

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 488 668**

51 Int. Cl.:

**A61K 38/03** (2006.01)  
**A61K 47/48** (2006.01)  
**A61K 31/337** (2006.01)  
**C07K 16/22** (2006.01)  
**C07K 14/00** (2006.01)  
**C07K 16/28** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.05.2008 E 08757166 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **14.05.2014 EP 2164866**

54 Título: **Polipéptidos de tipo aprotinina para administrar agentes conjugados con los mismos a tejidos**

30 Prioridad:

**29.05.2007 US 807597**  
**30.05.2007 US 807917**  
**20.12.2007 US 8880**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**28.08.2014**

73 Titular/es:

**ANGIOCHEM INC. (100.0%)**  
**201 PRESIDENT KENNEDY AVENUE SUITE PK-**  
**R210**  
**MONTREAL, QC H2X 3Y7, CA**

72 Inventor/es:

**BELIVEAU, RICHARD;**  
**DEMEULE, MICHEL;**  
**CHE, CHRISTIAN y**  
**REGINA, ANTHONY**

74 Agente/Representante:

**PÉREZ BARQUÍN, Eliana**

**ES 2 488 668 T3**

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín europeo de patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre concesión de Patentes Europeas).

## DESCRIPCIÓN

Polipéptidos de tipo aprotinina para administrar agentes conjugados con los mismos a tejidos

5 **Antecedentes de la invención**

La invención se refiere a mejoras en el campo de la administración de fármacos. Más particularmente, la invención se refiere a polipéptidos, conjugados y composiciones farmacéuticas que incluyen los polipéptidos de la invención y a su uso para transportar agentes (por ejemplo, agentes terapéuticos) a través de tipos de células particulares tales como de hígado, pulmón o riñón.

Las enfermedades del hígado, incluyendo hepatitis (por ejemplo, hepatitis vírica) y cánceres del hígado (por ejemplo, hepatocarcinoma), y enfermedades pulmonares, tales como cáncer de pulmón (por ejemplo, cáncer de pulmón de células pequeñas y no pequeñas) son problemas de salud graves. Muchos agentes terapéuticos para tales enfermedades tienen efectos secundarios no deseados (por ejemplo, agentes quimioterápicos) o, por motivos tales como estabilidad *in vivo*, transporte u otras propiedades farmacocinéticas, son difíciles de proporcionar a una concentración suficientemente alta en el tejido diana o durante una duración suficientemente larga para permitir un efecto terapéutico máximo en el tejido diana.

Por consiguiente, hay una necesidad de métodos y composiciones que aumenten las concentraciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico en tejidos u órganos diana.

El documento WO 2007/009229 A1 da a conocer polipéptidos que se captan por órganos específicos y, cuando se conjugan con un agente, pueden administrar dicho agente a los órganos.

El documento WO 2006/086870 A1 da a conocer polipéptidos que se captan por el cerebro y, cuando se conjugan con un agente, pueden aumentar el transporte del agente a través de la barrera hematoencefálica.

El documento WO 2004/060403 A2 da a conocer un polipéptido que, cuando se conjuga con un agente, potencia el transporte del agente a través de la barrera hematoencefálica.

**Sumario de la invención**

Se ha descubierto que los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, Angiopep-7; SEQ ID NO:112) se transportan de manera eficaz al interior de tipos de células particulares (por ejemplo, hepáticas, pulmonares, de bazo, renales y musculares), pero no se transportan de manera eficaz a través de la barrera hematoencefálica (BHE). Cuando se conjugan con un agente, los polipéptidos actúan como vectores y pueden aumentar la concentración del agente conjugado en la célula. También se han identificado Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6 (SEQ ID NOS:107-111) como vectores que pueden transportarse de manera eficaz a través de la BHE y pueden transportarse adicionalmente al interior de tipos de células particulares. Por tanto, la invención presenta polipéptidos, conjugados que incluyen los polipéptidos como vectores, y métodos para diagnosticar y tratar enfermedades (por ejemplo, cáncer) con tales polipéptidos y conjugados.

En un primer aspecto, la presente invención se refiere a un polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la siguiente fórmula:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

en la que X1-X19 son cualquier aminoácido o están ausentes;

al menos uno de X10 y X15 es Arg; y

dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos el 80% de identidad con Angiopep-7, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112, en el que dicho polipéptido se transporta de manera eficaz a al menos una célula o tejido seleccionado del grupo que consiste en de hígado, pulmón y riñón, y en el que dicho polipéptido se transporta a través de la barrera hematoencefálica a niveles inferiores a Angiopep-6, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111.

Por consiguiente, la invención presenta un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene la fórmula:

X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

en la que cada uno de X1-X19 (por ejemplo, X1-X6, X8, X9, X11-X14 y X16-X19) es, independientemente, cualquier aminoácido (por ejemplo, un aminoácido que se produce de manera natural tal como Ala, Arg, Asn, Asp, Cys, Gln, Glu, Gly, His, Ile, Leu, Lys, Met, Phe, Pro, Ser, Thr, Trp, Tyr y Val) o está ausente y al menos uno de X1, X10 y X15

- es arginina. En algunas realizaciones, X7 es Ser o Cys; o X10 y X15 son cada uno independientemente Arg o Lys. En algunas realizaciones, los residuos desde X1 hasta X19, inclusive, son sustancialmente idénticos a la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 112 (por ejemplo, Angiopep-7). En ejemplos adicionales dados a conocer en el presente documento, los residuos desde X1 hasta X19, inclusive, son sustancialmente idénticos a cualquiera de las
- 5 secuencias de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NOS:1-105 y 107-111 (por ejemplo, Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6). En algunas realizaciones, al menos uno (por ejemplo, 2, 3, 4 ó 5) de los aminoácidos X1-X19 son Arg (por ejemplo, cualquier uno, dos o tres de X1, X10 y X15).
- 10 En otras realizaciones, la invención presenta un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene identidad sustancial con SEQ ID NO: 112 (por ejemplo, Angiopep-7). Se da a conocer además un polipéptido que incluye una secuencia de aminoácidos que tiene identidad sustancial con una cualquiera de SEQ ID NOS:1-105 y 107-111 (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6). En determinadas realizaciones, el polipéptido puede incluir o puede ser Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5,
- 15 Angiopep-6 o Angiopep-7 (SEQ ID NOS:107-112), puede incluir una secuencia sustancialmente idéntica a la secuencia de Angiopep-7 o un fragmento de la misma (por ejemplo, un fragmento funcional). El polipéptido puede tener una secuencia de aminoácidos de 10 a 50 aminoácidos, por ejemplo, de 10 a 30 aminoácidos, de longitud. La invención también presenta derivados funcionales (por ejemplo, derivados químicos o variantes) de estos polipéptidos.
- 20 Los polipéptidos a modo de ejemplo de la invención tienen una lisina o arginina en la posición 10 (con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1) o una lisina o arginina en la posición 15 (con respecto a la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1), o una lisina o arginina tanto en la posición 10 como en la posición 15. Los polipéptidos de la invención también pueden tener una serina o cisteína en la posición 7 (con respecto a la
- 25 secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO:1). Cuando se desea la multimerización de polipéptidos, el polipéptido puede incluir una cisteína (por ejemplo, en la posición 7).
- En determinadas realizaciones, los polipéptidos de la invención (por ejemplo, cualquier polipéptido descrito en el presente documento) se modifican (por ejemplo, tal como se describe en el presente documento). El polipéptido
- 30 puede amidarse, acetilarse, o ambos. Por ejemplo, un polipéptido que incluye Angiopep-6 o Angiopep-7 puede amidarse, o SEQ ID NO:67 puede amidarse (polipéptido n.º 67). En otro ejemplo, el aminoácido de una cualquiera de SEQ ID NOS:107-112, o cualquier otro polipéptido de la invención, se amida o acetila. Tales modificaciones en polipéptidos de la invención pueden ser en el extremo amino o carboxilo-terminal de dicho polipéptido. La invención también presenta peptidomiméticos (por ejemplo, los descritos en el presente documento) de cualquiera de los
- 35 polipéptidos descritos en el presente documento. Los polipéptidos de la invención pueden estar en forma multimérica. Por ejemplo, los polipéptidos pueden estar en forma dimérica (por ejemplo, formada por enlace disulfuro a través de residuos cisteína).
- Los polipéptidos de la invención pueden transportarse de manera eficaz al interior de células particulares (por
- 40 ejemplo, células hepáticas, renales, pulmonares, musculares o de bazo) o puede cruzar de manera eficaz la BHE (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6). En algunas realizaciones, los polipéptidos se transportan de manera eficaz al interior de células particulares (por ejemplo, células hepáticas, renales, pulmonares, musculares o de bazo) y no se transportan de manera eficaz a través de la BHE (por ejemplo, Angiopep-7). El polipéptido puede transportarse de manera eficaz al interior de al menos uno (por ejemplo, al menos
- 45 dos, tres, cuatro o cinco) de una célula o tejido seleccionado del grupo que consiste en de hígado, riñón, pulmón, músculo o bazo.
- Para cualquiera de los polipéptidos y conjugados descritos en el presente documento, la secuencia de aminoácidos puede excluir específicamente un polipéptido que incluye o consiste en cualquiera de SEQ ID NOS:1-105 y 107-112
- 50 (por ejemplo, cualquiera de SEQ ID NOS:1-96, Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 y Angiopep-7). En algunas realizaciones, los polipéptidos y conjugados de la invención excluyen los polipéptidos de SEQ ID NOS:102, 103, 104 y 105. En algunas realizaciones, los polipéptidos y conjugados de la invención incluyen estos polipéptidos.
- 55 En determinadas realizaciones, un polipéptido de la invención puede tener una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento con al menos una sustitución de aminoácido (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 ó 12 sustituciones). El polipéptido puede tener una arginina en una, dos o tres de las posiciones correspondientes a las posiciones 1, 10 y 15 de la secuencia de aminoácidos de cualquiera de SEQ ID NO:1, Angiopep-1, Angiopep-2, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 y Angiopep-7. Por ejemplo, el polipéptido puede
- 60 contener de 1 a 12 sustituciones de aminoácido (por ejemplo, SEQ ID NO:91). Por ejemplo, la secuencia de aminoácidos puede contener de 1 a 10 (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2) sustituciones de aminoácido o de 1 a 5 sustituciones de aminoácido. Según la invención, la sustitución de aminoácido puede ser una sustitución de aminoácido conservativa o no conservativa.
- 65 Los polipéptidos de la invención pueden sintetizarse químicamente (por ejemplo, síntesis en fase sólida) o pueden producirse mediante tecnología de ADN recombinante, tal como se conoce en la técnica. Cualquiera de los

polipéptidos, composiciones o conjugados descritos en el presente documento pueden estar en una forma aislada o en una forma sustancialmente purificada.

Se da a conocer además una secuencia de polinucleótidos que codifica para un polipéptido de la invención (por ejemplo, cualquier polipéptido descrito en el presente documento, tal como Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 y Angiopep-7). Más particularmente, se dan a conocer secuencias de nucleótidos (desoxirribonucleótidos, ribonucleótidos, o derivados de los mismos) que codifican para un polipéptido seleccionado del grupo que consiste en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-97 y SEQ ID NO:107-112. Una secuencia de nucleótidos deseada puede sintetizarse químicamente mediante métodos conocidos en la técnica.

En otro aspecto, la invención presenta un conjugado que incluye un vector seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los polipéptidos, análogos o derivados de los mismos descritos en el presente documento (por ejemplo, Angiopep-7), y un agente, cuando el agente se conjuga con el vector. Se dan a conocer además tales conjugados que incluyen un vector seleccionado del grupo que consiste en uno cualquiera de los polipéptidos, análogos o derivados de los mismos descritos en el presente documento (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6), y un agente, cuando el agente se conjuga con el vector.

El agente puede seleccionarse del grupo que consiste en un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco de moléculas pequeñas, tal como un agente anticanceroso, antibiótico o cualquiera descrito en el presente documento), una etiqueta detectable, un polipéptido (por ejemplo, una enzima), y un complejo de proteínas. En algunas realizaciones, el agente tiene un peso molecular máximo de aproximadamente 160.000 Daltons. El agente puede ser una molécula activa en el sistema nervioso central. El agente puede ser cualquier agente útil para tratar o detectar una enfermedad neurológica, hepática, pulmonar, renal o del bazo. La etiqueta detectable puede ser, por ejemplo, un agente de radioimagen (por ejemplo, un isótopo), una etiqueta fluorescente (por ejemplo, rodamina, FITC, cy5.5, alexa), una molécula indicadora (por ejemplo, biotina). Otros ejemplos de etiquetas detectables incluyen proteína fluorescente verde, proteína histag y  $\beta$ -galactosidasa. El conjugado puede ser una proteína de fusión que consiste esencialmente en el vector y una proteína. Los ejemplos de compuestos basados en proteína que pueden conjugarse con un vector de la invención incluyen un anticuerpo (por ejemplo, incluyendo cadenas pesadas y/o ligeras), un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento de unión a anticuerpo tal como fragmento Fv, F(ab)<sub>2</sub>, F(ab)<sub>2</sub>' y Fab). Un anticuerpo o fragmento del mismo que puede conjugarse con el vector incluye un anticuerpo monoclonal o policlonal y, además, puede ser de cualquier origen (por ejemplo, anticuerpos humanos, quiméricos y humanizados). Otros compuestos de proteína o basados en proteína incluyen toxinas celulares (por ejemplo, monometil auristatina E (MMAE), exotoxinas y endotoxinas bacterianas, toxinas diféricas, toxina botulínica, toxina del tétanos, toxinas Perussis, enterotoxinas estafilocócicas, toxina del síndrome del choque tóxico TSST-1, toxina adenilato ciclasa, toxina shiga y enterotoxina del cólera) y compuestos antiangiogénicos (endostatina, catequina, nutricéuticos, quimiocina IP-10, inhibidores de la metaloproteinasas de matriz (MMP1), anastelina, vironectina, anti trombina, inhibidores de la tirosina cinasa, inhibidores de VEGF, anticuerpos frente a receptor, herceptina, avastina y panitumumab).

Puede usarse leptina, exendina-4, GLP-1, PYY o PYY(3-36), por ejemplo, para el tratamiento de obesidad. Otros polipéptidos que pueden incluirse en un conjugado de la invención son hormonas adrenocorticotrópicas (ACTH, corticotropina), péptidos de la hormona del crecimiento (por ejemplo, lactógeno placentario humano (hPL), hormonas del crecimiento y prolactina (PrI)), hormonas estimulantes de melanocitos (MSH), oxitocina, vasopresina (ADH), factor liberador de corticotropina (CRF), péptidos asociados con la hormona liberadora de gonadotropina (GAP), factor liberador de la hormona del crecimiento (GRF), hormonas liberadoras de la hormona luteinizante (LH-RH), orexinas, péptidos liberadores de la prolactina, somatostatina, hormona liberadora de la tirotrópina (THR), calcitonina (CT), péptido precursor de la calcitonina, péptido relacionado con el gen de la calcitonina (CGRP), hormonas paratiroideas (PTH), proteínas relacionadas con la hormona paratiroidea (PTHrP), amilina, glucagón, insulina y péptidos similares a insulina, neuropéptido Y, polipéptido pancreático (PP), péptido YY, somatostatina, colecistocinina (CCK), péptido liberador de la gastrina (GRP), gastrina, péptido inhibidor de la gastrina, motilina, secretina, péptido intestinal vasoactivo (VIP), péptidos natriuréticos (por ejemplo, péptido natriurético atrial (ANP), péptido natriurético tipo B (BNP), péptido natriurético cerebral y péptido natriurético tipo C (CNP)), taquicinas (por ejemplo, neurocinina A, neurocinina B y sustancia P), sustancia P, angiotensinas (por ejemplo, angiotensina I y angiotensina II), renina, endotelinas (por ejemplo, endotelina-1, endotelina-2, endotelina-3, sarafotoxina (un veneno de serpiente) y toxina de escorpión), péptidos de sarafotoxina, péptidos opioides (por ejemplo, péptidos de casomorfina, demorfina, endorfina, encefalina, deltorfina, dinorfina), péptidos tímicos (por ejemplo, timopoyetina, timulina, timopentina, timosina, factor humoral tímico (THF)), péptidos de adenomedulina (AM), péptidos de alostatina, fragmentos de beta-proteína amiloide (fragmentos A $\beta$ ), péptidos antimicrobianos (por ejemplo, defensina, cecropina, buforina y magainina), péptidos antioxidantes (por ejemplo, factor B de mejora de células asesinas naturales (NKEF-B), bombesina, péptidos de la proteína Gla ósea (por ejemplo, osteocalcina (proteína Gla ósea o BGP), péptidos CART, péptidos de adhesión celular, péptidos de cortistatina, fragmentos de fibronectina y péptidos relacionados con fibrina, péptidos FMRF, galanina, guanilina y uroguanilina y péptidos de inhibina.

Los fármacos de moléculas pequeñas incluyen agentes anticancerosos (por ejemplo, cualquier agente de este tipo descrito en el presente documento). Los ejemplos de agentes anticancerosos incluyen paclitaxel (Taxol), vinblastina,

vincristina, etopósido, doxorubicina, ciclofosfamida, taxotere, melfalán, clorambucilo y cualquier agente anticanceroso descrito en el presente documento, o cualquier combinación de los mismos. Un agente anticanceroso puede tener un resto químico que permite la conjugación con el vector de la invención.

5 En determinadas realizaciones, el conjugado de la invención puede incluir la fórmula  $V_x-L_y-A_z$  o una sal farmacéuticamente aceptable de la misma, en la que V es un polipéptido o derivado del mismo descrito en el presente documento (por ejemplo, Angiopep-7, o cualquiera de los análogos, derivados o fragmentos descritos en el presente documento). Se dan a conocer además conjugados tales en los que V es, por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6), o cualquiera de los análogos, derivados o fragmentos  
10 descritos en el presente documento. V puede transportarse de manera eficaz al interior de un tipo de célula particular (por ejemplo, una célula hepática, pulmonar, renal, de bazo o muscular) o puede transportarse de manera eficaz a través de la BHE (por ejemplo, tras la unión a  $L_y-A_z$ ). En determinadas realizaciones, el vector o conjugado no se transporta de manera eficaz a través de la BHE, pero se transporta de manera eficaz al interior de un tipo de célula particular (por ejemplo, Angiopep-7). L es un ligador o un enlace (por ejemplo, enlace químico o covalente). A  
15 es un agente tal como los seleccionados del grupo que consiste en un agente terapéutico (por ejemplo, un fármaco de moléculas pequeñas), una etiqueta detectable, una proteína o compuesto basado en proteína (por ejemplo, anticuerpo, un fragmento de anticuerpo), un antibiótico, un agente anticanceroso, un compuesto antiangiogénico y un polipéptido o cualquier molécula activa al nivel del sistema nervioso central.

