onda generalmente en el intervalo de 590-690 nanómetros. Los ejemplos de fluoróforos incluyen: ácido 4-acetamido-4'-isotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, acridina; derivados de acridina e isotiocianato de acridina; ácido 5-(2'-aminoetil)aminonaftaleno-1-sulfónico (EDANS); 4-amino-N-[3-vinilsulfonil]fenil]naftalimida-3,5 disulfonato (Lucifer Yellow VS); N-(4-anilino-1-naftil)maleimida; antranilamida; Amarillo Brillante; cumarina; derivados de cumarina; 7-amino-4-metilcumarina (AMC, Coumarin 120); 7-amino-trifluorometilcumarina (Coumarin 151); cianosina; 4',6'-diaminidino-2-fenilindol (DAPI), 5',5"-dibromopirrogallol-sulfonaftaleína (Bromopyrogallol Red); 7-dietilamino-3-(4'-isotiocianatofenil)4-metilcumarina; ácido 4,4'-diisotiocianatodihidro-estilbeno-2,2'-disulfónico, ácido 4,4'-diisotiocianatoestilbeno-2,2'-disulfónico, cloruro de 5-[dimetilamino]naftaleno-1-sulfonilo (DNS, cloruro de dansilo); eosina; derivados de eosina tales como isotiocianato de eosina; eritrosina; derivados de eritrosina tales como eritrosina B e isotiocianato de eritrosina; etidio; fluoresceína y derivados tales como 5-carboxifluoresceína (FAM); 5-(4,6-diclorotriazin-2-il)aminofluoresceína (DTAF); 2',7'-dimetoxi-4',5'-dicloro-6-carboxifluoresceína (JOE), isotiocianato de fluoresceína (FITC); QFITC (XRITC); derivado de fluorescamina (fluorescente tras la reacción con aminas); IR144; In1446; isotiocianato de verde malaquita; 4-metilumbeliferona; orto cresol-ftaleína; nitrotirosina; pararosanilina; Rojo Fenol, B-ficoeritrina; derivado de o-ftaldialdehído (fluorescente tras la reacción con aminas); pireno y derivados tales como pireno, butirato de pireno y butirato de succinimidil 1-pireno; Rojo Reactivo 4 (Cibacron .RTM. Brilliant Red 3B-A), rodamina y derivados tales como 6-carboxi-X-rodamina (ROX), 6-carboxirrodamina (R6G), sulfonil cloruro de lisamina rodamina B, rodamina (Rhod), rodamina B, rodamina 123, isotiocianato de rodamina X, sulforrodamina B, sulforrodamina 101 y derivado de sulfonil cloruro de sulforrodamina 101 (Texas Red); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); tetrametil rodamina, isotiocianato de tetrametil rodamina (TRITC); riboflavina; ácido rosólico y derivados de quelatos de

lantánidos, puntos cuánticos, cianinas y escuarainas.

Como se usa en el presente documento, la expresión "punto isoeléctrico" se refiere al pH en el que una molécula no lleva carga eléctrica neta. Los puntos isoeléctricos pueden determinarse experimentalmente o pueden calcularse para polipéptidos basándose en la secuencia primaria.

- 5 La expresión "polipéptido nativo" se refiere al polipéptido que se une específicamente a una diana en forma no modificada.

Como se usa en el presente documento, la expresión "ión metálico paramagnético", "ión paramagnético" o "ión metálico" se refiere a un ión metálico que está magnetizado en paralelo o antiparalelo a un campo magnético en una medida proporcional al campo. Generalmente, estos son iones metálicos que tienen electrones desapareados. Los ejemplos de iones metálicos paramagnéticos adecuados incluyen, pero sin limitación, gadolinio III [Gd^{3+} o $Gd(III)$], hierro III [Fe^{3+} o $Fe(III)$], manganeso II [Mn^{2+} o $Mn(II)$], itrio III [Yt^{3+} o $Yt(III)$], disprosio [Dy^{3+} o $Dy(III)$] y cromo [$Cr(III)$ o Cr^{3+}]. En algunas realizaciones, el ión paramagnético es el átomo de lantánido Gd (III), debido a su elevado momento magnético ($u = 6.3BM_2$), un estado fundamental electrónico simétrico (S_8) y su autorización actual para su uso diagnóstico en mamíferos.

- 10
15 La expresión "porcentaje de identidad de secuencia" se refiere al valor determinado por comparación de dos secuencias óptimamente alineadas a lo largo de una ventana de comparación, en la que la porción de la secuencia polinucleotídica o polipeptídica en la ventana de comparación puede comprender adiciones, sustituciones o deleciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones, sustituciones o deleciones) para un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula por determinación del número de posiciones en las que aparece la base de ácido nucleico o resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones emparejadas, división del número de posiciones emparejadas por el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicación del resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia.

25 Los términos "proteína", "péptido" y "polipéptido" se usan en el presente documento para describir cualquier cadena de aminoácidos, independientemente de la longitud o de la modificación post-traducciona (por ejemplo, glicosilación o fosforilación). Por lo tanto, los términos pueden usarse indistintamente en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos. Los términos también son aplicables a polímeros de aminoácidos en los que uno, o más restos de aminoácidos, es un mimético químico artificial de un aminoácido de origen natural correspondiente. Por lo tanto, el término "polipéptido" incluye proteínas de longitud completa de origen natural, así como polipéptidos producidos recombinantemente o sintéticamente que corresponden a una proteína de longitud completa de origen natural o a dominios o porciones particulares de una proteína de origen natural. El término también incluye proteínas maduras, que tienen una metionina amino-terminal añadida para facilitar la expresión en células procariontas. Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente o sintetizarse por procedimientos de ADN recombinante; o pueden purificarse a partir de tejidos en los que se expresan de forma natural, de acuerdo con procedimientos de purificación bioquímicos convencionales.

35 Como se usa en el presente documento, la expresión "condiciones fisiológicas" se refiere a condiciones presentes en general en un cuerpo de mamífero. Por lo tanto, las condiciones fisiológicas significan un pH de aproximadamente 6,5 a aproximadamente 7,5 y una temperatura que varía de aproximadamente 25°C a aproximadamente 37°C.

40 Como se usa en el presente documento, el término "radionúclido" se refiere en general a cualquier átomo que puede rastrearse por detección radiactiva después de su introducción en un sujeto. Los átomos radiactivos representativos incluyen: flúor-18, actinio-225, bismuto-212, arsénico-72, indio-110, indio-111, indio-113m, galio-67, galio-68, estroncio-83, circonio-89, rutenio-95, rutenio-97, rutenio-103, rutenio-105, mercurio-107, mercurio-203, renio-186, renio-188, telurio-121m, telurio-122m, telurio-125m, tulio-165, tulio-167, tulio-168, tecnecio-94m, tecnecio-99m, plata-111, platino-197, paladio-109, cobre-62, cobre-64, cobre-67, itrio-86, itrio-90, escandio-47, samario-153, lutecio-177, rodio-105, praseodimio-142, praseodimio-143, terbio-161, holmio-166, oro-199, cobalto-57, cobalto-58, cromo-51, hierro-59, selenio-75, talio-201 o iterbio-169.

50 La expresión "armazón de anticalina" se refiere a los restos de aminoácidos del polipéptido que proporcionan la estructura tridimensional de un barril β cilíndrico compuesto por ocho cadenas β antiparalelas conectadas por uno o más bucles para situar adecuadamente un extremo del barril con bucles de unión a diana de modo que se permite la unión a una diana.

55 La expresión "armazón de aficuerpo" con referencia, se refiere en general a los restos de aminoácidos del polipéptido que proporcionan la estructura tridimensional para situar adecuadamente los restos de aminoácidos de la interfaz de unión del polipéptido de modo que se permita la unión a una diana. Cualquier secuencia que conserve el sitio de unión y la actividad de unión con la misma topología (el plegamiento de triple hélice del dominio z) está basada en el armazón de aficuerpo.