20 X, Y y Z pueden ser cada uno independientemente cualquier número superior a 0 (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10) o pueden representar un intervalo de valores entre 1 (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9) y 10 (por ejemplo, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2). Por consiguiente, la fórmula  $V_x-L_y-A_z$  no se limita a un orden específico o razón específica; por ejemplo, el conjugado puede incluir de 1 a 5 vectores (1, 2, 3, 4 ó 5) acoplados al agente. En otras realizaciones, más de un agente puede conjugarse con el vector. El agente o conjugado puede ser activo cuando el agente se  
25 conjuga con el vector. En algunas realizaciones, el compuesto puede liberarse desde el vector, por ejemplo, tras el transporte a través de la BHE o al interior de un tipo de célula particular. El compuesto puede volverse activo tras su liberación (por ejemplo, como un profármaco). En algunas realizaciones, el agente permanece conjugado con el vector tras el transporte. En el presente documento, el conjugado puede presentar transporte de eflujo reducido (por ejemplo, mediante glicoproteína P) en comparación con el agente no conjugado. En este caso, puede ser deseable que el agente y el vector permanezcan unidos. El conjugado puede proporcionarse en una composición farmacéuticamente aceptable.  
30

El agente, cuando se conjuga con un vector, puede presentar biodisponibilidad modificada (por ejemplo, mejorada), potencia mejorada (por ejemplo, actividad anticancerosa), distribución del tejido alterada del agente, toxicidad  
35 disminuida o farmacocinética alterada en comparación con el agente cuando no se conjuga con el vector. Un vector (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6) puede promover la acumulación del agente en el cerebro de un individuo (por ejemplo, un cerebro que contiene una célula tumoral tal como un glioblastoma, célula tumoral de pulmón, mama, colon, hígado, páncreas, o bazo) o en un tejido o célula particular (por ejemplo, de hígado, pulmón, riñón, bazo y músculo). Un vector tal como Angiopep-7 puede promover la  
40 acumulación en tipos de células tales como de hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo, pero no promueve la acumulación en el cerebro. Más particularmente, el vector puede aumentar la acumulación o potencia de un agente que es un sustrato de P-gp o agentes terapéuticos que se expulsan por P-gp o una proteína relacionada con P-gp (por ejemplo, una variante alélica de mamífero o humana P-gp, por ejemplo, isoformas mdr1a o mdr1b de un roedor), cuando se proporciona (por ejemplo, se administra) a un sujeto. La célula puede expresar o puede ser  
45 capaz de expresar una proteína relacionada con P-gp o P-gp. La célula al interior de la que se transporta el conjugado puede expresar un receptor o transportador de vector, por ejemplo, un receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad (LRP) (por ejemplo, una célula que expresa conjuntamente P-gp o una proteína relacionada con P-gp). La célula puede ser, por ejemplo, una célula normal, una célula tumoral o una célula metastásica (por ejemplo, una célula cancerosa resistente a múltiples fármacos). La célula o tumor puede ser una  
50 metástasis (por ejemplo, de cualquiera de los cánceres descritos en el presente documento).

Un vector o conjugado puede transportarse de manera eficaz al interior de un tipo de célula particular (por ejemplo, células hepáticas, pulmonares, renales, de bazo o musculares) y puede transportarse de manera eficaz a través de la BHE; tales conjugados incluyen Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6. En  
55 determinadas realizaciones, la actividad transportadora del vector, por sí misma, no afecta a la integridad de la célula a la que se está administrando o no afecta a la integridad de la BHE. En otras realizaciones, el vector o conjugado, tal como Angiopep-7, se transporta de manera eficaz al interior de un tipo de célula particular, pero no se transporta de manera eficaz a través de la BHE. Cualquier vector o conjugado descrito en el presente documento puede transportarse mediante endocitosis o transcitosis mediada por receptores o mediante endocitosis o transcitosis  
60 mediada por adsorción.

Cualquier vector o conjugado descrito en el presente documento puede estar presente en un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, puede estar en forma de un medicamento). Por tanto, la invención presenta una composición farmacéutica que incluye (a) un conjugado (por ejemplo, cualquier conjugado descrito en el presente documento); (b) un portador farmacéuticamente aceptable (por ejemplo, cualquiera descrito en el presente documento). El conjugado puede incluir además (c) un solubilizante. El solubilizante puede ser, por  
65

ejemplo, un éster de polioxi-etileno de ácido graso (por ejemplo, Solutol® HS-15). La composición farmacéutica puede usarse para modificar la farmacocinética de un compuesto, para reducir el crecimiento de una célula tumoral o para la detección de una célula tumoral.

5 En otro aspecto, la invención presenta el uso de un vector o un conjugado de la invención para el diagnóstico o tratamiento (por ejemplo, para la fabricación de un medicamento o uso en el tratamiento) de una enfermedad hepática, enfermedad pulmonar, enfermedad renal, enfermedad del bazo o enfermedad muscular. En determinadas realizaciones, una enfermedad neurológica o una enfermedad del sistema nervioso central (por ejemplo, cualquier enfermedad descrita en el presente documento) puede tratarse usando un conjugado de la invención que se transporta de manera eficaz a través de la BHE. Por ejemplo, el vector o conjugado puede usarse para la detección *in vivo* de cualquiera de estas enfermedades. El tratamiento o diagnóstico puede realizarse en un mamífero (por ejemplo, un ser humano o un mamífero no humano) que lo necesita, tal como un mamífero que tiene o corre el riesgo (por ejemplo, riesgo aumentado) de tener la enfermedad (por ejemplo, un cáncer). La administración puede realizarse usando cualquier medio conocido en la técnica, por ejemplo por vía oral, por vía intraarterial, por vía intranasal, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía transdérmica o por la boca. La administración puede ser en una cantidad terapéuticamente eficaz.

Al conjugar un agente con un vector descrito en el presente documento puede reducirse la toxicidad del agente, permitiendo por tanto que el agente se proporcione al sujeto a una dosis superior a la dosis recomendada para el agente solo. Por consiguiente, la invención presenta un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o un estado (por ejemplo, cualquier enfermedad o estado descrito en el presente documento tal como cáncer) que incluye proporcionar un conjugado de la invención al sujeto, en el que dicho conjugado incluye un agente, a una dosis superior (por ejemplo, al menos el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 75%, el 100%, el 250%, el 500%, el 1.000%, el 5.000% o el 10.000% superior) a la dosis terapéutica del agente solo.

Debido a que un vector descrito en el presente documento puede dirigir un agente a un tipo de célula particular (por ejemplo, los descritos en el presente documento), el agente cuando se conjuga con un vector puede, en determinadas realizaciones, tener una eficacia mayor cuando se administra al sujeto. Por consiguiente, la invención también presenta un método de tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad o un estado (por ejemplo, cualquier enfermedad o estado descrito en el presente documento tal como cáncer) mediante la administración al sujeto de un conjugado o una composición que incluye un conjugado de la invención, en el que el conjugado incluye un agente, en una dosis inferior (por ejemplo, el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 30%, el 50%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 98%, el 99%, el 99,9% inferior) a la dosis terapéutica del agente solo.

Los métodos de tratamiento de la invención pueden comprender además una etapa de evaluación de si el tumor del individuo incluye una célula tumoral resistente a múltiples fármacos (por ejemplo, una célula que expresa P-gp (MDR1) o determinación de si el tumor puede tener o tiene un fenotipo resistente a múltiples fármacos). Los métodos de tratamiento pueden incluir una etapa de proporcionar quimioterapia, radioterapia, o ambas. Alternativamente, el sujeto que está tratándose puede haber recibido (o recibirá) tales terapias (por ejemplo, en el plazo de 1 año, 6 meses, 3 meses, 2 meses, 1 mes, 2 semanas, 1 semana, 3 días, 2 días o 1 día). El individuo puede haber pasado por una cirugía. El individuo puede tener un tumor cerebral (por ejemplo, un tumor cerebral primario) o un tumor en un sitio distinto del cerebro (por ejemplo, no tener un tumor cerebral). Un individuo con necesidad puede tener presente o corre el riesgo de desarrollar una resistencia a al menos un fármaco (por ejemplo, un fenotipo resistente a múltiples fármacos (MDR)). El tumor puede ser un tumor pulmonar, una metástasis extracraneal de un tumor cerebral de (por ejemplo, procedente de un glioblastoma), un tumor cerebral de origen metastásico (por ejemplo, desde un tumor pulmonar, un tumor de mama, un melanoma, un cáncer colorrectal o un tumor de órgano urinario). El tumor puede incluir una célula que expresa P-gp, LRP, o ambos, o una célula que puede expresar P-gp, LRP, o ambos. P-gp y LRP pueden ubicarse en una superficie celular.

En otro aspecto, la invención también presenta el conjugado de la presente invención para su uso en un método de aumentar la concentración de un agente en una célula o transporte de un agente a una célula, en el que la célula expresa un miembro de la familia de receptores de LRP. El método incluye poner en contacto la célula con un conjugado que comprende el agente conjugado con un vector (por ejemplo, cualquier polipéptido descrito en el presente documento), aumentando de ese modo la concentración del agente en la célula o transportando el agente a la célula. La invención también presenta un método de aumentar la concentración de agente en una célula, en el que la célula expresa glicoproteína P. El método incluye poner en contacto la célula con un conjugado que incluye el agente conjugado con un vector (por ejemplo, cualquier polipéptido descrito en el presente documento), aumentando de ese modo la concentración del agente en la célula, en comparación con el agente no conjugado.

Según cualquiera de los aspectos de la invención, las enfermedades neurológicas incluyen un tumor cerebral, una metástasis cerebral, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, accidente cerebrovascular y mal funcionamiento relacionado con la BHE (por ejemplo, obesidad). La enfermedad hepática puede ser un cáncer tal como hepatocarcinoma. Otras enfermedades hepáticas incluyen las descritas en el presente documento. La enfermedad pulmonar puede ser un cáncer de pulmón (por ejemplo, los descritos en el presente documento).

Los conjugados pueden incluir vectores en forma de multímeros tales como dímeros. Las formas multiméricas de los vectores pueden, en algunas realizaciones, aumentar el transporte o acumulación del agente. Los vectores también pueden estar en una razón de al menos 1:1 (agente:vector), 1:2, 1:3, 1:4, 1:5, 1:6 ó 1:10. Tal como se indica en el presente documento, las razones superiores de vector con respecto a agente pueden conducir a un transporte  
5 aumentado. Como tal, no pretende limitarse el número de vector por agente.

También según la invención, la composición farmacéutica puede usarse, por ejemplo, para la administración de un agente al SNC de un individuo.

10 Una sal farmacéuticamente aceptable de un vector (polipéptido) o de un conjugado se abarca por la invención y puede incluir sales de adición de ácido farmacéuticamente aceptables del agente.

El vector o conjugado de la invención puede usarse en combinación con o por separado de métodos de tratamiento o terapia convencionales. La terapia de combinación con otros agentes puede incluir administración secuencial o simultánea a un individuo. Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir una combinación de un  
15 conjugado de vector-agente de la invención en asociación con un excipiente farmacéuticamente aceptable, tal como se describe en el presente documento, y otro agente terapéutico o profiláctico conocido en la técnica.

Por "vector" quiere decirse un compuesto o molécula tal como un polipéptido que puede transportarse al interior de un tipo de célula particular (por ejemplo, de hígado, pulmones, riñón, bazo o músculo) o a través de la BHE. El vector puede unirse a (de manera covalente o no) o conjugarse con un agente y de ese modo puede transportar el agente al interior de un tipo de célula particular o a través de la BHE. En determinadas realizaciones, el vector puede unirse a receptores presentes en células cancerosas o células endoteliales cerebrales y de ese modo transportarse al interior de la célula cancerosa o a través de la BHE mediante transcitosis. El vector puede ser una molécula para  
20 la que pueden obtenerse altos niveles de transporte transendotelial, sin afectar a la integridad de la célula o la BHE. El vector puede ser un polipéptido o un peptidomimético y puede producirse de manera natural o producirse mediante síntesis química o tecnología genética recombinante.

Por "conjugado" quiere decirse un vector unido a un agente. La conjugación puede ser de naturaleza química, tal como a través de un ligador, o de naturaleza genética por ejemplo mediante tecnología genética recombinante, tal como en una proteína de fusión con por ejemplo una molécula indicadora (por ejemplo, proteína fluorescente verde,  $\beta$ -galactosidasa, Histag, etc.).

Por un vector que "se transporta de manera eficaz a través de la BHE" quiere decirse un vector que puede cruzar la BHE al menos de manera tan eficaz como Angiopep-6 (es decir, superior en el 38,5% al de Angiopep-1 (250 nM) en el ensayo de perfusión cerebral *in situ* descrito en el presente documento). Por consiguiente, un vector o conjugado que "no se transporta de manera eficaz a través de la BHE" se transporta al cerebro a niveles inferiores (por ejemplo, transportados de manera menos eficaz que Angiopep-6).

Por un vector o conjugado que "se transporta de manera eficaz a un tipo de célula particular" quiere decirse un vector o conjugado que puede acumular (por ejemplo, o bien debido al transporte aumentado al interior de la célula, o bien eflujo disminuido desde la célula, o bien una combinación de los mismos) en ese tipo de célula al menos el 10% (por ejemplo, el 25%, el 50%, el 100%, el 200%, el 500%, el 1.000%, el 5.000% o el 10.000%) en mayor grado que o bien una sustancia control, o bien, en el caso de un conjugado, en comparación con el agente no conjugado.

Por "sustancialmente puro" o "aislado" quiere decirse un compuesto (por ejemplo, un polipéptido o conjugado) que se ha separado de otros componentes químicos. Normalmente, el compuesto es sustancialmente puro cuando está al menos en el 30%, en peso, libre de otros componentes. En determinadas realizaciones, la preparación está al menos en el 50%, el 60%, el 75%, el 85%, el 90%, el 95%, el 96%, el 97%, el 98% o el 99% en peso, libre de otros componentes. Un polipéptido purificado puede obtenerse, por ejemplo, mediante expresión de un polinucleótido recombinante que codifica para un polipéptido de ese tipo o mediante síntesis química del polipéptido. La pureza puede medirse mediante cualquier método apropiado, por ejemplo, cromatografía en columna, electroforesis en gel de poliacrilamida o mediante análisis de HPLC.

Por "análogo" quiere decirse un polipéptido que se origina de una secuencia original o de una parte de una secuencia original y que puede incluir una o más modificaciones; por ejemplo, una o más modificaciones en la secuencia de aminoácidos (por ejemplo, una adición, delección, inserción o sustitución de aminoácido), una o más modificaciones en la estructura principal o cadena lateral de uno o más aminoácidos, o una adición de un grupo u otra molécula a uno o más aminoácidos (cadenas laterales o estructura principal). Un análogo puede tener una o más inserciones de aminoácido, en cualquiera o en los dos extremos del polipéptido o dentro de la secuencia de aminoácidos del polipéptido. Un análogo puede tener similitud de secuencia y/o identidad de secuencia (por ejemplo, puede ser sustancialmente idéntico) con la de una secuencia original o una parte de una secuencia original. Los análogos pueden incluir una modificación de su estructura, por ejemplo, tal como se describe en el presente documento. El grado de similitud entre dos secuencias se basa en el porcentaje de identidades (aminoácidos idénticos) y de sustitución conservativa. Un análogo puede tener al menos el 35%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90% o el 95% (por ejemplo, el 96%, el 97%, el 98%, el 99% y el 100%) de similitud de secuencia con una  
55  
60  
65

secuencia original con una combinación de una o más modificaciones en una estructura principal o cadena lateral de un aminoácido, o una adición de un grupo u otra molécula. Los aminoácidos a modo de ejemplo que se pretenden que sean similares (un aminoácido conservativo) a otros se conocen en la técnica e incluyen, por ejemplo, los listados en la tabla 3.

5 Por “sustancialmente idéntico” quiere decirse un polipéptido o ácido nucleico que presenta al menos el 35%, el 40%, el 50%, el 55%, el 60%, el 65%, el 70%, el 75%, el 85%, el 90%, el 95%, o incluso el 99% de identidad con un aminoácido de referencia o secuencia de ácido nucleico. Para los polipéptidos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 4 (por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 10 19, 20, 25, 50 ó 100) aminoácidos. Para los ácidos nucleicos, la longitud de las secuencias de comparación será generalmente de al menos 60 nucleótidos, preferiblemente al menos 90 nucleótidos y más preferiblemente al menos 120 nucleótidos, o longitud completa. Debe entenderse en el presente documento que pueden encontrarse huecos entre los aminoácidos de análogos que son idénticos o similares a aminoácidos del polipéptido original. Los huecos pueden no incluir aminoácidos, o incluir uno o más aminoácidos que no son idénticos o similares al polipéptido original. Los análogos biológicamente activos de los vectores (polipéptidos) de la invención se abarcan con lo mismo. El porcentaje de identidad puede determinarse, por ejemplo, con un algoritmo GAP, BESTFIT o FASTA en el Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, usando pesos de hueco por defecto.

20 Por “derivado funcional” quiere decirse un “derivado químico”, “fragmento” o “variante” de secuencia biológicamente activa o parte de un vector o agente o conjugado y una sal de los mismos de la invención. Un derivado funcional del vector puede unirse a o conjugarse con un agente y entrar en un tipo de célula particular, transportando de ese modo el agente al interior de esa célula.

25 Por “derivado químico” quiere decirse un vector, un agente o un conjugado de la invención, que contiene restos químicos adicionales que no forman parte del vector, agente o conjugado de vector-agente, incluyendo modificaciones covalentes. Un derivado químico puede prepararse mediante síntesis química directa usando métodos conocidos en la técnica. Tales modificaciones pueden introducirse en un vector de proteína o péptido, agente o conjugado de vector-agente haciendo reaccionar residuos de aminoácido seleccionados como diana con un agente de derivación orgánico que puede reaccionar con cadenas laterales seleccionadas o residuos terminales. 30 Un derivado químico de vector puede cruzar la BHE o entrar o acumularse en un tipo de célula particular (por ejemplo, los descritos en el presente documento). En una realización preferida, se obtienen niveles muy altos de transporte transendotelial a través de la BHE sin afectar a la integridad de la BHE.

35 Por “fragmento” quiere decirse un polipéptido que se origina a partir de una parte de una secuencia original o parental o a partir de un análogo de dicha secuencia parental. Los fragmentos abarcan polipéptidos que tienen truncamientos de uno o más aminoácidos, en los que el truncamiento puede originarse desde el extremo aminoterminal (N-terminal), extremo carboxilo-terminal (C-terminal), o desde el interior de la proteína. Un fragmento puede incluir la misma secuencia que la parte correspondiente de la secuencia original. Los fragmentos funcionales del vector (polipéptido) descritos en el presente documento se abarcan por la invención. Los fragmentos pueden ser de 40 al menos 5 (por ejemplo, al menos 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 25, 28, 30, 35, 40, 45, 50, 60, 75, 100 ó 150) aminoácidos. Los fragmentos de la invención pueden incluir, por ejemplo, un polipéptido de 7, 8, 9 ó 10 aminoácidos a 18 aminoácidos. Los fragmentos pueden contener cualquiera de las modificaciones descritas en el presente documento (por ejemplo, acetilación, amidación, sustituciones de aminoácido).

45 Un “aminoácido que no se produce de manera natural” es un aminoácido que no se produce de manera natural o se encuentra en un mamífero.

50 Por “agente” quiere decirse, cualquier compuesto, por ejemplo, un anticuerpo, o un agente terapéutico, un marcador, un trazador o un compuesto de obtención de imágenes.