La expresión "identidad sustancial" u "homólogo" en sus diversas formas gramaticales en el contexto de péptidos indica que un péptido comprende una secuencia que tiene una identidad deseada, por ejemplo, una identidad de

secuencia de al menos el 80%, 85%, 90% o 95% con la secuencia de referencia a lo largo de una ventana de comparación especificada.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "generador de señal" se refiere a una molécula capaz de proporcionar una señal detectable usando una o más técnicas de detección (por ejemplo, espectrometría, calorimetría, espectroscopía o inspección visual). Los ejemplos adecuados de una señal detectable pueden incluir una señal óptica y una señal eléctrica, o una señal radiactiva. Los ejemplos de generadores de señales útiles en los procedimientos de la invención incluyen, por ejemplo, un cromóforo, un fluoróforo, una etiqueta activa en Raman, un marcador radiactivo, una enzima, un sustrato enzimático o combinaciones de los mismos. Los radioisótopos adecuados incluyen: ¹¹C, ¹⁸F, ³²P, ³⁵S, ¹²³I, ¹²⁴I, ¹²⁵I, ¹³¹I, ⁵¹Cr, ³⁶Cl, ⁵⁷Co, ⁵⁹Fe, ⁷⁵Se y ¹⁵²Eu. También son marcadores útiles isótopos de halógenos (tales como cloro, flúor, bromo y yodo), y metales incluyendo tecnecio, itrio, renio e indio. Los radiometales preferidos que pueden usarse como generadores de señales incluyen: ^{99m}Tc, ¹¹¹In, ⁹⁷Ru, ⁶⁷Cu, ⁶⁷Ga, ⁶⁸Ga, ⁷²As, ⁸⁹Zr y ²⁰¹Tl. Los radiohalógenos preferidos que pueden usarse como generadores de señales incluyen: ¹²³I e ¹³¹I. Los radioisótopos para la formación de imágenes de diagnóstico *in vivo* por tomografía por emisión de positrones ("PET") incluyen ¹¹C, ¹⁸F e ¹²⁴I. Los marcadores paramagnéticos pueden ser iones metálicos que están presentes en forma de complejos metálicos o partículas de óxido de metal. Los isótopos paramagnéticos adecuados pueden incluir ¹⁵⁷Gd, ⁵⁹Mn, ¹⁶²Dy, ⁵²Cr y ⁵⁶Fe.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "resto de dirección" se refiere a una especie química (es decir, una molécula orgánica o una biomolécula) que reconoce y se une específicamente a una o más proteínas en un complejo de proteína-proteína. En algunas realizaciones, el resto diana es capaz de una unión a fragmentos proteicos próxima o adyacente a las porciones que interaccionan de forma transitoria (por ejemplo, interaccionan solamente durante segundos o minutos).

Realizaciones

25 En el presente documento se proporcionan procedimientos para afinar la biocinética de una secuencia proteica por alteración del punto isoeléctrico para aumentar o disminuir el metabolismo hepático y/o renal *in vivo*. También se proporcionan polipéptidos que se han alterado usando los presentes procedimientos para demostrar una biocinética mejorada. Se proporcionan además procedimientos de formación de imágenes *in vivo* (por ejemplo, formación de imágenes preclínicas o formación de imágenes de diagnóstico) usando los polipéptidos proporcionados en el presente documento.

30 En general, los procedimientos proporcionados en el presente documento permiten que un experto en la materia afine la biocinética de un polipéptido por alteración del punto isoeléctrico del polipéptido. Los procedimientos disponibles para la sustitución de aminoácidos incluyen mutagénesis del ADNc que codifica el polipéptido descrito por varios procedimientos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo mutagénesis aleatoria, mutagénesis dirigida y mutagénesis usando PCR propensa a errores. Un procedimiento para introducir sustituciones aleatorias en las posiciones de la interfaz de unión es el uso de ADN que contenga cebadores degenerados en los codones de la sustitución deseada. Como alternativa, los polipéptidos pueden generarse usando técnicas de síntesis de péptidos sintéticos convencionales.

40 La Tabla 1 (a continuación) proporciona directrices generales para tipos de sustitución en diversos tipos de agentes de unión de eliminación rápida. La columna de desplazamiento indica en qué dirección se desplazará el punto isoeléctrico para el tipo de sustitución correspondiente.

Tabla 1

Original	Sustitución	Desplazamiento	Impacto
Básico	Ácido	Negativo	Elevado
Neutro	Ácido	Negativo	Medio
Ácido	Básico	Positivo	Elevado
Neutro	Básico	Positivo	Medio

La Tabla 2 a continuación proporciona caracterizaciones de pH de aminoácidos representativos.

Tabla 2

Aminoácido	Carga
Alanina (A)	Neutra
Fenilalanina (F)	Neutra

(continuación)

Aminoácido	Carga
Glicina (G)	Neutra
Isoleucina (I)	Neutra
Leucina (L)	Neutra
Metionina (M)	Neutra
Asparagina (N)	Neutra
Prolina (P)	Neutra
Glutamina (Q)	Neutra
Serina (S)	Neutra
Selenocisteína (U)	Neutra
Valina (V)	Neutra
Triptófano (W)	Neutra
Tirosina (Y)	Neutra
Cisteína (C)	Ácida
Ácido aspártico (D)	Ácida
Ácido glutámico (E)	Ácida
Lisina (K)	Básica
Arginina (R)	Básica
Treonina (T)	Ácida débil
Histidina (H)	Ácida débil

Aunque se prefiere que las porciones de armazón de los polipéptidos no se cambien para conservar la estructura terciaria, también son posibles mutaciones conservativas y no conservativas en restos de aminoácidos del armazón que no den como resultado una pérdida de unión.

- 5 Las secuencias polipeptídicas mencionadas en el presente documento se enumeran en la Tabla 3 a continuación. Los polipéptidos identificados como SEC ID N°: 1-8 se dirigen todos a PDGF-R β :

Tabla 3

SEC ID N°	Secuencia	Identificador	Restos
1	GSSHHHHHHLQVDNKFNERQVAAAEI DALPNLNRGQWNAFIASLVDDPSQSANL LAEAKKLNDQAQPKVD	Z1977	71
2	GSSHHHHHHLQVDNKFNELSDAAQEI DSLPNLNRSQWNAFIKSLIDDPQSANLL AEAKKLNDQAQPKVD	Z1978	71
3	GSSHHHHHHLQVDNKFNERREAAKEI DSLPNLNRTQWNAFIRSLADDPQSANL LAEAKKLNDQAQPKVD	Z1980	71
4	GSSHHHHHHLQVDNKFNELVRAAQEI DELPNLNRGQWNAFIKSLVDDPSQSANL LAEAKKLNDQAQPKVD	Z1982	71

(continuación)

SEC ID N°	Secuencia	Identificador	Restos
5	GSHHHHHHLQVDNKFNKERLKAAAEI DALPNLNRKQWNAFISLRDDPSQSANL LAEAKKLNDQAQPKVD	Z1995	71
6	GSHHHHHHLQVDNKFNKELIEAAAEIDA LPNLNRRQWNAF1KSLVDDPSQSANLLA EAKKLNDQAQPKVDC	Z2465	71
7	GSHHHHHHLQVDNKFNKELIAAAAEIDR LPNLNRVQWNAFIKSLVDDPSQSANLLA EAKKLNDQAQPKVDC	Z2477	71
8	GSHHHHHHLQVDNKFNICELVKAAAEID ALPNLNRQWNAFIKSLVDDPSQSANLL AEAKKLNDQAQPKVDC	Z2483	71

Características de rendimiento

La Tabla 4 proporciona los resultados del análisis de eliminación en sangre para anticuerpos monoméricos, correspondientes a la representación mostrada en la FIG. 1, que demuestra cuantitativamente que cinco anticuerpos no modificados presentan un comportamiento en sangre similar a pesar de la variación de secuencia.

5

Tabla 4

Aficuerpo	t _{1/2} (min)	AUC (0-120)	R2 (t _{1/2} ajuste)
Z1980	1,4570	542,7	0,9998
Z1978	1,4040	476,3	0,9997
Z1995	1,4620	495,5	0,9998
Z1977	1,6460	560,9	0,9996
Z1982	1,7720	548,3	0,9987

La Tabla 5 proporciona los resultados de un análisis de eliminación sanguínea para anticuerpos bivalentes, correspondientes a la representación mostrada en la FIG. 5, que demuestra cuantitativamente que los dos anticuerpos bivalentes presentan un comportamiento en sangre similar a pesar de la variación de secuencia.

10

Tabla 5

Aficuerpo	t _{1/2} (min)	AUC (0-120)	R2 (t _{1/2} ajuste)
zHer2	1,706	725	0,9995
ZTNF	1,767	618	0,9968

En general, los agentes de unión de eliminación rápida proporcionados en el presente documento pueden usarse para realizar las funciones para cuya realización se usan otros agentes de unión (por ejemplo, anticuerpos). Por lo tanto, los agentes de unión de eliminación rápida pueden usarse, por ejemplo, como agentes de formación de imágenes para diagnóstico *in vivo* —como se describe en el segundo aspecto (a continuación). Cuando se usan *in vivo*, los agentes de unión de eliminación rápida pueden modificarse con un generador de señal apropiado (por ejemplo, ¹⁸F para formación de imágenes de PET o ^{99m}Tc para formación de imágenes de SPECT) para la modalidad de formación de imágenes seleccionada.

15

Los procedimientos desvelados proporcionan diversas ventajas sobre otros procedimientos para controlar la eliminación y el metabolismo. La modificación post-traducciona típica (por ejemplo, pegilación o glicosilación) depende de las modificaciones químicas realizadas en una proteína después de su producción. La modificación post-traducciona puede provocar que las proteínas se agreguen o se desplieguen, y por lo tanto pierdan su actividad. Además, las modificaciones post-traduccionales producen frecuentemente mezclas heterogéneas de proteínas, una característica que es indeseable para formulaciones inyectables. Las mezclas esencialmente homogéneas de

20

proteínas producidas usando los procedimientos desvelados en el presente documento pueden introducirse en un sujeto sin las etapas de enriquecimiento adicionales costosas y que llevan mucho tiempo que son necesarias para las mezclas de proteínas heterogéneas producidas usando técnicas de modificación post-traducciona

5 Pueden añadirse una o más secuencias adicionales a los extremos terminales para conferir una funcionalidad seleccionada. Por lo tanto, pueden añadirse secuencias adicionales a uno o ambos extremos terminales para facilitar la purificación o aislamiento de un agente de unión, en solitario o acoplado a una diana de unión (por ejemplo, por adición de una etiqueta de his al polipéptido). Puede incorporarse un generador de señal en el polipéptido en la posición terminal o en una posición interna. Los ejemplos adecuados de generadores de señales pueden incluir un cromóforo, un fluoróforo, una etiqueta activa en Raman, un marcador radiactivo, una enzima, un sustrato enzimático o combinaciones de los mismos. Los ejemplos adecuados de una señal detectable pueden incluir una señal óptica, y una señal eléctrica o una señal radiactiva.

10 En un segundo aspecto, la presente invención proporciona los polipéptidos modificados como se describen en el primer aspecto. En un tercer aspecto, los polipéptidos modificados se proporcionan como una composición farmacéutica (como se describe a continuación). Los aspectos preferidos del polipéptido modificado y del generador de señal del segundo y tercer aspectos son como se han descrito para el primer aspecto (anteriormente).

15 Las composiciones farmacéuticas de la presente invención pueden administrarse a seres humanos y otros animales por vía parenteral. El término de administración "parenteral", como se usa en el presente documento, se refiere a modos de administración incluyendo inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intraesternal, subcutánea e intraarticular. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención para inyección parenteral comprenden soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas o no acuosas farmacéuticamente aceptables, así como polvos estériles para su reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles justo antes del uso. Los ejemplos de vehículos, diluyentes, disolventes o excipientes acuosos y no acuosos adecuados incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (tales como aceite de oliva), y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Puede mantenerse una fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

20 Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes dispersantes. La prevención de la acción de microorganismos puede asegurarse mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sórbico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos tales como azúcares, cloruro sódico y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable puede provocarse por la inclusión de agentes que retrasen la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

25 En un cuarto aspecto, la presente invención proporciona un agente de formación de imágenes de diagnóstico que comprende el polipéptido modificado del primer aspecto, que tiene unido al mismo un generador de señal. Los aspectos preferidos del polipéptido modificado y del generador de señal son como se han descrito para el primer aspecto. Preferentemente, el agente de formación de imágenes se proporciona como una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente.

30 En un quinto aspecto, la presente invención proporciona un procedimiento de formación de imágenes *in vivo* de una diana, comprendiendo dicho procedimiento:

- (a) introducir el agente de formación de imágenes de diagnóstico del cuarto aspecto en un sujeto mamífero como parte de un procedimiento de formación de imágenes; y
- (c) formar imágenes del sujeto.

35 Para evaluar los niveles de diana, se administra un agente de formación de imágenes marcado a un sujeto. Típicamente, el sujeto es un mamífero y es preferentemente un ser humano. El agente de formación de imágenes marcado se administra a un sujeto por un medio médicamente apropiado. Después de dejar un tiempo de eliminación de acuerdo con el marcador seleccionado, la cantidad de agente de formación de imágenes unido a diana se determina por medición de la señal emitida usando una modalidad de formación de imágenes. Los análisis visuales y cuantitativos de las imágenes resultantes proporcionan una evaluación precisa de los niveles globales y locales de diana en el sujeto.

40 El procedimiento de formación de imágenes es para su uso en un procedimiento de evaluación no invasiva de los niveles de diana para diagnosticar enfermedades asociadas con un biomarcador particular, por ejemplo, formar imágenes de cáncer con c-met o formar imágenes de enfermedad hepática y cardiovascular con PDGF-RB. Los procedimientos de afinación biocinética desvelados aumentan cualitativamente y cuantitativamente la determinación de los niveles de diana *in vivo* y pueden usarse para determinar la eficacia de terapias relacionadas usadas para enfermedades particulares.

Ejemplos

La práctica de la invención se entenderá más completamente a partir de los ejemplos siguientes, que se presentan en el presente documento como ilustración. La invención proporciona un procedimiento por el que la eliminación rápida de agentes de unión desde la sangre puede dirigirse a diferentes órganos cambiando la secuencia de proteína para efectuar un cambio en el punto isoeléctrico. Los ejemplos a continuación demuestran cuatro situaciones diferentes en las que el punto isoeléctrico de agentes de unión polipeptídicos se varió y se demostró que dirigía la eliminación sanguínea al órgano deseado.

Materiales y procedimientos

Para los experimentos siguientes, se usaron tres tipos de proteínas: un aficuerpo monovalente de 7 kDa, un aficuerpo bivalente de 14 kDa. Las tres proteínas son proteínas obtenidas por ingeniería genética con afinidades hacia dianas específicas. Se usaron múltiples conjuntos de aficuerpos con estructura proteica secundaria y terciaria muy similar, pero secuencias diferentes, para los estudios actuales. Las proteínas se produjeron de forma recombinante y se purificaron. Se usaron ocho aficuerpos de 7 kDa de secuencia variable, dos aficuerpos de 14 kDa de secuencia variable.

Variaciones de secuencia. Las secuencias proteicas descritas en el presente documento se variaron usando presentación en fago (por ejemplo, como se describe por G.P. Smith en "Filamentous Fusion Phage: Novel Expression Vectors That Display Cloned Antigens on the Virion Surface", Science, 228, págs. 1315-1317, 1985). Las secuencias de aficuerpo producidas recombinantemente pueden variarse usando una diversidad de otras técnicas también, incluyendo mutagénesis dirigida, PCR degenerada, mutagénesis multisitio, truncamiento y otras técnicas microbiológicas para generar mutantes, variantes o sustituciones de una proteína existente. La naturaleza de las sustituciones realizadas dependería del cambio deseado en las propiedades de proteínas. Las proteínas también pueden producirse sintéticamente (por ejemplo, en un sintetizador de péptidos) y una diversidad de técnicas químicas para sustituir aminoácidos (por ejemplo, incorporación directa de aminoácidos sustituidos o modificados durante la síntesis) son apropiadas para este escenario. Los aminoácidos que no son de origen natural, si se desea, se sustituyen más fácilmente en una proteína cuando se produce en un sintetizador.

Selección de restos. La mayoría de los aminoácidos en el armazón del aficuerpo pueden variarse. 14 posiciones de aminoácidos en el aficuerpo se varían frecuentemente y no tienen impacto sobre la estructura de los aficuerpos cuando se varían. Estos restos de aminoácidos se variaron para los estudios descritos en el presente documento, usando las técnicas descritas anteriormente. Los restos de aminoácidos expuestos en la superficie (parcialmente o completamente expuestos a disolvente) de proteínas también pueden variarse con frecuencia sin ningún impacto significativo sobre la estructura secundaria o terciaria de una proteína (en el caso de un agente de unión, dichas sustituciones con frecuencia no tienen impacto sobre su capacidad para unirse a su diana). Los restos de aminoácidos de superficie de los aficuerpos se conocen y también son dianas posibles para variación de secuencia. El núcleo hidrófobo de las proteínas también se conoce, y es una diana poco probable para la variación, aunque existen algunos ejemplos en los que se varían restos de aminoácidos de núcleo de una proteína sin afectar a la estructura o función de una proteína. La elección de restos puede basarse además en el cambio deseado en las propiedades de la molécula precursora. La Tabla 1 clasifica tipos generales de sustituciones y sus efectos del punto isoeléctrico.

Quelantes y bioconjugación. En algunos casos, se produjeron proteínas con una etiqueta de "6-his" que se usó para conjugación directa de radiometales como se describe a continuación. En otros casos, un quelante para radiometales se conjugó con proteínas después de su producción. El quelante HYNIC para ^{99m}Tc se conjugó con proteínas usando la química de NHS para unirlos covalentemente a aminas primarias en la proteína, o química de maleimida para unirlos covalentemente a cisteínas libres. Las técnicas para esta estrategia se describen en la bibliografía, y varios proveedores comercializan kits o reactivos para este tipo de modificación post-traduccional con quelantes. Otras técnicas para conjugar quelantes con proteínas o funcionalizar proteínas también serían aplicables en este caso.