55 Por “agente terapéutico” quiere decirse un agente que tiene una actividad biológica. En algunos casos, el agente terapéutico se usa para tratar los síntomas de una enfermedad, un estado físico o mental, una lesión o una infección e incluye agentes anticancerosos, antibióticos, agentes antiangiogénicos, y moléculas activas al nivel del sistema nervioso central.

Por “fármaco de moléculas pequeñas” quiere decirse un fármaco que tiene un peso molecular de 1.000 g/mol o menos (por ejemplo, menos de 800, 600, 500, 400 ó 200 g/mol).

60 Por “sujeto” quiere decirse un ser humano o animal no humano (por ejemplo, un mamífero).

65 Por “tratamiento”, “tratar” y similares quieren decirse obtener un efecto farmacológico o fisiológico deseado, por ejemplo, inhibición de crecimiento de células cancerosas, muerte de una célula cancerosa, mejora de una enfermedad o estado (por ejemplo, cualquier enfermedad o estado descrito en el presente documento), o mejora de al menos un síntoma asociado con una enfermedad o estado. El efecto puede ser profiláctico, por ejemplo, prevenir completa o parcialmente una enfermedad o síntoma del mismo o puede ser terapéutico en cuanto a una cura parcial

o completa para una enfermedad y/o efecto adverso atribuible a la enfermedad. El tratamiento incluye: (a) prevenir que se produzca una enfermedad o estado (por ejemplo, prevenir el cáncer) en un individuo (por ejemplo, alguien que tiene predisposición para la enfermedad pero al que no se le ha sido diagnosticado que la tenga); (b) inhibir una enfermedad (por ejemplo, detener su desarrollo); o (c) aliviar una enfermedad (por ejemplo, reducir síntomas asociados con una enfermedad). El tratamiento incluye cualquier administración de un agente terapéutico a un individuo para tratar, curar, aliviar, mejorar, disminuir o inhibir un estado en el individuo, incluyendo, sin limitación, administrar un conjugado de vector-agente a un individuo.

Por “cáncer” quiere decirse cualquier proliferación celular cuya única característica es la pérdida de controles normales lo que puede dar como resultado un crecimiento no regulado, carencia de diferenciación, o capacidad de invadir tejidos y metástasis. El cáncer puede desarrollarse en cualquier tejido o en cualquier órgano. El cáncer pretende incluir, sin limitación, cáncer del cerebro, hígado, pulmones, riñón o bazo. Se describen cánceres adicionales en el presente documento.

Por “proporcionar” quiere decirse, en el contexto de un vector o conjugado de la invención, poner el vector o conjugado en contacto con un tejido o célula diana o bien *in vivo* o bien *in vitro*. Un vector o conjugado puede proporcionarse administrando el vector o conjugado a un sujeto.

Por “administrar” y “administración” quiere decirse un modo de administrar incluyendo, sin limitación, por vía intraarterial, por vía intranasal, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía transdérmica o por la boca. Una dosificación diaria puede dividirse en una, dos o más dosis en una forma adecuada que va a administrarse en uno, dos o más momentos a lo largo de un periodo de tiempo.

Por “terapéuticamente eficaz” o “cantidad eficaz” quiere decirse una cantidad de un agente terapéutico suficiente para mejorar, disminuir, prevenir, retrasar, suprimir o detener cualquier síntoma de la enfermedad o estado que se está tratando. No es necesario que una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente cure una enfermedad o estado, sino que proporcionará un tratamiento para una enfermedad o estado de modo que la aparición de la enfermedad o estado se retrasa, impide o previene, o se mejoran los síntomas de la enfermedad o estado, o se cambia el término de la enfermedad o estado o, por ejemplo, es menos grave o se acelera la recuperación en un individuo.

Por “estado” quiere decirse cualquier situación que provoca dolor, incomodidad, mareo, enfermedad o incapacidad (mental o física) a o en un individuo, incluyendo enfermedad neurológica, lesión, infección, o dolor crónico o agudo. Las enfermedades neurológicas incluyen tumores cerebrales, metástasis cerebrales, esquizofrenia, epilepsia, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington y accidente cerebrovascular.

Por “composición farmacéutica” quiere decirse una cantidad terapéuticamente eficaz de un agente junto con un diluyente, conservante, solubilizante, emulsionante o adyuvante farmacéuticamente aceptable, por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento.

Por “dosis terapéutica” quiere decirse la dosificación de un agente tal como un fármaco (sin el vector) aceptable para su uso clínico con respecto a su toxicidad o eficacia. Por conjugación de un agente con un vector de la invención, puede ser posible administrar el agente a una dosificación o bien inferior o bien superior a la dosis terapéutica.

Si se menciona una “gama” o un “grupo de sustancias” con respecto a una característica particular (por ejemplo, temperatura, concentración, tiempo y similares), la invención se refiere a e incorpora explícitamente en el presente documento todos y cada uno de los miembros específicos y combinaciones de subgamas o subgrupos en los mismos. Por tanto, por ejemplo, con respecto a una longitud de desde 9 hasta 18 aminoácidos, debe entenderse como que se incorpora específicamente en el presente documento todas y cada una de las longitudes individuales, por ejemplo, una longitud de 18, 17, 15, 10, 9 y cualquier número entre los mismos. Por tanto, a menos que se mencione específicamente, cada intervalo mencionado en el presente documento debe entenderse como que es inclusivo. Por ejemplo, la expresión desde 5 hasta 19 aminoácidos de longitud incluye 5 y 19. Esta similitud se aplica con respecto a otros parámetros tales como secuencias, longitud, concentraciones, elementos y similares.

Las secuencias, regiones, partes definidas en el presente documento incluyen cada una todas y cada una de las secuencias, regiones y partes individuales descrita de ese modo así como todas y cada una de las posibles subsecuencias, subregiones y subpartes si tales subsecuencias, subregiones y subpartes se definen como que incluyen positivamente posibilidades particulares, como que excluyen posibilidades particulares o una combinación de las mismas. Por ejemplo, una definición excluyente para una región puede decir lo siguiente: “siempre que dicho polipéptido no sea más corto que 4, 5, 6, 7, 8 ó 9 aminoácidos. Un ejemplo adicional de una limitación negativa es lo siguiente; una secuencia que incluye SEQ ID NO:X con la exclusión de un polipéptido de SEQ ID NO:Y; etc. Un ejemplo adicional de una limitación negativa es lo siguiente; siempre que dicho polipéptido no sea (no incluya o consista en) SEQ ID NO:Z.

**Breve descripción de los dibujos**

- La figura 1 ilustra la estructura de polipéptidos a modo de ejemplo de la invención.
- La figura 2 ilustra el protocolo usado para conjugar aprotinina con IgG usando el agente de reticulación BS<sup>3</sup>.
- 5 La figura 3 ilustra el protocolo usado para conjugar aprotinina con IgG usando el agente de reticulación sulfo-EMCS.
- La figura 4 ilustra el protocolo usado para conjugar Angiopep-2 con anticuerpos usando el agente de reticulación ECMS.
- 10 La figura 5 ilustra el protocolo usado para conjugar Angiopep-2 con anticuerpos usando el agente de reticulación SATA.
- La figura 6 ilustra el protocolo usado para conjugar Angiopep-2 con anticuerpos usando dianas de hidrato de carbono a través de hidrazida.
- 15 La figura 7 ilustra otros posibles ligadores que pueden usarse en la preparación de un conjugado.
- La figura 8 ilustra un método para unir un vector de la invención a paclitaxel.
- 20 La figura 9 es una representación esquemática de la bomba de eflujo, glicoproteína P (P-gp o MDR1) a la superficie celular. La bomba de eflujo, P-gp o MDR1, asociada con resistencia a múltiples fármacos se expresa altamente en la superficie celular de muchas células cancerosas y diversos tejidos incluyendo la barrera hematoencefálica (BHE).
- La figura 10A y 10B son diagramas que representan la distribución tisular de Taxol y conjugado de TxIA1.
- 25 La figura 11 es un diagrama que representa la distribución pulmonar de Taxol y TxIA1.
- La figura 12 es un diagrama que representa los niveles de conjugado de TxIA1 en plasma y pulmón.
- 30 La figura 13 es un conjunto de imágenes que muestra la acumulación *in vivo* de Angiopep-2 y Angiopep-7 en los cerebros de ratas 30 minutos tras la inyección IV. Angiopep-2 se acumula en un grado mayor en el cerebro en comparación con Angiopep-7.
- La figura 14 es un conjunto de imágenes que muestran microscopía de fluorescencia de secciones cerebrales tras una perfusión *in situ* de 10 min. de o bien Angiopep-2 o bien Angiopep-7 marcado de manera fluorescente. Estas imágenes muestran que Angiopep-2 se ubica dentro del cerebro, mientras que Angiopep-7 se ubica dentro de los capilares.
- 35 La figura 15A es un conjunto de imágenes que muestran la obtención de imágenes *in vivo* de Angiopep-2 y Angiopep-7 en el hígado, pulmones y riñones de una rata. Se observa que Angiopep-7 se acumula en estos tejidos.
- La figura 15B es un gráfico que muestra imágenes de órganos *ex vivo* 24 horas tras la inyección de o bien Angiopep-2 o bien Angiopep-7 en una rata. Ambos polipéptidos se acumulan en los riñones, hígado y pulmones. Angiopep-2 se acumula en un grado mayor en el cerebro en comparación con Angiopep-7.
- 45 La figura 16 ilustra el volumen de distribución en el parénquima cerebral de IgG conjugado con Angiopeps y libre.
- La figura 17 es un diagrama de proliferación celular en presencia del fármaco parental Taxol. Se expusieron células de glioblastoma (U-87) a diversas concentraciones de Taxol durante 3 días. Se trazó la 3H-timidina incorporada en células como una función de concentraciones de Taxol.
- 50 Las figuras 18A y 18B son gráficos que representan el efecto de tratamiento con TxIA2 sobre el crecimiento tumoral de glioblastomas subcutáneos (U-87).
- 55 La figura 19 es un conjunto de fotomicrografías que muestran la detección de  $\beta$ -tubulina en células NCI-H460 mediante inmunofluorescencia o luz visible en células cancerosas expuestas a Taxol o conjugado de TxIA2. Como control, se expusieron las células a DMSO al 1%.
- La figura 20 es un conjunto de gráficos que muestra el efecto de Taxol y conjugado de TxIA2 en el ciclo celular de NCI-H460 medido mediante FACS. Se expusieron células durante 24 h con el vehículo (DMSO), Taxol (100 nM) o conjugado de TxIA2 (30 nM, equivalente a 100 nM de Taxol).
- 60 La figura 21A es un gráfico que muestra la acumulación de diversos fármacos en células MDCK transfectadas con MDR1 en presencia o ausencia (control) de CsA 10  $\mu$ M, un inhibidor de P-gp. Se realizó el experimento en presencia de DMSO al 1%.
- 65

La figura 21B es un gráfico que muestra la acumulación del conjugado en células que sobreexpresan P-gp.

Las figuras 22A y 22B son fotografías de inmunotransferencias de tipo Western que muestran inmunodetección de LRP en biopsias de tumor cerebral humano.

5 Las figuras 23A y 23B son una representación esquemática de la conjugación de un fármaco con el vector de la invención.

La figura 24 es un cromatograma que ilustra la producción del conjugado de TxIAn2 (3:1).

10 La figura 25 es un análisis de HPLC del pico purificado sobre una columna hidrófoba usando el explorador AKTA.

La figura 26 ilustra la asociación de Angiopep-2 con la cadena ligera y pesada de IgG.

15 La figura 27 ilustra el aumento de volumen de distribución de cerebro de conjugados de IgG-Angiopep-2 reticulados con sulfo-EMCS.

La figura 28 ilustra la penetración cerebral para los conjugados de IgG-Angiopep-2 usando perfusión cerebral *in situ*.

20 La figura 29 ilustra un autorradiograma de conjugados de [<sup>125</sup>I]-IgG-Angiopep radiomarcados.

La figura 30 ilustra la detección similar de EGFR sobre células U87 con anti-EGFR y conjugado de anti-EGFR-Angiopep-2 mediante análisis de FACS.

25 La figura 31 ilustra el volumen de distribución en el parénquima cerebral de anticuerpo EGFR conjugado con Angiopep-2 y libre.

La figura 32 ilustra el volumen de distribución en el parénquima cerebral de anticuerpo VEGF conjugado con Angiopep-2 y libre.

30 La figura 33 ilustra la captación de conjugados incluyendo diferentes razones de vector con respecto al agente (anticuerpo) en el parénquima.

### Descripción detallada de la invención

35 Se ha descubierto que Angiopep-7 puede transportarse de manera eficaz al interior de tipos de células particulares u órganos tales como hígado, pulmones, riñones, bazo y músculo, pero no se transporta de manera eficaz a través de la barrera hematoencefálica (BHE), en relación con polipéptidos tales como Angiopep-1 o Angiopep-2. Basándose en esto, se ha identificado Angiopep-7 como un vector adecuado para transportar agentes (por ejemplo, para el

40 tratamiento de enfermedades asociadas con estos tejidos, tales como cáncer o cualquiera de las enfermedades descritas en el presente documento). También se han identificado otros polipéptidos, incluyendo Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6, que también pueden usarse como vectores en la invención. Estos polipéptidos pueden retener la capacidad de transportarse de manera eficaz a través de la BHE, o transportarse al interior de tipos de células o tejidos particulares (por ejemplo, de hígado, pulmones, riñones, bazo y

45 músculo). Para estos polipéptidos, los agentes que no pueden o son ineficaces para cruzar de manera eficaz la BHE, pueden transportarse a través de la BHE cuando se conjugan con el polipéptido. Los conjugados pueden estar en forma de una composición, tal como una composición farmacéutica, para el tratamiento o diagnóstico de un estado o enfermedad.

50 Los conjugados de la invención (por ejemplo, cualquiera de los descritos en el presente documento) también pueden tener propiedades farmacocinéticas *in vivo* ventajosas en comparación con el agente solo. Estas propiedades pueden incluir semivida aumentada *in vivo* o concentración aumentada en, tasa aumentada de acumulación en, o retirada disminuida de un tipo de célula deseado. Basándose en esto, puede ser posible administrar conjugados de la invención a un sujeto o bien a una dosificación menor, o bien menos frecuentemente, o bien durante una duración

55 más corta que el agente no conjugado. Cantidades, frecuencia o duración de administración inferiores pueden ser especialmente deseables para agentes terapéuticos con efectos secundarios conocidos. En otros casos, la conjugación del agente a un polipéptido descrito en el presente documento puede dar como resultado eficacia superior, debido a concentración aumentada en los tejidos o células diana. De hecho, al concentrar el agente en un tipo de célula diana, los efectos secundarios no deseados pueden reducirse (por ejemplo, con eficacia aumentada).

60 Esto puede disminuir la duración requerida de terapia. En algunos casos, incluso puede ser posible administrar el conjugado a una dosificación, frecuencia o duración aumentada, en relación con la dosificación del agente no conjugado y observar eficacia aumentada, efectos secundarios reducidos, o ambos.

### Polipéptidos de la invención

65 La invención presenta cualquiera de los polipéptidos descritos en el presente documento, por ejemplo, cualquiera de

los polipéptidos descritos en la tabla 1 (por ejemplo, un polipéptido definido en cualquiera de SEQ ID NOS:1-105 y 107-112 tales como SEQ ID NOS:1-97, 99, 100, 101 ó 107-112), o cualquier fragmento, análogo, derivado o variante del mismo. En determinadas realizaciones, el polipéptido puede tener al menos el 35%, el 40%, el 50%, el 60%, el 70%, el 80%, el 90%, el 95%, el 99% o incluso el 100% de identidad con un polipéptido descrito en el presente documento. El polipéptido puede tener una o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 ó 15) sustituciones relativas a una de las secuencias descritas en el presente documento. Otras modificaciones se describen en mayor detalle a continuación.

La invención también presenta fragmentos de estos polipéptidos (por ejemplo, un fragmento funcional). En determinadas realizaciones, los fragmentos pueden entrar o acumularse en un tipo de célula particular (por ejemplo, hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo) o pueden cruzar la BHE. Los truncamientos del polipéptido pueden tener 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12 o más aminoácidos desde o bien el extremo N-terminal del polipéptido, el extremo C-terminal del polipéptido o bien una combinación de los mismos. Otros fragmentos incluyen secuencias en las que se delecionan partes internas del polipéptido.

Pueden identificarse polipéptidos adicionales usando uno de los ensayos o métodos descritos en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0189515, o mediante cualquier método conocido en la técnica. Por ejemplo, un vector candidato puede producirse mediante síntesis de polipéptidos convencional, conjugarse con Taxol y administrarse a un animal de laboratorio. Un vector biológicamente activo puede identificarse, por ejemplo, basándose en su eficacia para aumentar la supervivencia de un animal al que se le han inyectado células tumorales y tratado con el conjugado en comparación con un control que no se ha tratado con un conjugado (por ejemplo, tratado con el agente no conjugado).

En otro ejemplo, puede identificarse un polipéptido biológicamente activo basándose en su ubicación en el parénquima en un ensayo de perfusión cerebral *in situ*. Puede usarse ensayos de BHE *in vitro*, tales como el modelo desarrollado mediante CELLIAL™ Technologies, para identificar tales vectores.

También pueden realizarse ensayos para determinar la acumulación en otros tejidos. Véase, por ejemplo, el ejemplo 1 en el presente documento. Pueden administrarse conjugados marcados de un polipéptido a un animal, y puede medirse la acumulación en diferentes órganos. Por ejemplo, un polipéptido conjugado con una etiqueta detectable (por ejemplo, una etiqueta de espectroscopia de fluorescencia de IR cercano tal como Cy5.5) permite la visualización *in vivo* en directo. Un polipéptido de ese tipo puede administrarse a un animal, y la presencia del polipéptido en un órgano puede detectarse, permitiendo así la determinación de la tasa y la cantidad de acumulación del polipéptido en el órgano deseado. En otras realizaciones, el polipéptido puede marcarse con un isótopo radioactivo (por ejemplo, <sup>125</sup>I). Entonces se administra el polipéptido a un animal. Tras un periodo de tiempo, se sacrifica el animal, y se extraen los órganos del animal. Entonces puede medirse la cantidad de radioisótopo en cada órgano usando cualquier medio conocido en la técnica. Al comparar la cantidad de un polipéptido candidato marcado en un órgano particular sin la cantidad de control marcado, puede determinarse la capacidad del polipéptido candidato, la tasa o cantidad de acumulación de un polipéptido candidato en un tejido particular. Los controles negativos apropiados incluyen cualquier polipéptido que se sabe que no se transporta al interior de un tipo de célula particular.