Marcaje mediante la etiqueta de 6-his. El marcaje de proteínas con el núcleo $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3]^+$ se efectuó usando la modificación de un procedimiento publicado previamente (Waibel y col, Nat. Biotechnol. 1999, 17, 897.). En resumen, se añadió $\text{Na}[^{99m}\text{TcO}_4]$ en solución salina (4 mCi, 2 ml) a un kit de boranocarbonato Isolink® (por cortesía de Mallinckrodt, véase Alberto y col, J. Am. Chem. Soc. 2001, 123, 3135.). La solución resultante se calentó a 95°C durante 15-20 minutos, para dar $fac\text{-}[^{99m}\text{Tc}(\text{CO})_3(\text{H}_2\text{O})_3]^+$. Se retiró una porción (2 mCi, 1 ml) de la solución y se neutralizó a pH ~7 con HCl 1 N. Se retiró una alícuota de 325 μl y se añadió a una solución de la proteína-His₆. La solución resultante se calentó en un baño de agua a 35-37°C durante 40 minutos. Los rendimientos radioquímicos típicos variaban del 80-95% (determinados por ITLC-SG, Biodex, NaCl al 0,9%). Los productos de reacción brutos se sometieron a cromatografía en una columna NAP-5 (GE Healthcare, PBS 10 mM donde el PBS = solución salina tamponada con fosfato) para dar productos de una pureza radioquímica >99%. Las actividades específicas típicas obtenidas eran de 3-4 $\mu\text{Ci}/\mu\text{g}$. La solución resultante se diluyó después con PBS 10 mM para dar la concentración apropiada para estudios de biodistribución posteriores.

Marcaje mediante el quelante HYNIC: La síntesis de $^{99m}\text{Tc}(\text{tricina})_2(\text{HYNIC-Afi})$ se efectuó de acuerdo con

procedimientos publicados. En resumen, se combinaron 200 µl de una solución de tricina en PBS 10 mM (Fluka; 90 mg/ml), 100 µl de una solución de cloruro de estaño dihidrato (Sigma-Aldrich; 250 µg/ml en HCl 0,1 N) y 60 µl de NaOH 0,1 N para dar una solución de pH 6-7. A esto se añadieron 200 µl de Na^{99m}TcO₄ en solución salina (Cardinal Health; 2 mCi/ml). Después de 15 minutos a temperatura ambiente, la solución se comprobó para ^{99m}Tc-coloide por ITLC (Biodex; NaCl al 0,9%). El coloide era siempre <5%. Para los HYNIC-Aficuerpos de 14 kDa, se añadieron 20 µl (30 µg) a la solución de ^{99m}Tc-tricina resultante. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Para los HYNIC-Aficuerpos de 7 kDa, se retiraron 100 µCi de ^{99m}Tc-tricina y se añadieron a una solución de 17 µg de HYNIC-proteína. Esta solución se incubó a temperatura ambiente durante 25 minutos. Se llevó a cabo una purificación con NAP-5 para eliminar los materiales de partida sin reaccionar, dando el compuesto deseado en una pureza radioquímica >99% a una actividad específica de µCi/µg (21 Ci/mmol). Se realizó una HPLC (columna Péptido/Proteína C4 Grace-Vydac) sobre las especies radiomarcadas purificadas.

Animales y modelos animales: Se llevaron a cabo estudios de biodistribución en ratones C57/B16 hembra normales (Charles River Labs, Hopkinton, MA) con un intervalo de edad de entre 8 y 15 semanas. Los ratones se alojaron durante al menos 48 horas antes de que se llevaran a cabo experimentos de biodistribución. Se llevaron a cabo algunos experimentos de biodistribución adicionales en ratones atímicos CD-1 que llevan tumores o sin tratamiento previo del mismo proveedor y el mismo intervalo de edad y sexo. Las comparaciones estadísticas de los datos de biodistribución de los diferentes tipos de ratón indican que la cepa y el estado tumoral no influyen en los parámetros de biodistribución ($p < 0,05$) en todos los órganos comparados (los órganos de eliminación principales —sangre, hígado, riñón, vejiga/orina).

Biodistribución: A los ratones se les administraron inyecciones en la vena de la cola de ~1 µg de proteína marcada con ^{99m}Tc (~3 µCi/1 µg). Los ratones se pusieron en jaulas revestidas con papel de filtro hasta la eutanasia. Se eutanasiaron tres ratones en cada punto temporal (5, 30, 120 y 240 minutos) y los tejidos de interés se disecaron y se contaron en un contador gamma Perkin Elmer 1480. Se recogieron datos para sangre, riñón, hígado, bazo y sitio de inyección (cola). La orina de las jaulas se combinó con la vejiga y también se contó. Los tejidos restantes se contaron y la suma de todos los tejidos más la orina para cada animal se sumó para proporcionar la dosis inyectada total. El % de dosis inyectada para cada órgano se determinó basándose en este total, y los órganos se pesaron para la determinación del % de dosis inyectada por gramo, (%DI/g). Los datos se describen como valor medio para los tres ratones en el punto temporal, representando las barras de error la desviación típica del grupo.

Parámetros de eliminación sanguínea: La semivida se determina convirtiendo el %DI/g en sangre en un % DI total en el torrente sanguíneo. Se realiza la asunción de que el %DI en la sangre a tiempo cero es del 100%. Los datos se ajustan con una curva monoexponencial usando análisis de mínimos cuadrados (Prism, GraphPad Software, www.graphpad.com). La semivida, en minutos, se extrae como un parámetro ajustado. Los valores de R cuadrado son generalmente superiores a 0,97. La AUC (área bajo la curva) se obtiene integrando numéricamente la curva generada anteriormente.

Determinación del punto isoelectrico: Los puntos isoelectricos se calcularon basándose en las secuencias primarias (véase la Tabla 2) usando el procedimiento descrito por Bjellqvist B, Hughes GJ, Pasquali C, Paquet N, Ravier F, Sanchez JC, Frutiger S y Hochstrasser D. en "The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences." Electrophoresis. 1993 Oct; 14(10): 1023-31.

Ejemplo 1 – Un panel de cinco aficuerpos monoméricos

El objetivo de este estudio era obtener por ingeniería genética un aficuerpo con la asimilación hepática reducida. Se seleccionaron cinco aficuerpos monoméricos con un amplio intervalo de puntos isoelectricos para este estudio. El intervalo de puntos isoelectricos, calculados como se ha descrito anteriormente, era de entre 6,5 y 10,0. Los aficuerpos se designan con sus códigos de desarrollo, que son "Z1977", "Z1978", "Z1980", "Z1982" y "Z1995".

Los aficuerpos se marcaron mediante sus etiquetas de 6-his (como se ha descrito anteriormente). La pureza radioquímica después de la purificación era superior al 99% para los cinco aficuerpos.

La biodistribución se llevó a cabo como se ha descrito anteriormente. Se observó que los cinco aficuerpos tenían perfiles de eliminación sanguínea similares (FIG. 1). Los datos en sangre se sometieron a un ajuste de mínimos cuadrados de una curva de degradación monoexponencial para determinar la semivida en suero. Las curvas resultantes se integraron para generar valores de área bajo la curva (AUC). Estos datos y análisis muestran que el comportamiento *in vivo* global de aficuerpos en gran medida no cambia por las variaciones de secuencia (Tabla 3).

Aunque la eliminación sanguínea era muy similar, se observó que los cinco aficuerpos tenían niveles notablemente diferentes de retención hepática y renal (FIG. 2). Se descubrió que los valores de asimilación renal y hepática estaban inversamente correlacionados (FIG. 3). Estos datos muestran que el hígado y los riñones efectúan la retirada de aficuerpos de la sangre, y que aunque la velocidad de eliminación es la misma, la distribución entre los dos es diferente. Esta diferencia es de un interés clave debido a la capacidad para dirigir la molécula lejos del hígado y hacia los riñones o la inversa tiene valor cuando se desarrollan aficuerpos para fines clínicos. Esto es especialmente valioso si puede realizarse sin alterar los otros comportamientos de la molécula.

Las secuencias de los aficuerpos se usaron para evaluar la magnitud del impacto de la secuencia sobre el mecanismo de eliminación. La Tabla 2 muestra las secuencias de los aficuerpos que se usaron en los estudios descritos en el presente documento. Un pequeño número de restos de aminoácidos que se sabía que no afectaban a la estructura de la molécula se variaron entre los diferentes aficuerpos. Las secuencias se analizaron para determinar sus puntos isoeléctricos como se ha descrito anteriormente.

Los puntos isoeléctricos determinados a partir de las secuencias se representaron frente a los valores de retención hepática observados a las 2 horas post-inyección. Se observó la correlación entre el hígado y el punto isoeléctrico — una correlación que muestra que las sustituciones que no afectan a la estructura o tamaño de un aficuerpo pueden usarse para controlar su metabolismo por alteración de su estado de carga nativo. En el caso de los aficuerpos monoméricos, la pendiente era significativamente distinta de cero, con un valor p de $<0,01$ y un valor de r cuadrado de regresión lineal de 0,983 (FIG. 4).

El aficuerpo Z1978 demostró la menor asimilación hepática. Esta baja asimilación se obtiene por ingeniería genética en la proteína mediante la reducción del punto isoeléctrico. Para reducir adicionalmente la asimilación, el punto isoeléctrico puede desplazarse más abajo usando los procedimientos descritos anteriormente.

El aficuerpo con el mayor nivel de retención hepática es Z1995. Una comparación de las secuencias de Z1995 y Z1978 demuestra algunas de las sustituciones que pueden alterar (en este caso disminuir) el punto isoeléctrico de una proteína. Las sustituciones siguientes en Z1995 lo convertirán en Z1978: R20 se muta a L, L21 se muta a S, K22 se muta a D, A25 se muta a Q, A29 se muta a S, K36 se muta a S, S44 se muta a K y R47 se muta a I. En total, la conversión implica una disminución neta de 2 aminoácidos básicos y un aumento neto de 1 aminoácido ácido. Dichas manipulaciones de secuencia (aumentando el número de restos de aminoácidos ácidos y disminuyendo el número de restos de aminoácidos básicos, o lo contrario) son eficaces para cambiar el punto isoeléctrico. El punto isoeléctrico también puede cambiarse por sustituciones con aminoácidos básicos o ácidos sintéticos en el contexto de la síntesis de péptidos u otras técnicas para producir proteínas.

Ejemplo 2 – Un panel de aficuerpos diméricos

El objetivo de este estudio era aplicar la invención a aficuerpos multivalentes para determinar si su comportamiento *in vivo* puede manipularse de la misma forma que los aficuerpos monovalentes. Los aficuerpos multivalentes tendrán ventajas en ciertas situaciones clínicas y la capacidad para controlar su eliminación sería valiosa.

Se seleccionaron para este estudio dos aficuerpos bivalentes, comprendiendo cada uno una sola cadena polipeptídica compuesta por dos secuencias de aficuerpo monovalentes idénticas con un pequeño engarce intermedio. Se denominan mediante sus nombres de desarrollo "zTNF" y "zHer2". Se seleccionaron de los aficuerpos diméricos disponibles basándose en sus puntos isoeléctricos dispares —9,0 para zHer2 y 5,1 para zTNF.

Ambos aficuerpos se conjugaron con el quelante hínico mediante restos de aminoácidos de cisteína terminales usando química de maleimida como se ha analizado anteriormente. La conjugación se confirmó por espectrometría de masas, y las proteínas estaban intactas según se evaluó por HPLC. Ambos aficuerpos se radiomarcaron con ^{99m}Tc como se ha descrito anteriormente. Se determinó que la pureza radioquímica era $>95\%$ para ambos.

Los resultados de biodistribución para ambos aficuerpos bivalentes eran similares a los observados para los aficuerpos monovalentes. Las curvas de eliminación sanguínea (FIG. 5) y los parámetros (tabla 4) eran comparables a los aficuerpos monovalentes. Los órganos de eliminación mostraban el mismo amplio intervalo que el observado para los aficuerpos monovalentes (FIG. 6).

Las secuencias primarias de los aficuerpos bivalentes (tabla 2) se usaron para calcular los puntos isoeléctricos como se han descrito anteriormente. Cuando se compararon con los valores de retención hepática, se observó la misma correlación (FIG. 6). Estos datos muestran que la invención puede ponerse en práctica con aficuerpos multivalentes así como monovalentes, y que el intervalo eficaz de puntos isoeléctricos discurre al menos tan bajo como 5,1.

Ejemplo 3 – Un panel de siete aficuerpos:

El objetivo de este estudio era desarrollar un agente de contraste dirigido con baja retención hepática inespecífica. En este caso, se analizaron secuencias para aficuerpos con gran afinidad por la diana de formación de imágenes seleccionada y se determinaron los puntos isoeléctricos. Se observó que el intervalo era de entre 6,3 y 8,0.

El aficuerpo con el menor punto isoeléctrico (denominado por su código de desarrollo, "z2465") se seleccionó para los experimentos iniciales. Basándose en los datos analizados anteriormente, esta molécula debería tener la menor retención hepática inespecífica. El aficuerpo seleccionado se radiomarcó mediante su etiqueta de 6-his como se ha descrito anteriormente, y se llevó a cabo la biodistribución. La molécula se aclaró con los mismos parámetros que otros aficuerpos y, como se deseaba, se observó que la asimilación hepática era reducida.

Para explorar y confirmar las predicciones realizadas basándose en la técnica actual, se seleccionaron dos aficuerpos más de punto isoeléctrico variable (denominados por sus códigos de desarrollo, "z2477" y "z2483") del panel de ocho, y se llevó a cabo una biodistribución en un solo punto temporal. De acuerdo con los ejemplos

anteriores, el aficuerpo z2465 seleccionado para el experimento inicial debería tener, en virtud de su bajo punto isoeléctrico, la menor asimilación hepática de los tres aficuerpos analizados.

5 A las dos horas post-inyección, cuando se realizaron las comparaciones, todavía se observaba la correlación entre la retención hepática y el punto isoeléctrico (FIG. 7). Este experimento de confirmación demostró una función apropiada de la invención —el procedimiento de uso del punto isoeléctrico permitió la selección rápida del aficuerpo apropiado para el desarrollo, y permitirá una reducción adicional de la retención hepática.

10 Las sustituciones específicas en z2483 que lo convierten en z2465, y le confieren menor retención hepática son V20 a I y K21 a E. Estas sustituciones dan como resultado un aumento neto de un resto de aminoácido ácido y una disminución neta de un resto de aminoácido básico —un cambio que impulsa el punto isoeléctrico hacia abajo hasta 6,3 (desde 7,2).

LISTADO DE SECUENCIAS

5 <110> MARINO, MICHAEL
 CASTLE, JASON
 SYUD, FAISAL
 LEE, BRIAN

<120> BIOCINÉTICA DE POLIPÉPTIDOS DE ELIMINACIÓN RÁPIDA

<130> 225237-2

<140>

<141>

10 <160>8

<170> PatentIn ver. 3.3

<210> 1

<211> 71

<212> PRT

15 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 1

```

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
 1          5          10          15
Asn Lys Glu Arg Gln Val Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn
          20          25
Leu Asn Arg Gly Gln Trp Asn Ala Phe Ile Ala Ser Leu Val Asp Asp
          35          40          45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
          50          55          60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
          65          70
    
```

20 <210>2

<211> 71

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

25 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400>2

```

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
 1          5          10          15
Asn Lys Glu Leu Ser Asp Ala Ala Gln Glu Ile Asp Ser Leu Pro Asn
          20          25
Leu Asn Arg Ser Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Ile Asp Asp

          35          40          45
Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
          50          55          60
Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
          65          70
    
```

ES 2 375 018 T3

<210>3
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 3

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys Glu Arg Arg Glu Ala Ala Lys Glu Ile Asp Ser Leu Pro Asn
 20 25 30
 Leu Asn Arg Thr Gln Trp Asn Ala Phe Ile Arg Ser Leu Ala Asp Asp
 35 40 45
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 50 55 60
 Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
 65 70

10 <210>4
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

15 <400> 4

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys Glu Leu Val Arg Ala Ala Gln Glu Ile Asp Glu Leu Pro Asn
 20 25 30
 Leu Asn Arg Gly Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp
 35 40 45
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 50 55 60
 Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
 65 70

20 <210>5
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 5

ES 2 375 018 T3

Gly Ser Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe
 1 5 10 15
 Asn Lys Glu Arg Leu Lys Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn
 20 25 30
 Leu Asn Arg Lys Gln Trp Asn Ala Phe Ile Ser Ser Leu Arg Asp Asp
 35 40 45
 Pro Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp
 50 55 60
 Ala Gln Ala Pro Lys Val Asp
 65 70

<210> 6
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 6

Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
 1 5 10 15
 Lys Glu Leu Ile Glu Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn Leu
 20 25 30
 Asn Arg Arg Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
 35 40 45
 Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 50 55 60
 Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
 65 70

<210> 7
 <211> 71
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 7

Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
 1 5 10 15
 Lys Glu Leu Ile Ala Ala Ala Ala Glu Ile Asp Arg Leu Pro Asn Leu
 20 25 30
 Asn Arg Val Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
 35 40 45
 Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Glu Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
 50 55 60
 Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
 65 70

<210> 8
 <211> 71
 <212> PRT

20

ES 2 375 018 T3

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Descripción de secuencia artificial: Polipéptido sintético

<400> 8

Gly Ser His His His His His His Leu Gln Val Asp Asn Lys Phe Asn
1 5 10 15
Lys Glu Leu Val Lys Ala Ala Ala Glu Ile Asp Ala Leu Pro Asn Leu
20 25 30
Asn Arg Arg Gln Trp Asn Ala Phe Ile Lys Ser Leu Val Asp Asp Pro
35 40 45
Ser Gln Ser Ala Asn Leu Leu Ala Gln Ala Lys Lys Leu Asn Asp Ala
50 55 60
Gln Ala Pro Lys Val Asp Cys
65 70