Tabla 1

**SEQ ID NO:**

1	T	F	V	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	S	A	E	D
2	T	F	Q	Y	G	G	C	M	G	N	G	N	N	F	V	T	E	K	E
3	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	N	R	N	N	F	D	T	E	E	Y
4	S	F	Y	Y	G	G	C	L	G	N	K	N	N	Y	L	R	E	E	E
5	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
6	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
7	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	Y	K	R	A	K	Y
8	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
9	T	F	Q	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
10	T	F	Q	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
11	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
12	T	F	F	Y	G	G	S	L	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
13	P	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	R	A	K	Y
14	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	Y	K	R	A	K	Y
15	P	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
16	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	E	K	Y
17	P	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	K	N	N	F	K	R	A	K	E
18	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	K	R	A	K	D
19	T	F	F	Y	G	G	C	R	A	K	R	N	N	F	D	R	A	K	Y
20	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	K	R	A	E	Y
21	P	F	F	Y	G	G	C	G	A	N	R	N	N	F	K	R	A	K	Y
22	T	F	F	Y	G	G	C	G	G	K	K	N	N	F	K	T	A	K	Y
23	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
24	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
25	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
26	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	G	N	N	F	K	R	A	K	Y
27	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	L	R	A	K	Y
28	T	F	F	Y	G	G	C	L	G	N	R	N	N	F	K	T	A	K	Y
29	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	N	G	N	N	F	K	S	A	K	Y
30	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	K	N	N	F	D	R	E	K	Y
31	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	R	N	N	F	L	R	E	K	E
32	T	F	F	Y	G	G	C	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y
33	T	F	F	Y	G	G	S	R	G	K	G	N	N	F	D	R	A	K	Y

34 T F F Y G G C R G N G N N F V T A K Y  
 35 P F F Y G G C G G K G N N Y V T A K Y  
 36 T F F Y G G C L G K G N N F L T A K Y  
 37 S F F Y G G C L G N K N N F L T A K Y  
 38 T F F Y G G C G G N K N N F V R E K Y  
 39 T F F Y G G C M G N K N N F V R E K Y  
 40 T F F Y G G S M G N K N N F V R E K Y  
 41 P F F Y G G C L G N R N N Y V R E K Y  
 42 T F F Y G G C L G N R N N F V R E K Y  
 43 T F F Y G G C L G N K N N Y V R E K Y  
 44 T F F Y G G C G G N G N N F L T A K Y  
 45 T F F Y G G C R G N R N N F L T A E Y  
 46 T F F Y G G C R G N G N N F K S A E Y  
 47 P F F Y G G C L G N K N N F K T A E Y  
 48 T F F Y G G C R G N R N N F K T E E Y  
 49 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E D  
 50 P F F Y G G C G G N G N N F V R E K Y  
 51 S F F Y G G C M G N G N N F V R E K Y  
 52 P F F Y G G C G G N G N N F L R E K Y  
 53 T F F Y G G C L G N G N N F V R E K Y  
 54 S F F Y G G C L G N G N N Y L R E K Y  
 55 T F F Y G G S L G N G N N F V R E K Y  
 56 T F F Y G G C R G N G N N F V T A E Y  
 57 T F F Y G G C L G K G N N F V S A E Y  
 58 T F F Y G G C L G N R N N F D R A E Y  
 59 T F F Y G G C L G N R N N F L R E E Y  
 60 T F F Y G G C L G N K N N Y L R E E Y  
 61 P F F Y G G C G G N R N N Y L R E E Y  
 62 P F F Y G G S G G N R N N Y L R E E Y  
 63 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
 64 A R I I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G  
 65 Y G G C R A K R N N Y K S A E D C M R T C G  
 66 P D F C L E P P Y T G P C V A R I I R Y F Y  
 67 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 68 K F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y

69 T F Y Y G G C R G K R N N Y K T E E Y  
 70 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 71 C T F F Y G C C R G K R N N F K T E E Y  
 72 T F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y C  
 73 C T F F Y G S C R G K R N N F K T E E Y  
 74 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y C  
 75 P F F Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 76 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y  
 77 T F F Y G G K R G K R N N F K T E E Y  
 78 T F F Y G G C R G K R N N F K T K R Y  
 79 T F F Y G G K R G K R N N F K T A E Y  
 80 T F F Y G G K R G K R N N F K T A G Y  
 81 T F F Y G G K R G K R N N F K R E K Y  
 82 T F F Y G G K R G K R N N F K R A K Y  
 83 T F F Y G G C L G N R N N F K T E E Y  
 84 T F F Y G C G R G K R N N F K T E E Y  
 85 T F F Y G G R C G K R N N F K T E E Y  
 86 T F F Y G G C L G N G N N F D T E E E  
 87 T F Q Y G G C R G K R N N F K T E E Y  
 88 Y N K E F G T F N T K G C E R G Y R F  
 89 R F K Y G G C L G N M N N F E T L E E  
 90 R F K Y G G C L G N K N N F L R L K Y  
 91 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y  
 92 K T K R K R K K Q R V K I A Y E E I F K N Y  
 93 K T K R K R K K Q R V K I A Y  
 94 R G G R L S Y S R R F S T S T G R  
 95 R R L S Y S R R R F  
 96 R Q I K I W F Q N R R M K W K K  
 97 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 98 M R P D F C L E P P Y T G P C V A R I  
 I R Y F Y N A K A G L C Q T F V Y G G  
 C R A K R N N F K S A E D C M R T C G G A  
  
 99 T F F Y G G C R G K R N N F K T K E Y  
 100 R F K Y G G C L G N K N N Y L R L K Y

101 T F F Y G G C R A K R N N F K R A K Y  
 102 N A K A G L C Q T F V Y G G C L A K R N N F  
 E S A E D C M R T C G G A  
 103 Y G G C R A K R N N F K S A E D C M R T C G  
 G A  
 104 G L C Q T F V Y G G C R A K R N N F K S A E  
 105 L C Q T F V Y G G C E A K R N N F K S A  
 107 T F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 108 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 109 R F F Y G G S R G K R N N F K T E E Y  
 110 R F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y  
 111 T F F Y G G S R G K R N N F R T E E Y  
 112 T F F Y G G S R G R R N N F R T E E Y

El péptido n.º 5 incluye la secuencia de SEQ ID NO:5 y está amidado en su extremo C-terminal (véase por ejemplo la figura 1)

5 El péptido n.º 67 incluye la secuencia de SEQ ID NO:67 y está amidado en su extremo C-terminal (véase por ejemplo la figura 1)

10 El péptido n.º 76 incluye la secuencia de SEQ ID NO:76 y está amidado en su extremo C-terminal (véase por ejemplo la figura 1)

El péptido n.º 91 incluye la secuencia de SEQ ID NO:91 y está amidado en su extremo C-terminal (véase por ejemplo la figura 1)

15 El péptido n.º 107 incluye la secuencia de SEQ ID NO:97 y está acetilado en su extremo N-terminal

El péptido n.º 109 incluye la secuencia de SEQ ID NO:109 y está acetilado en su extremo N-terminal

20 El péptido n.º 110 incluye la secuencia de SEQ ID NO:110 y está acetilado en su extremo N-terminal.

25 Los grupos amina de Angiopep-1 (SEQ ID NO:67) y Angiopep-2 (SEQ ID NO:97) se han usado como sitios para conjugación de agentes. Para estudiar el papel de grupos amina en la conjugación y su impacto en la capacidad de transporte global de estos vectores, se diseñaron nuevos vectores, basándose en la secuencia de Angiopep-1 y Angiopep-2, con grupos amina reactiva variables y carga global variable. Estos polipéptidos se muestran en la tabla 2.

Tabla 2: Vectores con dianas de grupo amina variable

Nombre del polipéptido	Secuencias de polipéptido	Aminas reactivas (posiciones)	Carga	SEQ ID N.º
Angiopep-3*	Ac <sup>1</sup> -TFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+1	107
Angiopep-4b	RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	3 (1,10,15)	+3	108
Angiopep-4a	Ac <sup>1</sup> -RFFYGGSRGKRNNFKTEEY	2 (10,15)	+2	109
Angiopep-5	Ac <sup>1</sup> -RFFYGGSRGKRNNFRTEEY	1 (10)	+2	110
Angiopep-6	TFFYGGSRGKRNNFRTEEY	2 (1,10)	+2	111
Angiopep-7	TFFYGGSRGRRNNFRTEEY	1 (1)	+2	112

\*Angiopep-3 es una forma acetilada de Angiopep-2.

<sup>1</sup>Ac representa acetilación.

Polipéptidos modificados

5 La invención también incluye un polipéptido que tiene una modificación de un polipéptido que tiene una secuencia descrita en SEQ ID NO: 112 tal como Angiopep-7. Se da a conocer además un polipéptido que tiene una modificación de una secuencia de aminoácidos descrita en el presente documento (por ejemplo, polipéptido que tiene una secuencia descrita en una cualquiera de SEQ ID NOS:1-105 y 107-111 tal como Angiopep-3, -4a, -4b, -5 o -6). En determinadas realizaciones, la modificación no destruye de manera significativa una actividad biológica deseada. En algunas realizaciones, la modificación puede provocar una reducción en la actividad biológica (por ejemplo, en al menos el 5%, el 10%, el 20%, el 25%, el 35%, el 50%, el 60%, el 70%, el 75%, el 80%, el 90% o el 95%). En otras realizaciones, la modificación no tiene efecto sobre la actividad biológica o puede aumentar (por ejemplo, en al menos el 5%, el 10%, el 25%, el 50%, el 100%, el 200%, el 500% o el 1.000%) la actividad biológica del polipéptido original. El polipéptido modificado puede tener o puede optimizar una o más de las características de un polipéptido de la invención que, en algún caso podría ser necesaria o deseable. Tales características incluyen estabilidad *in vivo*, biodisponibilidad, toxicidad, actividad inmunológica o identidad inmunológica.

20 Los polipéptidos de la invención pueden incluir aminoácidos o secuencias modificadas o bien mediante procedimientos naturales, tales como procesamiento postraduccional, o bien mediante técnicas de modificación química conocidas en la técnica. Las modificaciones pueden producirse en cualquier sitio en un polipéptido incluyendo la estructura principal del polipéptido, las cadenas laterales del aminoácido y el extremo amino- o carboxilo-terminal. El mismo tipo de modificación puede estar presente en el mismo grado o grados variables en varios sitios en un polipéptido dado, y un polipéptido puede contener más de un tipo de modificación. Los polipéptidos pueden estar ramificados como resultado de ubiquitinación, y pueden ser cíclicos, con o sin ramificación. Los polipéptidos cíclicos, ramificados y cíclicos ramificados pueden resultar de procesos naturales postraduccionales o pueden prepararse sintéticamente. Otras modificaciones incluyen pegilación, acetilación, acilación, adición del grupo acetomidometilo (Acm), ADP-ribosilación, alquilación, amidación, biotilación, carbamoilación, carboxetilación, esterificación, unión covalente a flavina, unión covalente a un resto hemo, unión covalente de un nucleótido o derivado de nucleótido, unión covalente de fármaco, unión covalente de un marcador (por ejemplo, fluorescente o radioactivo), unión covalente de un lípido o derivado de lípido, unión covalente de fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlace disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formilación, gamma-carboxilación, glicosilación, formación de anclaje GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición de aminoácidos mediada por ARN de transferencia a proteínas tal como arginilación y ubiquitinación.

35 Un polipéptido modificado puede incluir además una inserción, delección o sustitución de aminoácidos o bien conservativa o bien no conservativa (por ejemplo, D-aminoácidos, desaminoácidos) en la secuencia de polipéptido (por ejemplo, en la que tales cambios no alteran sustancialmente la actividad biológica del polipéptido).

40 Las sustituciones pueden ser conservativas (es decir, en las que un residuo se reemplaza por otro del mismo grupo o tipo general) o no conservativas (es decir, en las que un residuo se reemplaza por un aminoácido de otro tipo). Además, un aminoácido que no se produce de manera natural puede sustituirse por un aminoácido que se produce de manera natural (es decir, sustitución de aminoácido conservativa que no se produce de manera natural o una sustitución de aminoácido no conservativa que no se produce de manera natural).

45 Los polipéptidos preparados sintéticamente pueden incluir sustituciones de aminoácidos no codificados de manera natural por ADN (por ejemplo, aminoácido no natural o que no se produce de manera natural). Los ejemplos de aminoácidos que no se producen de manera natural incluyen D-aminoácidos, un aminoácido que tiene un grupo acetilaminometilo unido a un átomo de azufre de una cisteína, un aminoácido pegilado, los aminoácidos omega de fórmula  $\text{NH}_2(\text{CH}_2)_n\text{COOH}$  en la que n es 2-6, aminoácidos no polares neutros, tales como sarcosina, t-butil-alanina, t-butil-glicina, N-metil-isoleucina y norleucina. Puede sustituirse Trp, Tyr o Phe por fenilglicina; citrulina y sulfóxido de metionina son no polares neutros, ácido cisteico es ácido y ornitina es básica. Prolina puede sustituirse con hidroxiprolina y conservar las propiedades que confieren conformación.

55 Pueden generarse análogos por mutagénesis de sustitución y conservar la actividad biológica del polipéptido original. Se muestran ejemplos de sustituciones identificadas como "sustituciones conservativas" en la tabla 3. Si tales sustituciones dan como resultado un cambio no deseado, entonces se introducen otros tipos de sustituciones, denominadas "sustituciones a modo de ejemplo" en la tabla 3, o tal como se describe adicionalmente en el presente documento con referencia a clases de aminoácidos, y se examinan los productos.

60 Se logran modificaciones sustanciales en función o identidad inmunológica seleccionando sustituciones que difieren de manera significativa en su efecto sobre el mantenimiento de (a) la estructura de la estructura principal del polipéptido en el área de la sustitución, por ejemplo, como una conformación en lámina o helicoidal, (b) la carga o hidrofobicidad de la molécula en el sitio diana o (c) el volumen de la cadena lateral. Los residuos que se producen de manera natural se dividen en grupos basándose en propiedades de cadena lateral comunes:

65

(1) hidrófobos: norleucina, metionina (Met), alanina (Ala), valina (Val), leucina (Leu), isoleucina (Ile), histidina (His), triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe),

(2) hidrófilos neutros: cisteína (Cys), serina (Ser), treonina (Thr)

(3) cargados de manera negativa/ácidos: ácido aspártico (Asp), ácido glutámico (Glu)

(4) básicos: asparagina (Asn), glutamina (Gln), histidina (His), lisina (Lys), arginina (Arg)

(5) residuos que influyen en la orientación de la cadena: glicina (Gly), prolina (Pro);

(6) aromáticos: triptófano (Trp), tirosina (Tyr), fenilalanina (Phe), histidina (His),

(7) polares: Ser, Thr, Asn, Gln

(8) cargados de manera positiva básicos: Arg, Lys, His, y;

(9) cargados: Asp, Glu, Arg, Lys, His

Se enumeran otras sustituciones de aminoácidos conservativas en la tabla 3.

Tabla 3: Sustitución de aminoácido

Residuo original	Sustitución a modo de ejemplo	Sustitución conservativa
Ala (A)	Val, Leu, Ile	Val
Arg (R)	Lys, Gln, Asn	Lys
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp
Gly (G)	Pro	Pro
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg	Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe, norleucina	Leu
Leu (L)	Norleucina, Ile, Val, Met, Ala, Phe	Ile
Lys (K)	Arg, Gln, Asn	Arg
Met (M)	Leu, Phe, Ile	Leu
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala	Leu
Pro (P)	Gly	Gly
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser	Phe
Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala, norleucina	Leu

Análogos adicionales

Los polipéptidos y conjugados de la invención pueden incluir análogos polipeptídicos de aprotinina conocidos en la técnica. Por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.807.980 describe inhibidores derivados del inhibidor de tripsina pancreática bovina (aprotinina) así como un método para su preparación y uso terapéutico, incluyendo el polipéptido de SEQ ID NO:102. Estos polipéptidos se han usado para el tratamiento de un estado caracterizado por una cantidad o aspecto anómalo del factor tisular y/o factor VIIIa tal como trombosis anómala. La patente estadounidense n.º 5.780.265 describe inhibidores de serina proteasa que pueden inhibir la calicreína plasmática, incluyendo SEQ ID NO:103. La patente estadounidense n.º 5.118.668 describe variantes de inhibidor de tripsina

pancreática bovina, incluyendo SEQ ID NO:105. La secuencia de aminoácidos de aprotinina (SEQ ID NO:98), la secuencia de aminoácidos de Angiopep-1 (SEQ ID NO:67) y SEQ ID NO:104, así como algunas secuencias de análogos biológicamente activos pueden encontrarse en la publicación de solicitud internacional n.º WO 2004/060403.

5 Una secuencia de nucleótidos a modo de ejemplo que codifica para un análogo de aprotinina se ilustra en SEQ ID NO:106 (atgagaccag atttctgct cgagccgccc tacactgggc cctgcaaagc tcgtatcatc cggtactctt acaatgcaa ggcaggcctg tgctagacct tcgtatcagg cggctgcaga gctaagcgta acaactcaa atccgcggaa gactgcatgc gtacttgcgg tgggtcttag; n.º de registro de Genbank X04666). Esta secuencia codifica para una lisina en la posición 16 en lugar de una valina, tal como se encuentra en SEQ ID NO:98. Puede introducirse una mutación en la secuencia de nucleótidos de SEQ ID NO:106 mediante métodos conocidos en la técnica para cambiar la producción del polipéptido de SEQ ID NO:98 que tiene una valina en la posición 16. Las mutaciones o fragmentos adicionales pueden obtenerse usando cualquier técnica conocida en la técnica.

15 Otros ejemplos de análogos de aprotinina pueden encontrarse utilizando la base de datos BLAST de proteínas (Genebank: [www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/)) usando la secuencia de aprotinina sintética (o parte de la misma) dada a conocer en la solicitud internacional n.º PCT/CA2004/000011. Los análogos de aprotinina a modo de ejemplo se encuentran con los n.ºs de registro CAA37967 (GI:58005) y 1405218C (GI:3604747).

## 20 Preparación de derivados polipeptídicos y peptidomiméticos

Además de polipéptidos que consisten sólo en aminoácidos que se producen de manera natural, la presente invención también abarca peptidomiméticos o análogos polipeptídicos. Los análogos polipeptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no polipeptídicos con propiedades análogas a las del polipéptido molde. Los compuestos no polipeptídicos se denominan "polipeptidomiméticos" o peptidomiméticos (Fauchere *et al.*, Infect. Immun. 54:283-287, 1986; Evans *et al.*, J. Med. Chem. 30:1229-1239, 1987). Los polipeptidomiméticos que se relacionan estructuralmente con polipéptidos terapéuticamente útiles pueden usarse para producir un efecto terapéutico o profiláctico equivalente o potenciado. En general, los peptidomiméticos son estructuralmente similares al polipéptido paradigma (es decir, un polipéptido que tiene una actividad biológica o farmacológica) tal como polipéptidos de unión a receptor que se producen de manera natural, pero tienen una o más uniones peptídicas reemplazadas opcionalmente por uniones tales como -CH<sub>2</sub>NH-, -CH<sub>2</sub>S-, -CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-, -CH=CH- (cis y trans), -CH<sub>2</sub>SO-, -CH(OH)CH<sub>2</sub>-, -COCH<sub>2</sub>- etc., mediante métodos bien conocidos en la técnica (Spatola, Peptide Backbone Modifications, Vega Data, 1(3):267, 1983); Spatola *et al.* (Life Sci. 38:1243-1249, 1986); Hudson *et al.* (Int. J. Pept. Res. 14:177-185, 1979); y Weinstein. B., 1983, Chemistry and Biochemistry, of Amino Acids, Peptides and Proteins, Weinstein ed, Marcel Dekker, Nueva York). Tales polipeptidomiméticos pueden tener ventajas significativas sobre polipéptidos que se producen de manera natural incluyendo producción más económica, mayor estabilidad química, propiedades farmacológicas potenciadas (por ejemplo, semivida, absorción, potencia, eficacia), antigenicidad reducida y otros.