5

REIVINDICACIONES

1. Un procedimiento de reducción de la asimilación hepática *in vivo* de un polipéptido que se une específicamente a una diana, que comprende:
- 5 (a) proporcionar un polipéptido que se une específicamente a una diana; y
 (b) sustituir al menos un resto de aminoácido básico o al menos un resto de aminoácido neutro del polipéptido nativo de la etapa (a) con un resto de aminoácido ácido para producir un polipéptido modificado,
- en el que el polipéptido modificado demuestra un punto isoeléctrico al menos 0,05-0,1 puntos de pH inferior al punto isoeléctrico del polipéptido nativo de la etapa (a);
 10 y en el que el polipéptido modificado se une a la diana con al menos el 50%, 75% o 90% de la especificidad del polipéptido nativo.
2. El procedimiento de la reivindicación 1, en el que los restos de aminoácidos básicos se seleccionan de histidina, lisina y arginina, y los restos de aminoácidos ácidos se seleccionan de ácido aspártico o ácido glutámico.
3. El procedimiento de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que los restos de aminoácidos neutros se seleccionan de cualquier resto de aminoácido distinto de histidina, lisina, arginina, ácido aspártico o ácido glutámico,
 15 y los restos ácidos se seleccionan de ácido aspártico o ácido glutámico y derivados de los mismos.
4. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en el que el polipéptido modificado consiste en:
- (i) aproximadamente 60 restos de aminoácidos que comprenden un plegamiento alfa helicoidal;
 (ii) aproximadamente 120 restos de aminoácidos que comprenden un par de segmentos de plegamiento alfa helicoidal;
 20 (iii) aproximadamente 160 restos de aminoácidos que comprenden un plegamiento de tipo barril beta.
5. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en el que el polipéptido modificado consiste en los restos de aminoácidos de las SEC ID números 1-8.
6. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que el polipéptido modificado comprende además un resto de dirección.
- 25 7. El procedimiento de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en el que el polipéptido modificado comprende además un generador de señal, seleccionado de un generador de señal opaca radiactiva, fluorescente, magnética, radiopaca, luminescente, fosforescente, isotópica o de ultrasonidos.
8. El procedimiento de la reivindicación 7, en el que el generador de señal comprende ^{99m}Tc o ^{18}F .
9. Un polipéptido modificado que consiste en los restos de aminoácidos de las SEC ID números 1-8.
- 30 10. Una composición farmacéutica que comprende el polipéptido modificado de la reivindicación 9.
11. Un agente de formación de imágenes de diagnóstico que comprende el polipéptido modificado con un generador de señal como se define en la reivindicación 7 o la reivindicación 8.
12. El agente de formación de imágenes de diagnóstico de la reivindicación 11, que se proporciona como una composición farmacéutica.
- 35 13. Un agente de formación de imágenes de diagnóstico de la reivindicación 11 o la reivindicación 12, para su uso en un procedimiento de formación de imágenes *in vivo*.

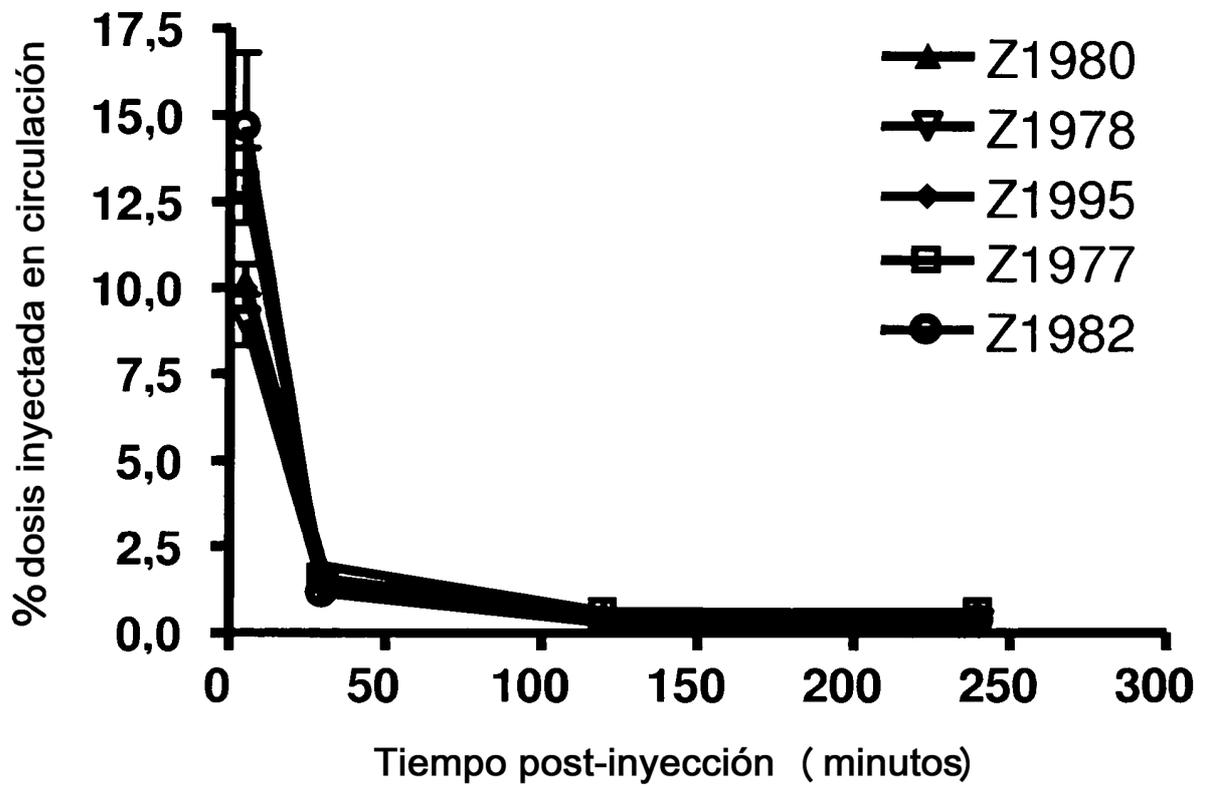


FIG. 1

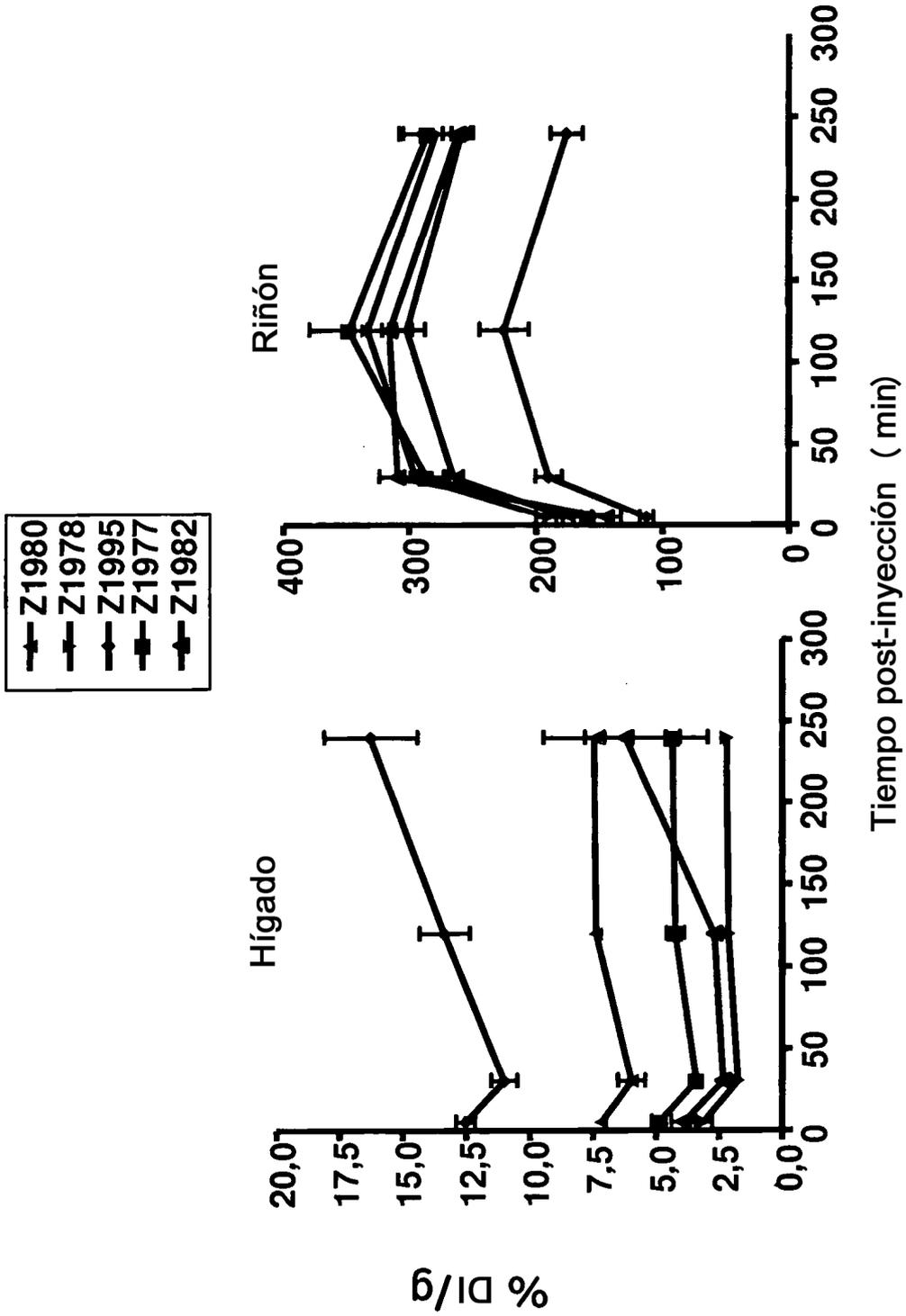


FIG. 2B

FIG. 2A

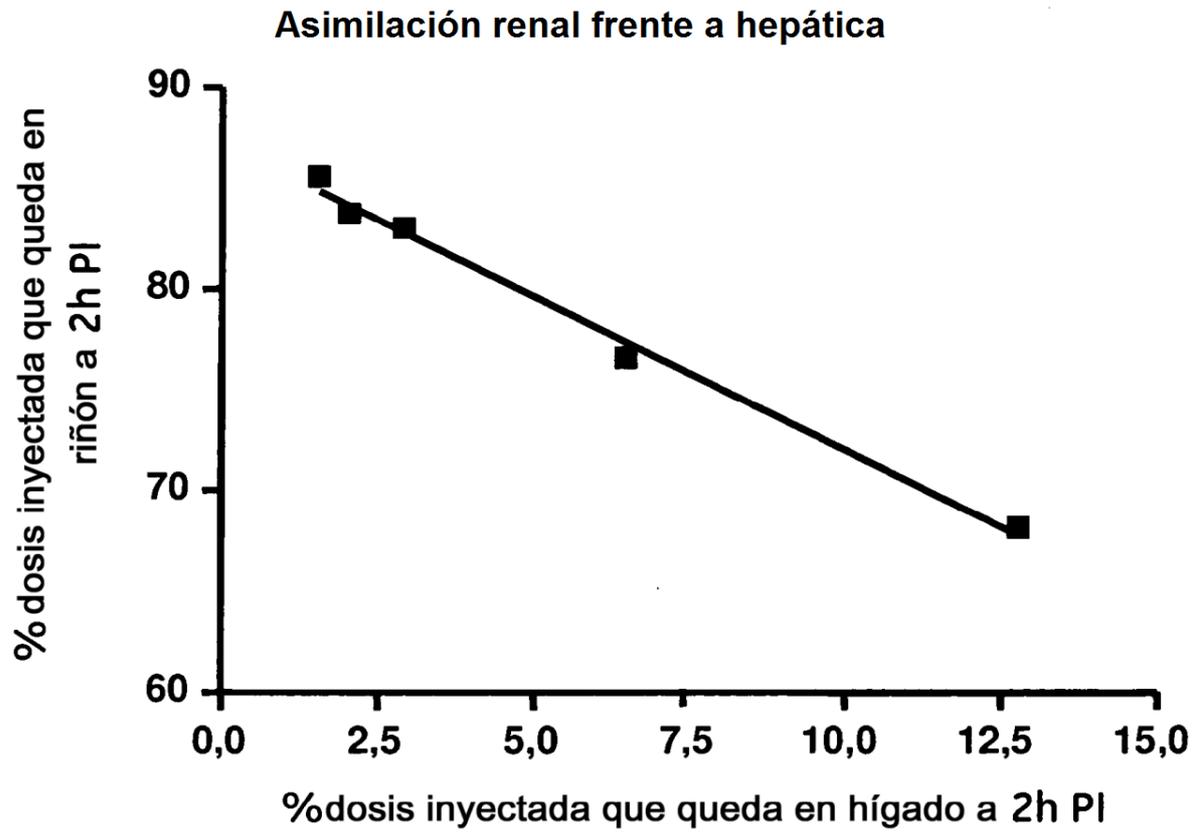


FIG. 3

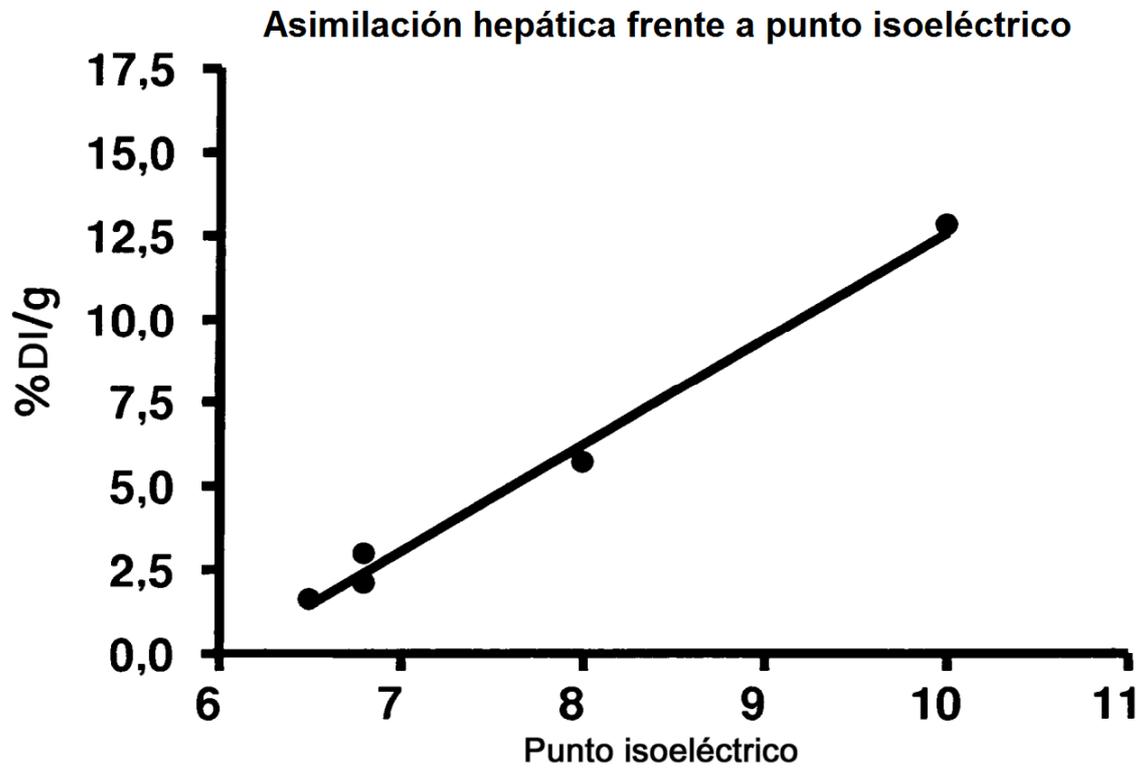