40 Mientras que los polipéptidos de la invención pueden ser eficaces para introducirse en tipos de células particulares (por ejemplo, los descritos en el presente documento), puede reducirse su eficacia por la presencia de proteasas. Las proteasas séricas tienen requisitos de sustrato específico. El sustrato debe tener tanto L-aminoácidos como enlaces peptídicos para escisión. Además, las exopeptidasas, que representan el componente más prominente de la actividad de proteasa en suero, habitualmente actúan sobre el primer enlace peptídico del polipéptido y requieren un extremo N-terminal libre (Powell *et al.*, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). En vista de esto, a menudo es ventajoso usar versiones modificadas de polipéptidos. Los polipéptidos modificados conservan las características estructurales de los polipéptidos con L-aminoácidos originales que confieren actividad biológica con respecto a IGF-1, pero ventajosamente no son fácilmente susceptibles de escisión mediante proteasa y/o exopeptidasas.

50 La sustitución sistemática de uno o más aminoácidos de una secuencia consenso con D-aminoácidos del mismo tipo (por ejemplo, D-lisina en lugar de L-lisina) puede usarse para generar polipéptidos más estables. Por tanto, un derivado de polipéptido o peptidomimético de la presente invención puede ser polipéptido todo L, todo D o D, L mixto. La presencia de un D-aminoácido en el extremo N-terminal o C-terminal aumenta la estabilidad *in vivo* de un polipéptido debido a que las peptidasas no pueden utilizar un D-aminoácido como sustrato (Powell *et al.*, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). Los D-polipéptidos inversos son polipéptidos que contienen D-aminoácidos, dispuestos en una secuencia inversa en relación con un polipéptido que contiene L-aminoácidos. Por tanto, el residuo C-terminal de un polipéptido con L-aminoácidos se convierte en N-terminal para el polipéptido con D-aminoácidos, etc. Los D-polipéptidos inversos conservan la misma conformación terciaria y por tanto la misma actividad, que los polipéptidos con L-aminoácidos, pero son más estables a la degradación enzimática *in vitro* e *in vivo*, y por tanto tienen mayor eficacia terapéutica que el polipéptido original (Brady y Dodson, Nature 368:692-693, 1994; Jameson *et al.*, Nature 368:744-746, 1994). Además de los D-polipéptidos inversos, polipéptidos restringidos que comprenden una secuencia consenso o una variación de secuencia consenso sustancialmente idéntica, pueden generarse mediante métodos bien conocidos en la técnica (Rizo y Gierasch, Ann. Rev. Biochem. 61:387-418, 1992). Por ejemplo, pueden generarse polipéptidos restringidos añadiendo residuos cisteína que pueden formar puentes disulfuro y, de ese modo, dan como resultado un polipéptido cíclico. Los polipéptidos cíclicos no tienen extremo N ni C-terminal libre. Por consiguiente, no son susceptibles de proteólisis mediante exopeptidasas, aunque son, por

supuesto, susceptibles de endopeptidasas, que no escinden en los extremos terminales del péptido. Las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos con D-aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal y de los polipéptidos cíclicos habitualmente son idénticas a las secuencias de los polipéptidos a los que corresponden, excepto por la presencia del residuo de D-aminoácido en el extremo N-terminal o C-terminal, o su estructura circular, respectivamente.

Un derivado cíclico que contiene un enlace disulfuro intramolecular puede prepararse mediante síntesis convencional en fase sólida mientras que incorpora residuos homocisteína o cisteína S-protectados adecuados en las posiciones seleccionadas para la ciclación tales como los extremos amino y carboxilo terminales (Sah *et al.*, J Pharm. Pharmacol. 48:197, 1996). Tras completar el ensamblaje de la cadena, puede realizarse ciclación o bien (1) mediante retirada selectiva del grupo protector de S con una oxidación consiguiente sobre soporte de las dos funciones SH libres correspondientes, para formar enlaces S-S, seguido por retirada convencional del producto del soporte y procedimiento de purificación apropiado o (2) mediante retirada del polipéptido del soporte junto con desprotección de cadena lateral completa, seguido por oxidación de las funciones SH libres en disolución acuosa altamente diluida.

El derivado cíclico que contiene un enlace amida intramolecular puede prepararse mediante síntesis convencional en fase sólida mientras se incorporan derivados de aminoácidos protegidos en la cadena lateral carboxilo y amino adecuados, en la posición seleccionada para ciclación. Los derivados cíclicos que contienen enlaces -S-alquilo intramoleculares pueden prepararse mediante química en fase sólida convencional mientras que incorporan un residuo de aminoácido con una cadena lateral protegida en amino adecuada, y un residuo cisteína o homocisteína protegida en S adecuada en la posición seleccionada para ciclación.

Otro enfoque eficaz para conferir resistencia a peptidasas que actúan sobre los residuos en el extremo N-terminal o C-terminal de un polipéptido es añadir grupos químicos a los extremos terminales del polipéptido, de modo que el polipéptido modificado ya no sea sustrato para la peptidasa. Una modificación química de este tipo es la glicosilación de los polipéptidos en cualquiera o ambos extremos terminales. Se ha mostrado que determinadas modificaciones químicas, en particular la glicosilación N-terminal, aumentan la estabilidad de los polipéptidos en suero humano (Powell *et al.*, Pharm. Res. 10:1268-1273, 1993). Otras modificaciones químicas que potencian la estabilidad en suero incluyen, pero no se limitan a, la adición de un grupo alquilo N-terminal, que consiste en un alquilo inferior de desde uno hasta veinte carbonos, tal como un grupo acetilo, y/o la adición de una amida C-terminal o grupo amida sustituido. En particular, la presente invención incluye polipéptidos modificados que consisten en polipéptidos que portan un grupo acetilo N-terminal y/o un grupo amida C-terminal.

También se incluyen por la presente invención otros tipos de derivados polipeptídicos que contienen restos químicos adicionales que normalmente no forman parte del polipéptido, siempre que el derivado conserve la actividad funcional deseada del polipéptido. Los ejemplos de tales derivados incluyen (1) derivados de N-acilo del extremo amino terminal o del otro grupo amino libre, en el que el grupo acilo puede ser un grupo alcanoilo (por ejemplo, acetilo, hexanoilo, octanoilo) un grupo aroilo (por ejemplo, benzoilo) o un grupo de bloqueo tal como F-moc (fluorenilmetilo-O-CO-); (2) ésteres del extremo carboxilo terminal o de otro grupo carboxilo o hidroxilo libre; (3) amida del grupo carboxilo terminal o de otro grupo carboxilo libre producido por reacción con amoníaco o con una amina adecuada; (4) derivados fosforilados; (5) derivados conjugados con un anticuerpo u otro ligando biológico y otros tipos de derivados.

La presente invención también abarca secuencias de polipéptidos más largas que resultan de la adición de residuos de aminoácido adicionales a los polipéptidos de la invención. Se esperaría que tales secuencias de polipéptidos más largas tuvieran la misma actividad biológica (por ejemplo, introducción en tipos de células particulares) que los polipéptidos descritos anteriormente. Aunque no se excluyen polipéptidos que tienen un número sustancial de aminoácidos adicionales, se reconoce que algunos polipéptidos grandes pueden adoptar una configuración que enmascara la secuencia eficaz, evitando de ese modo la unión a una diana (por ejemplo, un miembro de la familia del receptor LRP tal como LRP o LRP2). Estos derivados podrían actuar como antagonistas competitivos. Por tanto, aunque la presente invención abarca polipéptidos o derivados de los polipéptidos descritos en el presente documento que tienen una extensión, de manera deseable la extensión no destruye la actividad de selección como diana de una célula del polipéptido o derivado.

Otros derivados incluidos en la presente invención son polipéptidos dobles que consisten en dos polipéptidos iguales o dos polipéptidos diferentes de la presente invención unidos covalentemente entre sí o bien directamente o bien a través de un espaciador, tal como mediante una corta extensión de residuos de alanina o mediante un supuesto sitio para proteólisis (por ejemplo, mediante catepsina, véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.126.249 y la patente europea n.º 495 049). Los multímeros de los polipéptidos de la presente invención consisten en un polímero de moléculas formadas a partir polipéptidos iguales o diferentes o derivados de los mismos.

La presente invención también abarca derivados polipeptídicos que son proteínas quiméricas o de fusión que contienen un polipéptido descrito en el presente documento, o fragmento del mismo, unido en un extremo amino o carboxilo-terminal, o ambos, a una secuencia de aminoácidos de una proteína diferente. Una proteína quimérica o de fusión de ese tipo puede producirse mediante expresión recombinante de un ácido nucleico que codifica para la

proteína. Por ejemplo, una proteína quimérica o de fusión puede contener al menos 6 aminoácidos de un polipéptido de la presente invención y de manera deseable tiene una actividad funcional equivalente o superior a un polipéptido de la invención.

- 5 Los derivados polipeptídicos de la presente invención pueden prepararse alterando las secuencias de aminoácidos mediante sustitución, adición o delección o un residuo de aminoácido para proporcionar una molécula funcionalmente equivalente, o molécula funcionalmente potenciada o disminuida, según se desee. Los derivados de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, los que contienen, como secuencia primaria de aminoácidos, toda o parte de la secuencia de aminoácidos de los polipéptidos descritos en el presente documento (por ejemplo, una cualquiera de las SEQ ID NOS:1-105 y 107-112) incluyendo secuencias alteradas que contienen sustituciones de residuos de aminoácido funcionalmente equivalentes. Por ejemplo, uno o más residuos de aminoácidos dentro de la secuencia pueden estar sustituidos por otro aminoácido de una polaridad similar que actúa como un equivalente funcional, dando como resultado una alteración silenciosa. La sustitución de un aminoácido dentro de la secuencia puede seleccionarse de otros miembros de la clase a la que pertenece el aminoácido. Por ejemplo, los aminoácidos cargados positivamente (básicos) incluyen, arginina, lisina e histidina. Los aminoácidos no polares (hidrófobos) incluyen, leucina, isoleucina, alanina, fenilalanina, valina, prolina, triptófano y metionina. Los aminoácidos polares no cargados incluyen serina, treonina, cisteína, tirosina, asparagina y glutamina. Los aminoácidos cargados negativamente (ácidos) incluyen ácido glutámico y ácido aspártico. El aminoácido glicina puede incluirse en o bien la familia de aminoácidos no polares o bien en la familia de aminoácidos polares no cargados (neutros). En general, se entienden que las sustituciones realizadas dentro de una familia de aminoácidos son sustituciones conservativas.

#### Ensayos para identificar peptidomiméticos

- 25 Tal como se describió anteriormente, los compuestos no peptídicos generados para replicar la geometría de estructura principal y presentación a farmacóforos (peptidomiméticos) de los polipéptidos identificados mediante los métodos de la presente invención a menudo tienen atributos de mayor estabilidad metabólica, mayor potencia, mayor duración de acción y mejor biodisponibilidad.

- 30 Los compuestos peptidomiméticos de la presente invención pueden obtenerse usando cualquiera de los numerosos enfoques en métodos de biblioteca combinatoria conocidos en la técnica, incluyendo: bibliotecas biológicas; bibliotecas en fase de disolución o en fase sólida paralelas espacialmente direccionables; métodos de biblioteca sintética que requieren deconvolución; el método de biblioteca "una perla uno compuesto"; y métodos de biblioteca sintética usando selección de cromatografía por afinidad. El enfoque de biblioteca biológica se limita a biblioteca de polipéptidos, mientras que los otros cuatro enfoques son aplicables bibliotecas de compuestos de polipéptidos, oligómeros no peptídicos o moléculas pequeñas (Lam, *Anticancer Drug Des.* 12:145, 1997). Ejemplos de métodos para la síntesis de bibliotecas moleculares pueden encontrarse en la técnica, por ejemplo, en: DeWitt *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6909, 1993); Erb *et al.* (*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91:11422, 1994); Zuckermann *et al.*, *J. Med. Chem.* 37:2678, 1994); Cho *et al.* (*Science* 261:1303, 1993); Carell *et al.* (*Angew. Chem, Int. Ed. Engl.* 33:2059, 1994 e *íbid* 2061); y en Gallop *et al.* (*Med. Chem.* 37:1233, 1994). Las bibliotecas de compuestos pueden presentarse en disolución (por ejemplo, Houghten, *Biotechniques* 13:412-421, 1992) o en perlas (Lam, *Nature* 354:82-84, 1991), lascas (Fodor, *Nature* 364:555-556, 1993), bacterias o esporas (patente estadounidense n.º 5.223.409), plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, *Science* 249:386-390, 1990), o luciferasa, y la etiqueta enzimática detectada mediante la determinación de conversión de un sustrato apropiado en producto.

- 45 Una vez que un polipéptido de la presente invención se identifica, puede aislarse y purificarse mediante cualquiera de varios métodos convencionales incluyendo, pero sin limitarse a, solubilidad diferencial (por ejemplo, precipitación), centrifugación, cromatografía (por ejemplo, afinidad, intercambio iónico, exclusión molecular, y similares) o mediante cualquier otra técnica convencional usada para la purificación de polipéptidos, peptidomiméticos o proteínas. Las propiedades funcionales de un polipéptido identificado de interés pueden evaluarse usando cualquier ensayo funcional conocido en la técnica. De manera deseable, se usan ensayos para evaluar la función del receptor aguas abajo en la señalización intracelular (por ejemplo, proliferación celular).

- 55 Por ejemplo, los compuestos peptidomiméticos de la presente invención pueden obtenerse usando el siguiente procedimiento de tres fases: (1) examinar los polipéptidos de la presente invención para identificar regiones de estructura secundaria necesaria para seleccionar como diana tipos de células particulares descritos en el presente documento; (2) usar sustitutos dipeptídicos conformacionalmente restringidos para refinar la geometría de la estructura principal y proporcionar plataformas orgánicas correspondientes a estos sustitutos; y (3) usar las mejores plataformas orgánicas para presentar a farmacóforos orgánicos en bibliotecas de candidatos diseñados para imitar la actividad deseada del polipéptido nativo. En más detalle las tres fases son tal como sigue. En la fase 1, se examinan los polipéptidos candidatos principales y su estructura limitada para identificar los requisitos para su actividad. Se sintetiza una serie de análogos polipeptídicos del original. En la fase 2, se investigan los mejores análogos polipeptídicos usando los sustitutos dipeptídicos conformacionalmente restringidos. Se usan aminoácidos de indolizidin-2-ona, indolizidin-9-ona y quinolizidinona (I<sup>2</sup>aa, I<sup>9</sup>aa y Qaa respectivamente) como plataformas para estudiar la geometría de la estructura principal de los mejores candidatos de polipéptido. Estas plataformas y plataformas relacionadas (revisadas en Halab *et al.*, *Biopolymers* 55:101-122, 2000; y Hanessian *et al.* *Tetrahedron*

53:12789-12854, 1997) pueden introducirse en regiones específicas del polipéptido para orientar los farmacóforos en diferentes direcciones. La evaluación biológica de estos análogos identifica polipéptidos principales mejorados que imitan los requisitos geométricos para la actividad. En la fase 3, las plataformas de los polipéptidos principales más activos se usan para presentar sustitutos orgánicos de los farmacóforos responsables de la actividad del polipéptido nativo. Los farmacóforos y las estructuras de soporte se combinan en un formato de síntesis paralelo. La derivación de los polipéptidos y las fases anteriores pueden realizarse mediante otros medios usando métodos conocidos en la técnica.

Las relaciones función-estructura determinadas a partir de polipéptidos, derivados polipeptídicos, peptidomiméticos u otras moléculas pequeñas de la presente invención pueden usarse para refinar y preparar estructuras moleculares análogas que tienen propiedades mejores o similares. Por consiguiente, los compuestos de la presente invención también incluyen moléculas que comparten la estructura, polaridad, características de carga y propiedades de cadena lateral de los polipéptidos descritas en el presente documento.

En resumen, basándose en la descripción en el presente documento, los expertos en la técnica pueden desarrollar ensayos de examen de polipéptidos y peptidomiméticos que son útiles para identificar compuestos para direccionar un agente a tipos de células particulares (por ejemplo, los descritos en el presente documento). Los ensayos de esta invención pueden desarrollarse para formatos de examen de bajo rendimiento, alto rendimiento o ultra-alto rendimiento. Los ensayos de la presente invención incluyen ensayos que son susceptibles de automatización.

#### Conjugados de la invención

Los polipéptidos descritos en el presente documento o derivados de los mismos pueden unirse a un agente. Por ejemplo, el polipéptido (por ejemplo, Angiopep-7) puede unirse a un agente terapéutico, un agente de diagnóstico o a una etiqueta. En determinadas realizaciones, el polipéptido se une a o se marca con una etiqueta detectable, tal como un agente de radioimagen, para el diagnóstico de una enfermedad o un estado. Los ejemplos de estos agentes incluyen un conjugado de agente de radioimagen-anticuerpo-vector, en el que el anticuerpo se une a un antígeno específico de enfermedad o estado (por ejemplo, para el diagnóstico o terapia). Otras moléculas de unión también se contemplan por la invención. En otros casos, el polipéptido o derivado se une a un agente terapéutico, para tratar una enfermedad o un estado, o puede unirse a o marcarse con mezclas de los mismos. La enfermedad o el estado puede tratarse administrando un conjugado de vector-agente a un individuo en condiciones que permiten el transporte del agente a través de la BHE o a un tipo de célula particular. Cada polipéptido puede incluir al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6 ó 7 agentes. En otras realizaciones, cada agente tiene al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 10, 15, 20, o más polipéptidos unidos al mismo. Los conjugados de la invención pueden promover acumulación (por ejemplo, debido a captación aumentada o eliminación reducida) del agente en un tipo de célula o tejido particular tal como hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo de un sujeto.

El agente puede ser liberable del vector tras el transporte a un tipo de célula particular o a través de la BHE. El agente puede liberarse, por ejemplo, mediante escisión enzimática u otra rotura de un enlace químico entre el vector y el agente. Entonces el agente liberado puede funcionar en su capacidad pretendida en ausencia del vector.

#### Agentes terapéuticos

Un agente terapéutico puede ser cualquier agente biológicamente activo. Por ejemplo, un agente terapéutico puede ser un fármaco, un medicamento, un agente que emite radiación, una toxina celular (por ejemplo, un agente quimioterápico), un fragmento biológicamente activo de los mismos, o una mezcla de los mismos para tratar una enfermedad (por ejemplo, para destruir células cancerosas) o puede ser un agente para tratar una enfermedad o un estado en un individuo. Un agente terapéutico puede ser un producto sintético o un producto de origen fúngico, bacteriano u otro microorganismo (por ejemplo, micoplasma o virus), animal, tal como reptil o vegetal. Un agente terapéutico y/o fragmento biológicamente activo del mismo puede ser un agente enzimáticamente activo y/o fragmento del mismo, o puede actuar inhibiendo o bloqueando una ruta celular esencial y/o importante o compitiendo con un componente celular que se produce de manera natural esencial y/o importante. Otros agentes terapéuticos incluyen anticuerpos y fragmentos de anticuerpo.

*Agentes anticancerosos.* Cualquier agente anticanceroso conocido en la técnica puede ser parte de un conjugado de la invención. Los cánceres del cerebro pueden tratarse con un conjugado que contiene un vector que se transporta de manera eficaz a través de la BHE (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 o Angiopep-6). Los cánceres de hígado, pulmón, riñón o bazo pueden tratarse con un agente anticanceroso conjugado con un vector que se transporta de manera eficaz en el tipo de células apropiado (por ejemplo, Angiopep-7). Los agentes a modo de ejemplo incluyen abarelix, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, alitretamina, amifostina, anakinra, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, azacitidina, BCG vivo, bevacuzimab, bexaroteno, bleomicina, bortezomib, busulfano, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab, clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbacina, dactinomicina, actinomicina D, dalteparina (por ejemplo, sodio), darbepoetina alfa, dasatinib, daunorubicina, daunomicina, decitabina, denileucina, denileucina difitox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de dromostanolona, eculizumab, epirubicina (por ejemplo, HCl), epoetina alfa, erlotinib, estramustina, etopósido (por ejemplo, fosfato), exemestano,

fentanilo (por ejemplo, citrato), filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina (por ejemplo, HCl), gemtuzumab ozogamicina, goserelina (por ejemplo, acetato), histrelina (por ejemplo, acetato), hidroxiurea, ibritumomab tiuxetán, idarubicina, ifosfamida, imatinib (por ejemplo, mesilato), interferón alfa-2b, irinotecán, ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida (por ejemplo, acetato), levamisol, lomustina, CCNU, mecloretamina (mostaza de nitrógeno), megestrol, melfalán (L-PAM), mercaptopurina (6-MP), mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, oxaliplatino, paclitaxel, palifermina, pamidronato, panitumumab, pegademasa, pegaspargasa, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, pemetrexed (por ejemplo, disodio), pentostatina, pipobromano, plicamicina (mitramicina), porfímero (por ejemplo, sódico), procarbacin, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozocina, sunitinib (por ejemplo, maleato), talco, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido (VM-26), testolactona, talidomida, tioguanina (6-TG), tiotepa, topotecán (por ejemplo, hcl), toremifeno, Tositumomab/I-131 (tositumomab), trastuzumab, tretinoína (ATRA), mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, zoledronato y ácido zoledrónico. Los derivados de paclitaxel a modo de ejemplo se describen en la patente estadounidense n.º 6.911.549.

#### Etiquetas detectables

Para el fin de detección o diagnóstico, puede marcarse el conjugado de la invención. Las etiquetas detectables, o marcadores, pueden ser un radiomarcaje, una etiqueta fluorescente, una etiqueta activa de resonancia magnética nuclear, una etiqueta luminiscente, una etiqueta de cromóforo, un isótopo que emite positrones para un explorador PET, etiqueta de quimioluminiscencia o una etiqueta enzimática. Los agentes de radioimagen que emiten radiación (radiomarcajes detectables) a modo de ejemplo incluyen indio-111, tecnecio-99 o yodo-131 a dosis baja. Los radionúclidos que emiten gamma y beta incluyen  $^{67}\text{Cu}$ ,  $^{67}\text{Ga}$ ,  $^{90}\text{Y}$ ,  $^{111}\text{In}$ ,  $^{99\text{m}}\text{Tc}$  y  $^{201}\text{Tl}$ . Los radionúclidos que emiten positrones incluyen  $^{18}\text{F}$ ,  $^{55}\text{Co}$ ,  $^{60}\text{Cu}$ ,  $^{62}\text{Cu}$ ,  $^{64}\text{Cu}$ ,  $^{66}\text{Ga}$ ,  $^{68}\text{Ga}$ ,  $^{82}\text{Rb}$  y  $^{86}\text{Y}$ . Las etiquetas fluorescentes incluyen Cy5.5, proteína fluorescente verde (GFP), fluoresceína y rodamina. Las etiquetas de quimioluminiscencia incluyen luciferasa y  $\beta$ -galactosidasa. Las etiquetas enzimáticas incluyen peroxidasa y fosfatasa. Una histag también puede ser una etiqueta detectable. Por ejemplo, los conjugados pueden incluir un resto de vector y un resto de anticuerpo (anticuerpo o fragmento de anticuerpo), que puede incluir además una etiqueta. En este caso, la etiqueta puede unirse a o bien el vector o bien al anticuerpo.

#### Anticuerpos

Los anticuerpos también pueden conjugarse con los polipéptidos de la invención mediante cualquier medio conocido en la técnica (por ejemplo, usando las estrategias de conjugación descritas en el presente documento). Cualquier anticuerpo de diagnóstico o terapéutico puede conjugarse con uno o más (por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más) vectores de la invención. Además, los fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, que pueden unirse a un antígeno) también pueden conjugarse con los vectores de la invención. Los fragmentos de anticuerpo incluyen las regiones Fab y Fc, cadena pesada y cadena ligera de un anticuerpo (por ejemplo, de cualquier anticuerpo descrito en el presente documento). Los anticuerpos a modo de ejemplo para su uso en el diagnóstico y terapia del cáncer incluyen ABX-EGF (Panitumumab), OvaRex (Oregovomab), Theragyn (pemtumomab-itrío-90), Therex, bivatumumab, Panorex (edrecolomab), ReoPro (abciximab), Bexxar (tositumomab), AcM, 105AD7 idiopático, Anti-EpCAM (atumaxomab), AcM contra el cáncer de pulmón (de Citoclonal), Herceptin (trastuzumab), Rituxan (rituximab), Avastin (bevacizumab), AMD Fab (ranibizumab), E-26 (2º gen. IgE) (omalizumab), Zevalin (Rituxan + itrío-90) (ibritumomab tiuxetán), cetuximab, BEC2 (mitumomab), IMC-1C11, nuC242-DM1, LymphoCide (epratuzumab), LymphoCide Y-90, CEA-Cide (labetuzumab), CEA-Cide Y-90, CEA-Scan (arcitumomab marcado con Tc-99m), LeukoScan (sulesomab marcado con Tc-99m), LymphoScan (bectumomab marcado con Tc-99m), AFP-Scan (marcado con Tc-99m), HumaRAD-HN (+ itrío-90), HumaSPECT (votumumab), MDX-101 (CTLA-4), MDX-210 (sobrexpresión de her-2), MDX-210/MAK, Vitaxin, MAb 425, IS-IL-2, Campath (alemtuzumab), estreptavidina de CD20, Avidicin, (albúmina + NRLU13), Oncolym (+ yodo-131) Cotara (+ yodo-131), C215 (+ enterotoxina estafilocócica AcM contra el cáncer de pulmón/de riñón (de Pharmacia Corp.), nacolomab tafenatox (enterotoxina estafilocócica C242), Nuvion (visilizumab), SMART M195, SMART 1D10, CEAVac, TriGem, TriAb, NovoMAb-G2 radiomarcado, Monopharm C, GlioMAb-H (+toxina gelonina), Rituxan (rituximab), e ING-1. Anticuerpos terapéuticos adicionales incluyen 5G1,1 (ecluzumab), 5G1.1-SC (pexelizumab), ABX-CBL (gavilimomab), ABX-IL8, Antegren (natalizumab), Anti-CD11a (efalizumab), Anti-CD18 (de Genetech), Anti-LFA1, Antova, BTI-322, CDP571, CDP850, Corsevin M, D2E7 (adalimumab), Humira (adalimumab), Hu23F2G (rovelizumab), IC14, IDEC-114, IDEC-131, IDEC-151, IDEC-152, infliximab (Remicade), LDP-01, LDP-02, MAK-195F (afelimomab), MDX-33, MDX-CD4, MEDI-507 (siplizumab), OKT4A, OKT3 (muromonab-CD3) y ReoPro (abciximab).

#### Ligadores de conjugación

El conjugado (por ejemplo, un conjugado proteína-proteína) puede obtenerse usando cualquier reactivo de reticulación (conjugación) o protocolo conocido en la técnica, muchos de los cuales están disponibles comercialmente. Tales protocolos y reactivos incluyen, reactivo de reticulación con grupos amino, carboxilo, sulfhidrilo, carbonilo, hidrato de carbono y/o fenol. Las cantidades, tiempos y condiciones de tales protocolos pueden variarse para optimizar la conjugación. Los reactivos de reticulación contienen al menos dos grupos reactivos y en general se dividen en agentes de reticulación homofuncionales (que contienen grupos reactivos idénticos) y agentes

de reticulación heterofuncionales (que no contienen grupos reactivos idénticos). Los agentes de reticulación de la invención pueden ser o bien homobifuncionales y/o bien heterobifuncionales. Además el agente de reticulación puede incorporar un “espaciador” entre los restos reactivos, o los dos restos reactivos en el agente de reticulación pueden unirse directamente. Los enlaces pueden incluir enlaces éster.

5 Los ligadores a modo de ejemplo incluyen BS<sup>3</sup> [Bis(sulfosuccinimidil)suberato], NHS/EDC (N-hidroxisuccinimida y N-etil-(dimetilaminopropil)carbodimida, sulfo-EMCS ([ácido N-ε-maleimidocaproico]hidrazida), SATA (N-succinimidil-S-acetiltioacetato) e hidrazida. BS<sup>3</sup> es un éster de N-hidroxisuccinimida homobifuncional que selecciona como diana aminas primarias accesibles. Un esquema de conjugación se muestra como ejemplo en la figura 2. NHS/EDC  
10 permite la conjugación de grupos amina primaria con grupos carboxilo. Sulfo-EMCS son grupos reactivos heterobifuncionales (éster de maleimida y NHS) que son reactivos para grupos sulfhidrilo y amino. El acoplamiento de amina que usa activación de sulfo-NHS/EDC puede usarse para reticular los anticuerpos terapéuticos con los polipéptidos de la invención, tal como se muestra como ejemplo en las figuras 3 y 4. Ésta es una técnica de acoplamiento rápida, sencilla y reproducible. El conjugado resultante es estable y retiene la actividad biológica del anticuerpo. Además, tiene una alta capacidad de conjugación que puede controlarse de manera fiable y una baja  
15 interacción no específica durante los procedimientos de acoplamiento. SATA es reactivo para aminas y añade grupos sulfhidrilo protegidos. El éster de NHS reacciona con aminas primarias para formar enlaces amidas estables. Los grupos sulfhidrilo pueden desprotegerse usando hidroxilamina. Este método de conjugación se muestra como ejemplo en la figura 5. Puede usarse hidrazida para unir grupos carboxilo a aminas primarias, tal como se muestra  
20 en la figura 6, y por tanto puede ser útil para unir glicoproteínas. Los ligadores a modo de ejemplo adicionales se ilustran en la figura 7.

Las moléculas pequeñas tales como agentes terapéuticos pueden conjugarse con los polipéptidos de la invención. La molécula pequeña a modo de ejemplo, paclitaxel, tiene dos posiciones estratégicas (posición C2' y C7) útiles  
25 para la conjugación. La conjugación de un vector o vector de la invención con paclitaxel puede realizarse tal como sigue (figura 8). En resumen, se hace reaccionar paclitaxel con piridina succínica anhídrica durante tres horas a temperatura ambiente para unir un grupo succinilo en la posición 2'. El 2'-succinil-paclitaxel tiene un enlace éster que puede escindirse en la posición 2', puede liberar de manera sencilla ácido succínico. Este enlace éster que puede escindirse puede usarse adicionalmente para diversas modificaciones con ligadores, si se desea. Entonces se hace  
30 reaccionar el 2'-O-succinil-paclitaxel resultante con EDC/NHS en DMSO durante nueve horas a temperatura ambiente, seguido por la adición del vector o vector en Ringer/DMSO durante un tiempo de reacción adicional de cuatro horas a temperatura ambiente. La reacción de conjugación representada en la figura 8 se monitoriza mediante HPLC. Cada producto intermedio, tal como paclitaxel, 2'-O-succinil-paclitaxel y 2'-O-NHS-succinil-paclitaxel, se purifica y se valida usando diferentes enfoques tales como HPLC, cromatografía de líquidos en capa fina, RMN (intercambio <sup>13</sup>C o <sup>1</sup>H), punto de fusión o espectrometría de masas. El conjugado final se analiza mediante  
35 espectrometría de masas y electroforesis en gel de SDS-poliacrilamida. Esto permite determinar el número de moléculas de paclitaxel conjugadas con cada vector.

#### 40 Actividades de conjugado

Conjugando el agente con un vector descrito en el presente documento, pueden lograrse propiedades deseables, tales como farmacocinética alterada, distribución tisular alterada (por ejemplo, suministro aumentado a tejidos o tipos  
de células particulares tales como de hígado, cerebro, pulmón, bazo o riñón). En resumen, se han identificado vectores que transportan de manera eficaz agentes a través de la BHE (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a,  
45 Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6). Como Angiopep-2, estos vectores también pueden seleccionar como diana agentes a otros tipos de células o tejidos (por ejemplo, hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo). También se ha identificado un vector, Angiopep-7, que no se transporta de manera eficaz a través de la BHE, pero se transporta a tejidos particulares (por ejemplo, hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo). Por consiguiente, vectores con esta actividad pueden ser útiles cuando no se desea el transporte a través de la BHE.

Debido a que los conjugados de la invención transportan agentes a tejidos específicos, los agentes conjugados pueden dar como resultado toxicidad inferior (por ejemplo, efectos secundarios menores), eficacia superior (por ejemplo, debido a que el agente se concentra en un tejido diana debido a captación aumentada o eflujo disminuido del tejido o células o debido a que el agente tiene mayor estabilidad cuando se conjuga), o una combinación de los  
55 mismos. Tales actividades se describen a continuación y en la publicación internacional n.º WO 2007/009229.

En algunos casos, la conjugación de un agente con un vector permite que el agente escape de la acción de la glicoproteína P (P-gp), una bomba de eflujo que puede expulsar determinados agentes de una célula. Disminuyendo la capacidad de P-gp para expulsar un agente de una célula, puede aumentarse la potencia de este agente en una  
60 célula. Por tanto estos conjugados pueden inhibir activamente la proliferación de células cancerosas. Además, los resultados obtenidos para el crecimiento tumoral *in vivo* indican que los vectores de la invención pueden seleccionar como diana el receptor de LRP. Además, la conjugación puede modificar la farmacocinética o biodistribución del agente no conjugado.

65 Tomados juntos, los conjugados pueden usarse frente a tumores primarios incluyendo cánceres de mama, pulmón y piel así como metástasis que se originan a partir de tumores primarios.

Evitar glicoproteína P

Debido a que la resistencia hacia diversos agentes quimioterápicos tales como vincristina, etopósido y doxorubicina está mediada a través de la sobreexpresión de P-gp (MDR1) (figura 9), evitando esta bomba de eflujo puede potenciarse la acción de estos fármacos en diversos tipos de cáncer. Conjugando un vector con un agente de este tipo, ahora es posible disminuir el eflujo mediado por P-gp del agente. Estos conjugados pueden ser útiles para aumentar la potencia de fármacos asociados con resistencia mediada por P-gp. Tal como se muestra como ejemplo a continuación, se sometieron a prueba los vectores descritos en el presente documento para determinar su capacidad de evitar la expulsión mediante P-gp.

Captación mediada por LRP

Basado en el trabajo anterior (véase la solicitud de patente internacional n.º PCT/CA2004/00011), proteína asociada con receptor (RAP) inhibió transcitosis de aprotinina en un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica. LRP se expresa en una variedad de células cancerosas (véase, por ejemplo, la publicación internacional n.º WO 2007/009229). Por tanto se ha propuesto que el receptor relacionado con lipoproteína de baja densidad (LRP) está implicado en la penetración de aprotinina en el cerebro. También se obtuvo la inhibición similar del transporte de Angiopep-1 y Angiopep-2 a través de un modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (datos no mostrados) lo que sugiere que la transcitosis de este polipéptido a través de la célula endotelial cerebral también implicó LRP. Basándose en esto, se cree que LRP puede estar implicado, en general, en la captación de los polipéptidos relacionados con aprotinina descritos en el presente documento.

LRP es un receptor de membrana heterodimérica de 600 kDa compuesto por dos subunidades; la subunidad- $\alpha$  (515 kDa) y la subunidad- $\beta$  (85 kDa). Debido a que LRP puede estar implicado en el transporte de un vector tal como se describe en el presente documento, los conjugados de la invención pueden seleccionar como diana células y tumores que expresan este receptor. Determinadas células cancerosas, por ejemplo, expresan un miembro del LRP (por ejemplo, LRP o LRP2).

Tratamientos

La invención también presenta los conjugados de polipéptido descritos en el presente documento para su uso en un método para el tratamiento. Los conjugados que se transportan de manera eficaz a través de la BHE (por ejemplo, Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5 y Angiopep-6) pueden usarse en un método para tratar cualquier enfermedad cerebral o del sistema nervioso central. Estos conjugados también se transportan de manera eficaz al hígado, pulmón, riñón, bazo o músculo y por tanto también pueden usarse, en conjunto con un agente terapéutico apropiado, para tratar una enfermedad asociada con estos tejidos (por ejemplo, un cáncer). Debido a que Angiopep-7 no se transporta de manera eficaz al cerebro, pero se transporta de manera eficaz a tejidos y células tales como hígado, pulmón, riñón, bazo y músculo, Angiopep-7 puede ser especialmente muy adecuado como tratamiento mediante vector de enfermedades asociadas con estos tejidos cuando la selección como diana del agente al cerebro no se desea.

Las enfermedades hepáticas incluyen absceso hepático amebiano, cirrosis, coccidiodomicosis diseminada; colestasis inducida por fármacos, hemocromatosis, hepatitis A, hepatitis B, hepatitis C, hepatitis D, carcinoma hepatocelular, cáncer hepático, enfermedad hepática debido a alcohol, cirrosis biliar primaria, absceso hepático piógeno, síndrome de Reye, colangitis esclerosante y enfermedad de Wilson. El absceso hepático amebiano puede tratarse mediante la administración de un vector conjugado con metronidazol. La hepatitis B puede tratarse, por ejemplo, mediante la administración de vector conjugado con interferón-alfa, lamivudina, adefovir dipivoxil, entecavir u otro agente antiviral. La hepatitis C puede tratarse, por ejemplo, mediante la administración de un vector conjugado con ribavirina o interferón pegilado, o una combinación de los mismos.

Las enfermedades pulmonares incluyen cánceres de pulmón tales como carcinoma de células pequeñas (por ejemplo, cáncer de células en avena), carcinoma de células grandes/células pequeñas mixto, carcinoma de células pequeñas combinado y tumores metastásicos. Los tumores metastásicos pueden originarse a partir de cáncer de cualquier tejido, incluyendo cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer de próstata, sarcoma, cáncer de vejiga, neuroblastoma y tumor de Wilm. Las enfermedades del bazo incluyen cánceres tales como linfoma, linfoma no Hodgkin y determinados linfomas de células T.