FIG. 4

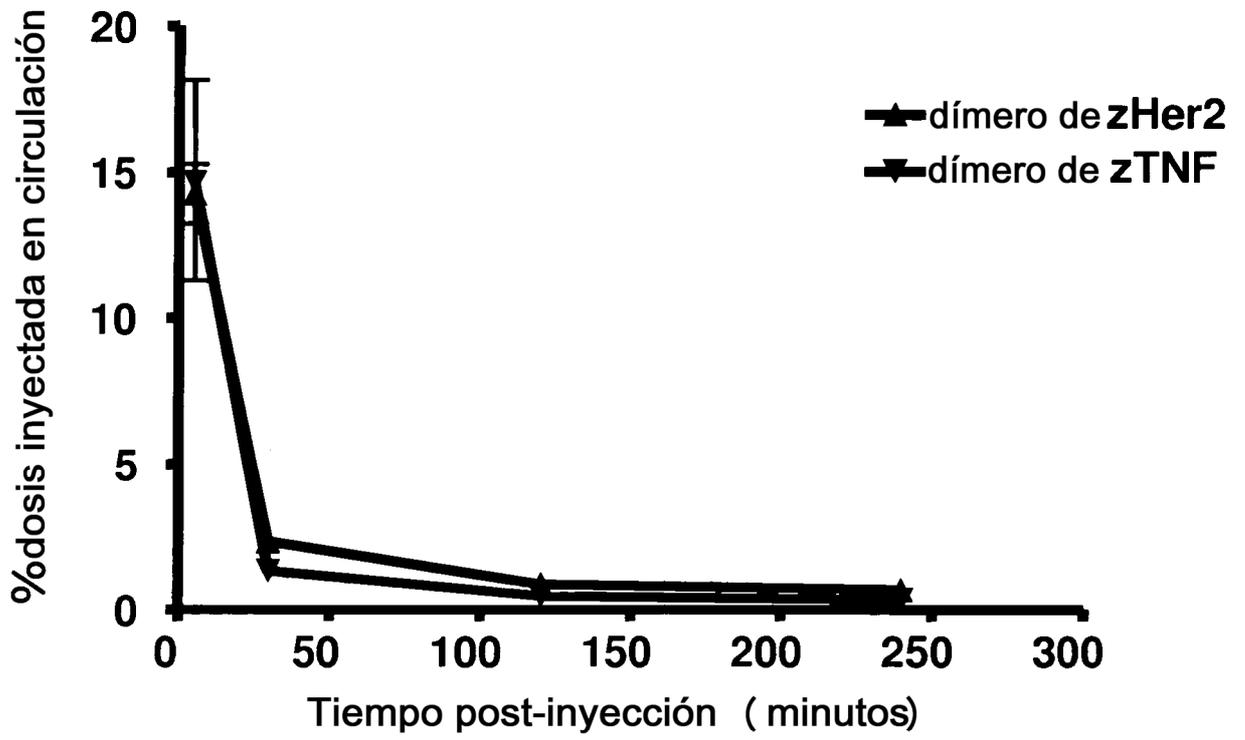


FIG. 5

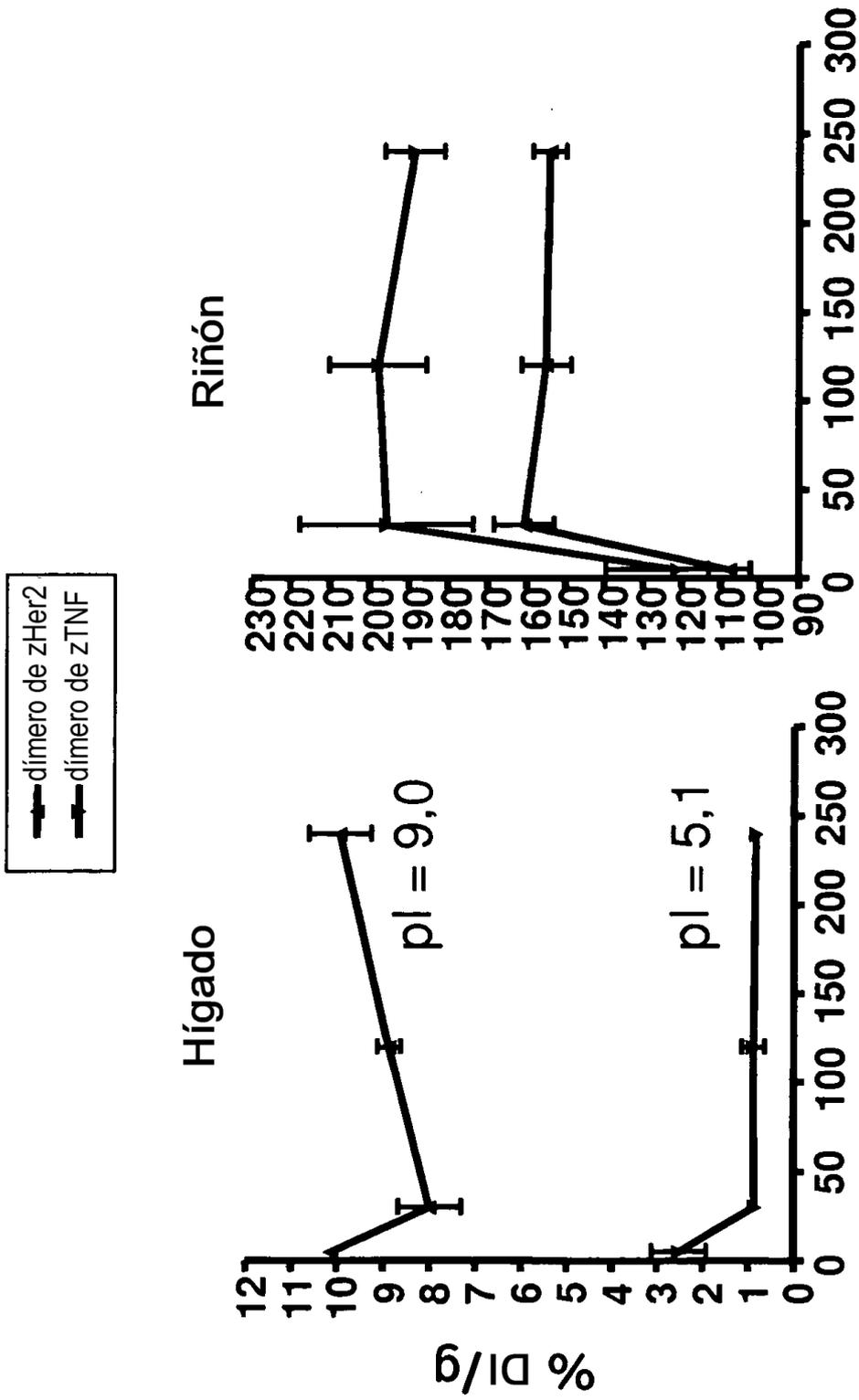


FIG. 6A

FIG. 6B

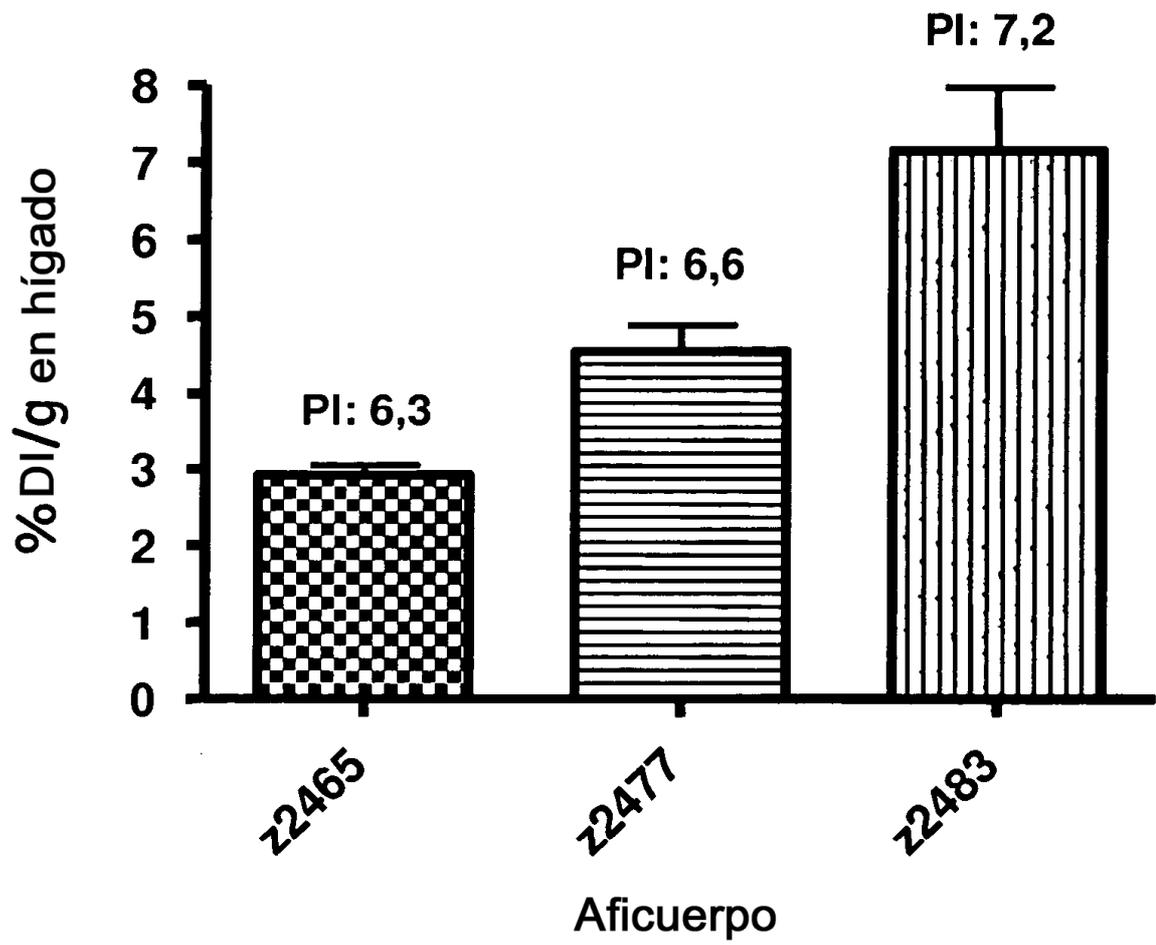


FIG. 7