Los cánceres a modo de ejemplo adicionales que pueden tratarse usando un conjugado o una composición de la invención incluyen carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cánceres de cabeza y cuello incluyendo diversos linfomas tales como linfoma de células del manto, linfoma no Hodgkin, adenoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma laríngeo, cánceres de la retina, cánceres del esófago, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer uterino, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón (incluyendo carcinoma de pulmón de células no pequeñas), cáncer de páncreas, cáncer de cuello del útero, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida, sarcoma endometrial, cánceres resistentes a

múltiplos fármacos; y enfermedades y estados proliferativos, tales como neovascularización asociada con angiogénesis tumoral, degeneración macular (por ejemplo, AMD húmeda/seca), neovascularización de la córnea, retinopatía diabética, glaucoma neovascular, degeneración miópica y otras enfermedades y estados proliferativos tales como reestenosis y enfermedad poliquística renal. Los cánceres cerebrales que pueden tratarse con vector que se transporta de manera eficaz a través de la BHE incluyen astrocitoma, astrocitoma pilocítico, tumor neuroepitelial disembrionárico, oligodendrogliomas, ependimoma, glioblastoma multiforme, gliomas mixtos, oligoastrocitomas, meduloblastoma, retinoblastoma, neuroblastoma, germinoma y teratoma.

Un conjugado o composición de la invención puede administrarse mediante cualquier medio conocido en la técnica; por ejemplo, por vía oral, por vía intraarterial, por vía intranasal, por vía intraperitoneal, por vía intravenosa, por vía intramuscular, por vía subcutánea, por vía transdérmica, o por la boca al sujeto. El agente puede ser, por ejemplo, un compuesto antiangiogénico.

#### Composiciones farmacéuticas

Las composiciones farmacéuticas de la invención pueden incluir un polipéptido o conjugado descrito en el presente documento, en asociación con un portador farmacéuticamente aceptable. Tales composiciones son líquidas o liofilizadas o de otra manera formulaciones secas e incluyen diluyentes de diversos contenidos de tampón (por ejemplo, Tris-HCl, acetato, fosfato), pH y fuerza iónica, aditivos tales como albúmina o gelatina para evitar absorción a superficies, detergentes (por ejemplo, Tween 20, Tween 80, Pluronic F68, sales de ácido biliar). Agentes solubilizantes (por ejemplo, glicerol, polietilenglicol), antioxidantes (por ejemplo, ácido ascórbico, metabisulfito de sodio), conservantes (por ejemplo, timerosal, alcohol bencílico, parabenos), sustancias de carga o modificadores de tonicidad (por ejemplo, lactosa, manitol), unión covalente de polímeros tales como polietilenglicol a la proteína, complejación con iones metálicos, o incorporación del material en o sobre preparaciones particuladas de compuestos poliméricos tales como poli(ácido láctico), poli(ácido glicólico), hidrogeles, etc, o sobre liposomas, microemulsiones, micelas, vesículas unilaminares o multilaminares, fantasmas de eritrocitos, o esferoplastos. Tales composiciones influirán en el estado físico, solubilidad, estabilidad, tasa de liberación *in vivo*, y tasa de aclaramiento *in vivo*. Las composiciones de liberación controlada o sostenida incluyen formulación en depósitos lipófilos (por ejemplo, ácidos grasos, ceras, aceites). También se comprenden por la invención composiciones particuladas recubiertas con polímeros (por ejemplo, poloxámeros o poloxaminas). Otras realizaciones de las composiciones de la invención incorporan recubrimientos protectores de formas particuladas, inhibidores de proteasa o potenciadores de la permeación para diversas vías de administración, incluyendo vías parenteral, pulmonar, nasal, oral, vaginal, rectal. En una realización la composición farmacéutica se administra por vía parenteral, por vía paracanceral, por vía transmucosa, por vía transdérmica, por vía intramuscular, por vía intravenosa, por vía intradérmica, por vía subcutánea, por vía intraperitoneal, por vía intraventricular, por vía intracraneal y por vía intratumoral.

Los portadores farmacéuticamente aceptables incluyen además tampón fosfato 0,01-0,1 M o 0,05 M o solución salina al 0,8%. Adicionalmente, tales portadores farmacéuticamente aceptables pueden ser soluciones acuosas o no acuosas, suspensiones y emulsiones. Ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, disoluciones alcohólicas/acuosas, emulsiones o suspensiones, incluyendo solución salina y medios tamponados. Los vehículos parenterales incluyen disolución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, aceites fijos o de Ringer lactados. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluido y nutriente, reponedores de electrolitos tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. Los conservantes y otros aditivos también pueden estar presentes, tal como, por ejemplo, agentes antimicrobianos, antioxidantes, agentes de intercalación, gases inertes y similares.

Otras formulaciones incluyen ésteres de polioxietileno de un ácido graso (por ejemplo, ácido 12-hidroxiesteárico) tal como Solutol® HS 15. Por tanto, en algunas realizaciones, una composición farmacéutica puede comprender a) un conjugado descrito en el presente documento, b) Solutol® HS15 y c) una disolución acuosa o tampón (por ejemplo, solución de Ringer/Hepes a un pH de 5 a 7). La concentración de Solutol® HS 15 en la formulación puede ser de al menos el 5%, el 10%, el 15%, el 20%, el 25%, el 30%, el 35%, el 40%, el 45%, el 50% o el 60% (por ejemplo, el 30%) o dentro de cualquier intervalo entre dos cualesquiera de estos números. La concentración de conjugado puede determinarse basándose en la dosis requerida para tratar de manera eficaz un sujeto, o la cantidad del éster requerido para la solubilidad del conjugado que está administrándose. Se describe el uso de Solutol en una formulación para la administración de un conjugado de taxol, por ejemplo, en la publicación internacional n.º WO 2007/009229.

#### Formas farmacéuticas sólidas para su uso oral

Las formulaciones para su uso oral incluyen comprimidos que contienen el/los principio(s) activo(s) en una mezcla con excipientes farmacéuticamente aceptables no tóxicos, y el experto en la técnica conoce tales formulaciones (por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5.817.307, 5.824.300, 5.830.456, 5.846.526, 5.882.640, 5.910.304, 6.036.949, 6.036.949, 6.372.218). Estos excipientes pueden ser, por ejemplo, diluyentes inertes o cargas (por ejemplo, sacarosa, sorbitol, azúcar, manitol, celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, carbonato de calcio, cloruro de sodio, lactosa, fosfato de calcio, sulfato de calcio o fosfato de sodio); agentes de

granulación y disgregación (por ejemplo, derivados de celulosa incluyendo celulosa microcristalina, almidones incluyendo almidón de patata, croscarmelosa sódica, alginatos o ácido algínico); agentes de unión (por ejemplo, sacarosa, glucosa, sorbitol, goma arábiga, ácido algínico, alginato de sodio, gelatina, almidón, almidón pregelatinizado, celulosa microcristalina, silicato de magnesio y aluminio, carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, etilcelulosa, polivinilpirrolidona o polietilenglicol); y agentes lubricantes, deslizantes, y antiadhesivos (por ejemplo, estearato de magnesio, estearato de zinc, ácido esteárico, sílices, aceites vegetales hidrogenados o talco). Otros excipientes farmacéuticamente aceptables pueden ser colorantes, agentes aromatizantes, plastificantes, humectantes, agentes tamponantes, y similares.

Los comprimidos pueden estar no recubiertos o pueden recubrirse mediante técnicas conocidas, opcionalmente para retrasar la disgregación y absorción en el tubo digestivo y de ese modo proporcionar una acción sostenida a lo largo de un periodo más largo. El recubrimiento puede adaptarse para liberar el agente en un patrón predeterminado (por ejemplo, con el fin de lograr una formulación de liberación controlada) o puede adaptarse para no liberar el/los agente(s) hasta después del paso por el estomago (recubrimiento entérico). El recubrimiento puede ser un recubrimiento de azúcar, un recubrimiento de película (por ejemplo, basado en hidroxipropilmetilcelulosa, metilcelulosa, metilhidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, carboximetilcelulosa, copolímeros de acrilato, polietilenglicoles y/o polivinilpirrolidona), o un recubrimiento entérico (por ejemplo, basado en copolímero de ácido metacrílico, ftalato-acetato de celulosa, ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa, succinato-acetato de hidroxipropilmetilcelulosa, ftalato-acetato de polivinilo, goma laca y/o etilcelulosa). Además, puede emplearse un material de retardo temporal tal como, por ejemplo, monoestearato de glicerilo o diestearato de glicerilo.

Las composiciones de comprimido sólido pueden incluir un recubrimiento adaptado para proteger la composición de los cambios químicos no deseados, (por ejemplo, degradación química antes de la liberación de las sustancias activas). El recubrimiento puede aplicarse sobre la forma farmacéutica sólida de manera similar a la descrita en la Enciclopedia de Tecnología Farmacéutica (*Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*), citada anteriormente.

Las composiciones de la invención pueden mezclarse juntas en el comprimido, o pueden repartirse. En un ejemplo, un primer agente está contenido en el interior del comprimido, y un segundo agente está en el exterior, de modo que una parte sustancial del segundo agente se libera antes de la liberación del primer agente.

Las formulaciones para su uso oral también pueden presentarse como comprimidos masticables, o como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte (por ejemplo, almidón de patata, lactosa, celulosa microcristalina, carbonato de calcio, fosfato de calcio o caolín), o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio aceitoso, por ejemplo, aceite de cacahuete, parafina líquida o aceite de oliva. Los polvos y granulados pueden prepararse usando los componentes mencionados anteriormente en comprimidos y cápsulas de manera convencional usando, por ejemplo, una mezcladora, un aparato de lecho fluido, o equipo de secado por pulverización.

#### Dosificaciones

La dosificación de cualquier conjugado o composición descrita en el presente documento o identificada usando los métodos descritos en el presente documento depende de varios factores, incluyendo: el método de administración, la enfermedad (por ejemplo, cáncer) que va a tratarse, la gravedad de la enfermedad, si el cáncer va a tratarse o prevenirse, y la edad, el peso y la salud del sujeto que va a tratarse.

Con respecto a los métodos de tratamiento de la invención, no se pretende que la administración de un vector, conjugado o composición a un sujeto esté limitada a un modo particular de administración, dosificación o frecuencia de dosificación; la invención contempla todos los modos de administración. El conjugado o composición puede administrarse al sujeto en una dosis única o en múltiples dosis. Por ejemplo, un compuesto descrito en el presente documento o que se identifica que usa métodos de selección del conjugado de la invención puede administrarse una vez a la semana durante, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, o más semanas. Debe entenderse que, para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos deben ajustarse a lo largo del tiempo según la necesidad individual y el juicio profesional de la persona que administra o supervisa la administración del vector, conjugado o composición. Por ejemplo, la dosificación de un conjugado puede aumentarse si la dosis inferior no proporciona actividad suficiente en el tratamiento de una enfermedad o un estado descrito en el presente documento (por ejemplo, cáncer). A la inversa, la dosificación del compuesto puede disminuirse si la enfermedad (por ejemplo, cáncer) se reduce o se elimina.

Aunque el médico encargado decidirá en última instancia la cantidad y el régimen de dosificación apropiados, una cantidad terapéuticamente eficaz de un vector, conjugado o composición descrita en el presente documento, puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 0,0035 µg a 20 µg/kg de peso corporal/día o de 0,010 µg a 140 µg/kg de peso corporal/semana. De manera deseable una cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 0,025 µg a 10 µg/kg, por ejemplo, al menos 0,025, 0,035, 0,05, 0,075, 0,1, 0,25, 0,5, 1,0, 1,5, 2,0, 2,5, 3,0, 3,5, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, o 9,0 µg/kg de peso corporal administrada diariamente, cada dos días, o dos veces a la semana. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz puede estar en el intervalo de 0,05 µg a 20 µg/kg, por ejemplo, al menos 0,05, 0,7,

0,15, 0,2, 1,0, 2,0, 3,0, 4,0, 5,0, 6,0, 7,0, 8,0, 10,0, 12,0, 14,0, 16,0 ó 18,0 µg/kg de peso corporal administrada semanalmente, cada dos semanas o una vez al mes. Además, una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto puede estar, por ejemplo, en el intervalo de 100 µg/m<sup>2</sup> a 100.000 µg/m<sup>2</sup> administrada cada dos días, una vez a la semana, o a cada dos semanas. En una realización deseable, la cantidad terapéuticamente eficaz está en el intervalo de 1.000 µg/m<sup>2</sup> a 20.000 µg/m<sup>2</sup>, por ejemplo, al menos 1.000, 1.500, 4.000 ó 14.000 µg/m<sup>2</sup> del compuesto administrado diariamente, cada dos días, dos veces a la semana, semanalmente, o a cada dos semanas.

Los siguientes ejemplos pretenden ilustrar, en vez de limitar la invención.

## 10 Ejemplo 1

### Distribución y farmacocinética de conjugados

El efecto de conjugación de un agente con un vector sobre la distribución del agente puede evaluarse administrando un conjugado o polipéptido marcado a un animal y midiendo la distribución del polipéptido o conjugado a órganos. En un ejemplo, o bien <sup>3</sup>H-Taxol (5 mg/kg) o bien <sup>125</sup>I-Taxol-Angiopep-1 (TxIAAn-1) (10 mg/kg, equivalente a 5 mg de Taxol/kg) a ratones. Pueden realizarse experimentos similares con cualquiera de Angiopep-3, Angiopep-4a, Angiopep-4b, Angiopep-5, Angiopep-6 y Angiopep-7. En este caso se inyectan el agente anticanceroso no conjugado y los conjugados por vía intravenosa a ratones como bolo. Se recogen tejidos a diferentes tiempos (0,25, 0,5, 1 y 4 h) y se homogenizan. Para cuantificar la cantidad de <sup>3</sup>H-Taxol, se digieren homogeneizados de tejido con solubilizante de tejidos, y se añadieron 10 ml de centelleador líquido a muestras. La cantidad del conjugado marcado con <sup>125</sup>I en los diferentes tejidos se mide tras la precipitación de TCA. Se cuantifica la radioactividad asociada con los tejidos. Se estima el área bajo la curva (AUC 0-4) usando el software Prism y se traza para los diferentes tejidos. Usando un conjugado de Angiopep-1, los valores de AUC 0-4 obtenidos para el conjugado son superiores a los de Taxol en diversos tejidos incluyendo el cerebro, riñón, hígado y los ojos (figura 10A) indicando una acumulación superior del conjugado en estos tejidos en comparación con el agente no conjugado. La acumulación del conjugado es muy superior al agente no conjugado en el pulmón (figura 10B).

Los resultados de un experimento similar realizado con el conjugado de Taxol-Angiopep-2 se resumen en la tabla 4 a continuación. Aunque hay diferencia con respecto a los resultados obtenidos para el conjugado de TxIAAn-1, el conjugado de la tabla 4 también se acumula en los pulmones, cerebro e hígado de manera más eficaz que Taxol no conjugado.

Tabla 4

Tejido	AUC 0-4 (µg/g de tejido)		
	TxIAAn-2	Taxol	Razón (TxIAAn-2/Taxol)
Plasma	170	2,2	77,3
Cerebro	0,32	0,07	4,6
Pulmón	3,4	1,1	3,0
Riñón	11,2	8,0	1,4
Corazón	5,0	2,5	2,0
Hígado	513	22	23
Ojo	0,99	0,57	1,7
Orina	35,7	88	0,4

35 Tratamientos equivalentes a 5 mg/kg de Taxol

Se estudió la cinética de la acumulación de Taxol y Taxol-Angiopep-1 en el pulmón (figura 11). La cantidad del conjugado medido en los pulmones a diferentes tiempos es muy superior a la del agente no conjugado. La acumulación del conjugado en el pulmón también es muy superior a su concentración en el suero (plasma) a diversos tiempos (figura 12). Estos resultados indican que la biodistribución o farmacocinética de un agente anticanceroso tal como Taxol puede alterarse mediante la conjugación con un vector de la invención (por ejemplo, Angiopep-1 ó 2).

## 45 Ejemplo 2

### Angiopep-7 no se transporta de manera eficaz al cerebro

El Angiopep-7 no se transporta de manera eficaz a través de la barrera hematoencefálica. Midiendo la acumulación de Angiopep- 2 y Angiopep-7 en el cerebro de ratas 30 minutos tras la inyección IV, Angiopep-7 estaba presente en

el cerebro a niveles inferiores a o bien Angiopep-1 o bien Angiopep-2 (figura 13).

También se ha examinado la acumulación de Angiopep-2 y Angiopep-7 en el cerebro usando microscopía de fluorescencia tras una perfusión cerebral *in situ* de 10 minutos. En este caso, se inyectaron 2 mM de Angiopep-2 o Angiopep-7, cada uno conjugado con el marcador fluorescente Cy5.5, en la arteria carótida. Entonces se evaluaron los cerebros de los animales mediante microscopía de fluorescencia. En cada caso, se tiñeron los capilares con Vessel Green (FITC-lectina), se tiñeron los núcleos del cerebro con DAPI (azul), y se visualizaron los Angiopeps usando la etiqueta Cy5.5 (figura 14). A partir de estas secciones, se observa que Angiopep-2 va a ubicarse dentro del cerebro, mientras que se observa que Angiopep-7 va a ubicarse dentro de los capilares. También se observa la acumulación cerebral inferior de Angiopep-7 en comparación con Angiopep-2 *in vivo*. Se conjugaron cada uno de Angiopep-2 y Angiopep-7 con Cy5.5 y se administraron a ratas. Tras 30 minutos, se midió la acumulación en el cerebro usando la fluorescencia del indicador Cy5.5. Basándose en esto, se concluye que Angiopep-7 no se transporta de manera eficaz a través de la BHE, mientras que Angiopep-2 se transporta a través de la BHE de manera eficaz.

### Ejemplo 3

#### Angiopep-7 se transporta de manera eficaz al hígado, riñón, pulmones, bazo y músculo

Usando ratas a las que se les administró Angiopep-2 o Angiopep-7 conjugado con Cy5.5 tal como se describe en el ejemplo 2, se midieron los niveles de Angiopep-7 y Angiopep-2 en órganos tales como hígado, riñón y pulmón. En estos órganos, se observaron niveles similares de polipéptido con Angiopep-7 en comparación con Angiopep-2. En vista de estos resultados, se cree que Angiopep-7 puede ser especialmente útil para la administración de agente al hígado, riñón y pulmones en aplicaciones en las que no se desea la administración al cerebro.

Para medir las concentraciones de Angiopep-7 en animales, se han realizado estudios de obtención de imágenes de Angiopep-7 conjugado con Cy5.5. Basándose en estudios de obtención de imágenes *in vivo* 30 minutos tras la inyección, se observó la acumulación de la señal de Cy5.5 en los riñones, el hígado y los pulmones (figura 15A). Se realizó análisis de órganos *ex vivo* 24 horas tras inyección de Angiopep-7, y se comparó con inyección usando Angiopep-2. Estos estudios también revelaron acumulación significativa tanto de Angiopep-2 como de Angiopep-7 en el hígado, pulmones y riñones. Sin embargo, Angiopep-7 mostró acumulación cerebral significativamente menor en comparación con Angiopep-2 (figura 15B). Basándose en estos resultados, se cree que Angiopep-7 es útil como vector para agentes en órganos periféricos tales como el hígado, riñón, pulmones, bazo o músculo en aplicaciones en las que no se desea la administración al cerebro.

### Ejemplo 4

#### Transporte de conjugados de IgG

Se midió la captación cerebral de estos vectores usando el modelo experimental de perfusión cerebral *in situ*. Los resultados (mostrados en la tabla 5 a continuación) revelaron que las lisinas en la posición 10 y 15 son importantes en la capacidad de estos vectores para cruzar la BHE.

Tabla 5: Captación cerebral de Angiopeps medida mediante perfusión cerebral *in situ*

Vector	Parénquima (ml/100 g)	Transporte con respecto a Angiopep-1 (250 nM), expresado como porcentaje
Angiopep-1 (50 nM)	34,9	155,46
Angiopep-1 (250 nM)	22,45	100,00
Angiopep-1 (dímero) (250 nM)	27,03	120,40
Angiopep-2 (250 nM)	19,62	87,39
Angiopep-3 (250 nM)	17,08	76,08
Angiopep-4a (250 nM)	17,57	78,26
Angiopep-4b (250 nM)	12,05	53,67
Angiopep-5 (250 nM)	11,82	52,65
Angiopep-6 (250 nM)	8,64	38,49
Angiopep-7 (250 nM)	2,99	13,32

Se conjugaron los polipéptidos de Angiopep con IgG usando el agente de reticulación SATA y se estudió su capacidad de transporte usando perfusión cerebral *in situ*. Tal como se muestra en la figura 16, Angiopep-2 es el

conjugado más altamente distribuido en el parénquima cerebral. También parece que los dímeros de polipéptidos se transportan de manera eficaz. Angiopep-7 no se transportó de manera eficaz en el cerebro.

### Ejemplo 5

5

#### Efecto de conjugados sobre el crecimiento celular *in vitro*

Para someter a prueba la capacidad de conjugados que incluyen un vector y un agente anticanceroso para destruir células cancerosas, puede realizarse una prueba *in vitro*. En un ejemplo, se muestra que Taxol (no conjugado) bloquea la proliferación de células de glioblastoma (U-87) con valor de CI50 de alrededor de 10 nM (figura 17). Se evalúa el efecto de Taxol conjugado cuando se conjuga con un vector descrito en el presente documento y se compara con Taxol no conjugado. Tal como se muestra en la tabla 6A, los valores de CI50 obtenidos para el conjugado de Taxol-Angiopep-2 (TxIA2) fueron muy similares a los de Taxol no conjugado en muchas células cancerosas. Las células endoteliales del cerebro de rata (RBE4) fueron menos sensibles que las líneas de células cancerosas sometidas a prueba. Para fines de comparación, se expresaron los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de Taxol.

La mayoría de estas células (U-87, U-118, NC1-H460, A549) expresan LRP. Sin embargo estos datos no están disponibles para células RBE4. Se evalúa la actividad de antiproliferación del conjugado frente a células cancerosas *in vitro*. En este ensayo, se exponen las células cancerosas (U87 y U118) durante 48 h a un agente anticanceroso (por ejemplo, Taxol) y conjugado (por ejemplo, conjugado de TxIA2 (3:1)). La incorporación de [<sup>3</sup>H]-timidina en células U87 y U 118 disminuye como función de la concentración del agente. Se expresan los valores requeridos para inhibir la proliferación celular en el 50% (CI50). Los resultados obtenidos de los ensayos de proliferación indican que los valores de CI50 requeridos para la inhibición de la proliferación de células cancerosas se expresan en nM y demuestran que el conjugado de TxIA2 (3:1) es 3 veces más potente que paclitaxel, y están en el mismo intervalo cuando se notifican como equivalente de paclitaxel (tabla 6B). Pueden realizarse experimentos similares usando cualquiera de los vectores o conjugados descritos en el presente documento.

También se estima la capacidad de un conjugado (por ejemplo, TxIA2 (3:1)) para bloquear la proliferación de otros tipos de células cancerosas. Pueden realizarse tales ensayos en células de cáncer de pulmón (NC1-H460) así como la línea celular de cáncer de mama (MDAMB231, MDA-MB-468, HCC-1954, BT-474) en hepatocarcinomas (SK-Hep1) y glioblastomas (U-87MG). Se ha mostrado que tales células también son muy sensibles al conjugado de TxIA2 (3:1) (tabla 6B).

35 Tabla 6A: Efecto del conjugado sobre la proliferación celular.

Líneas celulares	Taxol	CI50 (nM) Taxol-Angiopep-2 (3:1)
Glioblastomas		
5 U-87	9,5	9,7
U-118	7,2	8,1
Carcinoma de pulmón		
NCI*-H460	9,3	12,5
A549	3,6	6,0
10 Calu-3	17,2	25,0
Células endoteliales		
RBE4	137	139

Tabla 6B: Citotoxicidad *in vitro* de Taxol y conjugado de TxIA2 (3:1)

Línea celular	Paclitaxel				conjugado de TxIA2 (3:1)			
	CI50 (nM)		% de supervivencia residual		CI50 (nM)		% de supervivencia residual	
	Media	DE	Media	DE	Media	DE	Media	DE
BT-474	62,86	-	52,24	3,87	40,22	-	51,83	1,70
HCC1954	6,12	-	48,82	11,17	8,26	3,37	44,08	8,63
MDA-MB-231	17,61	-	45,62	13,89	28,16	-	46,95	7,50
MDA-MB-468	13,52	-	54,26	10,34	1,41	-	55,34	5,55

NCI-H460	6,61	3,35	24,98	10,80	12,68	10,08	30,44	9,36
SK-HEP-1	8,84	-	55,18	13,17	7,83	-	54,09	11,03
U-87 MG	12,94	2,49	40,35	2,40	17,75	10,82	44,13	1,85

### Ejemplo 6

#### Inhibición del crecimiento tumoral *in vivo* (U-87)

5 Puede evaluarse la capacidad de un conjugado para inhibir el crecimiento tumoral en un modelo *in vivo* (véase, por ejemplo, la figura 18A). Se implantan por vía subcutánea células U-87 en el costado derecho de ratones y, en el día 3 tras la implantación, se inyectan a los ratones el vehículo (DMSO/Ringer: 80/20; control), un agente no conjugado (por ejemplo, Taxol (5 mg/kg)) o el agente como parte de un conjugado (por ejemplo, Taxol-Angiopep-2 (10 mg/kg) equivalente a 5 mg de Taxol/kg). La inhibición del crecimiento tumoral es más pronunciada en ratones tratados con el conjugado que en ratones tratados con el agente anticanceroso no conjugado.

10 En un ejemplo, en el día 17 tras la implantación, se inhibió el crecimiento tumoral en más del 75% usando el TxIA2, mientras que se inhibió el crecimiento tumoral en el 34% usando el agente no conjugado (tabla 7). Por tanto, los conjugados son más eficaces que los agentes no conjugados en la inhibición del crecimiento tumoral *in vivo*. En general, se midió un nivel de inhibición del crecimiento tumoral de 2,2 veces para el conjugado comparado con el agente no conjugado.

Tabla 7. Inhibición del crecimiento tumoral con conjugados.

Grupos	Volumen tumoral (mm <sup>3</sup> )		Crecimiento tumoral $\Delta$ (mm <sup>3</sup> )	Inhibición (%)	T/C (%)
	(media $\pm$ eem)				
	Días tras inyección				
	Día 0*	Día 14**			
Control	79 $\pm$ 7	289 $\pm$ 50	203 $\pm$ 47		100
Taxol (5 mg/kg)	74 $\pm$ 5	219 $\pm$ 52	134 $\pm$ 55	34	66
TxIA2 (3:1) (10 mg/kg)	88 $\pm$ 9	144 $\pm$ 27	56 $\pm$ 32	73	27

20 Tratamiento equivalente a 5 mg/kg de Taxol  
\*corresponde a 3 días tras la implantación (primer tratamiento)  
\*\*corresponde a 17 días tras la implantación (tras 4 tratamientos)

### Ejemplo 7

#### Inhibición de crecimiento tumoral *in vivo* (hepatocarcinoma)

25 Se realizan estudios *in vivo* para determinar si un conjugado puede inhibir el crecimiento de células de hepatocarcinoma (SK-Hep 1) implantadas por vía subcutánea. Los ratones desnudos reciben una inyección subcutánea de  $2,5 \times 10^6$  células SK-Hep 1 humanas en su costado derecho. Se inician tratamientos cuando el tamaño del tumor implantado alcanzó aproximadamente 200 mm<sup>3</sup>. Los animales reciben tratamiento con un conjugado o vehículo mediante inyecciones intraperitoneales.

30 En la figura 18B se muestran los resultados de un experimento realizado con un TxIA2 (3:1) administrado a 80 mg/kg mediante inyección intraperitoneal; se indican tratamientos mediante flechas negras. En este experimento, se proporcionaron tratamientos dos veces por semana para cinco tratamientos máximos a la dosis indicada de 80 mg/kg. El conjugado de TxIA2 (3:1) administrado i.p. muestra alta eficacia en la inhibición del crecimiento de hepatocarcinomas, un tipo de cáncer habitualmente no sensible a Taxol® (figura 18B).

### Ejemplo 8

#### Métodos para evaluar la actividad del conjugado

45 Se usaron los siguientes métodos en los ejemplos descritos en el presente documento.

#### Ensayo de proliferación celular

Para el ensayo de proliferación celular *in vitro*, se siembran entre  $2,5$  y  $5 \times 10^4$  células U87 o A549 en una microplaca de cultivo tisular de 24 pocillos en un volumen final de 1 ml de medio con suero al 10% y se incuban durante 24 horas a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5%. Entonces se reemplaza el medio por medio libre de suero y se incuban durante la noche. La mañana siguiente se disuelve recientemente el agente en dimetilsulfóxido (DMSO) y se reemplaza el medio por medio completo que contiene el agente a diferentes concentraciones por triplicado. La concentración final de DMSO es del 0,1%. El control usado es un pocillo de microplaca con células y sin agente. Se incuban las células durante de 48 a 72 h a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5%. Tras la incubación, se cambia el medio y se reemplaza por 1 ml de medio completo que contiene [ $^3\text{H}$ ]-timidina (1 pCi/ensayo). Se incuban la placa a  $37^\circ\text{C}$  y  $\text{CO}_2$  al 5% durante 4 h. Se retira el medio, y se lavan las células con PBS a  $37^\circ\text{C}$ . Se fijan las células con una mezcla de etanol:ácido acético (3:1), se lavan con agua, y se precipitan 3 veces con el 10% de TCA (ácido tricloroacético) helado. Finalmente se añaden 500  $\mu\text{l}$  de PCA (ácido perclórico) a los pocillos y se calientan las microplacas durante 30 min a  $65^\circ\text{C}$  y 30 min a  $75^\circ\text{C}$ . Entonces se transfiere el contenido de cada pocillo en un recipiente de centelleo con 10 ml de cóctel de centelleo y se mide la actividad en CPM (cuentas por minuto) en un contador de centelleo líquido Tri-Carb de Packard.

#### 15 Yodación de polipéptidos

Se yodan polipéptidos con procedimientos convencionales usando perlas de yodo de Sigma. En resumen se diluyen los polipéptidos en tampón fosfato 0,1 M, pH 6,5 (PB). Se usan dos perlas de yodo para cada proteína. Se lavan estas perlas dos veces con 3 ml de PB en un filtro Whatman y se resuspenden en 60  $\mu\text{l}$  de PB. Se añade  $^{125}\text{I}$  (1 mCi) de Amersham-Pharmacia biotech a la suspensión de perlas durante 5 min a temperatura ambiente. Se inició cada yodación mediante la adición del polipéptido (100  $\mu\text{g}$ ). Tras una incubación de 10 min a temperatura ambiente, se retiró el yodo libre mediante HPLC.

#### 25 Implantación subcutánea

Con el fin de estimar la eficacia de los conjugados y formulaciones sobre el crecimiento tumoral, se ha desarrollado un modelo subcutáneo de glioblastomas. En este modelo, se inyectan por vía subcutánea  $2,5 \times 10^6$  células en 100  $\mu\text{l}$  de medio celular sin suero que contiene metilcelulosa al 1% en el costado de ratones. El tumor es claramente visible y puede medirse usando un calibre Vernier. Entonces se trazó el volumen tumoral estimado como función del tiempo.

#### 30 Perfusión cerebral de ratón *in situ*

Se mide la captación de [ $^{125}\text{I}$ ]-polipéptidos en el lado luminal de capilares cerebrales de ratón usando el método de perfusión cerebral *in situ* adaptado en el laboratorio para el estudio de captación de agente en el cerebro del ratón. En resumen, se expone la carótida común derecha de ratones anestesiados con cetamina/xilazina (140/8 mg/kg i.p.) y se liga al nivel de la bifurcación de la carótida común, rostral a la arteria occipital. Entonces se cateteriza la carótida común de manera rostral con tubo de polietileno cargado con heparina (25 U/ml) y montado en una aguja de calibre 26. Se coloca la jeringa que contiene el fluido de perfusión ([ $^{125}\text{I}$ ]-polipéptidos o [ $^{14}\text{C}$ ]-inulina en tampón Krebs/bicarbonato a un pH 7,4 gasificado con el 95% de  $\text{O}_2$  y el 5% de  $\text{CO}_2$ ) en una bomba de infusión (bomba Harvard PHD 2000; aparato de Harvard) y se conecta al catéter. Antes de la perfusión, se elimina la contribución de flujo sanguíneo contralateral mediante la ruptura de ventrículos del corazón. Se perfunde el cerebro durante los tiempos indicados a una velocidad de flujo de 1,15 ml/min. Tras 14,5 min de perfusión, se perfunde adicionalmente el cerebro durante 60 s con tampón Krebs para lavar el exceso de [ $^{125}\text{I}$ ]-proteínas. Entonces se decapitan los ratones para terminar la perfusión y se aísla el hemisferio derecho en hielo antes de sujetarse a depleción capilar. Se toman alícuotas de homogeneizados, sobrenadantes, gránulos y perfundidos para medir su contenido en [ $^{125}\text{I}$ ]-conjugados mediante precipitación con TCA y evaluar el volumen aparente de distribución.

#### 50 **Ejemplo 9**

##### **Mecanismo de acción de conjugados**

También puede realizarse estudios del mecanismo de acción de agentes terapéuticos conjugados. En un ejemplo, se incuban células de cáncer de pulmón (NCI-H460) durante 24 h con o bien Taxol libre (30 nM) o bien un conjugado de Taxol (por ejemplo, TxIAn2 10 nM; equivalente a 30 nM de Taxol; figura 19). Después de marcarse las células para  $\beta$ -tubulina usando un anticuerpo secundario unido a FITC, se toman fotografías en modos visible y de fluorescencia. En este ejemplo, tanto Taxol como el conjugado de Taxol tienen efectos similares sobre  $\beta$ -tubulina que conducen a su polimerización. Tal como se muestra a modo de ejemplo en la figura 20, la adición de Taxol y el conjugado de Taxol induce al bloqueo de las células NCI-H460 en la fase G2/M. Estos resultados sugieren que el conjugado de TxIAn tiene un mecanismo de acción similar sobre células cancerosas que Taxol.

#### 65 **Ejemplo 10**

##### **Preparación de conjugados**

En las figuras 23A-23B se muestra a modo de ejemplo la conjugación de un agente con un vector descrito en el presente documento. En este ejemplo, en primer lugar se activa el Taxol en un derivado de N-succinimida (2'-NHS-Txl). Se hacen reaccionar las aminas encontradas, por ejemplo, en un vector (por ejemplo, amina aminoterminal o residuos de lisina) en el Taxol activado para formar un enlace peptídico (enlace amida). Si están disponibles múltiples aminas, esta reacción produce múltiples combinaciones de conjugados, por ejemplo, con la adición de 1, 2 ó 3 Taxoles al polipéptido, dependiendo de la razón molar usada. Se analizan los productos de conjugación mediante HPLC, y se confirma la conjugación mediante espectroscopia de masas (Maldi-Tof). Se encuentra que Taxol puede liberarse desde el vector mediante escisión del enlace éster con una esterasa.

Cualquier vector descrito en el presente documento puede conjugarse con un agente usando este método. Se llevó a cabo la producción del conjugado de TxlAn2 (3: 1) añadiendo directamente 1 equivalente molar de Angiopep-2 a una disolución de 2,5 equivalentes molares de 2'-NHS-Taxol. Se realizó la reacción en DMSO al 68% en solución de Ringer (pH 7,3) durante 1 h a 12°C. Tras retirar el baño de enfriamiento, se dejó que la reacción continuara durante aproximadamente 22 h a temperatura ambiente (figura 24). Se muestran Angiopep-2, 2'-NHSTaxol y conjugado de TxlAn2 (3:1) en el cromatograma mediante flechas. Se muestrearon alícuotas de la reacción y se analizaron mediante HPLC tras 25 min, 2 h 15 min, 5 h y 23 h tal como se indica en la figura 24. Se muestran los picos de Angiopep-2, 2'-NHS-Taxol y conjugado de TxlAn2 (3:1) mediante flechas sobre el cromatograma. Los resultados de la figura 24 ilustran la desaparición de Angiopep-2 y 2'-NHS-Taxol durante la reacción principalmente en beneficio del conjugado de TxlAn2 (3:1).

Se separó esta mezcla de productos mediante cromatografía hidrófoba en una columna RPC 300 mm con una velocidad de flujo a 4 ml/min usando AKTA-explorer (figura 25). Para el pico que corresponde al conjugado de TxlAn2 (3:1), se reunieron fracciones, analizadas mediante HPLC y EM. En la figura 25, el cromatograma superior corresponde a la reacción en ejecución a t=23 h mientras que el inferior corresponde al conjugado de TxlAn2 (3:1) que se ha confirmado mediante espectrometría de masas (PM 5107) tras la purificación con AKTA.

## Ejemplo 11

### Captación y conjugación de anticuerpo

Pueden conjugarse anticuerpos con aprotinina tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º 2006/0189515. Pueden obtenerse resultados similares con cualquier vector descrito en el presente documento.

Por tanto se ha conjugado Angiopep-2 con IgG usando SATA. Tras la conjugación, aproximadamente de 3 a 5 moléculas de Angiopep-2 se asocian con cadenas tanto ligera como pesada de IgG (figura 26). Por tanto, usando este enfoque, se espera que se conjuguen de 2 a 6 moléculas de vector (por ejemplo, Angiopep-1, Angiopep-2) para cada molécula de anticuerpo (cadenas pesada y ligera).

También se realizó la conjugación de Angiopep-2 usando sulfo-EMCS, tal como se ilustra en la figura 4. Se sometió a prueba la distribución cerebral de conjugados de IgG-Angiopep-2 acoplados a través de los grupos sulfhidrilo usando EMCS-Angiopep-2 en diversos tejidos cerebrales (cerebro total, capilares, parénquima). Hay captación cerebral superior (diferencia de aproximadamente tres veces) de conjugado de [<sup>125</sup>I]-IgG-Angiopep-2 que la de [<sup>125</sup>I]-IgG no conjugada (véase la figura 27). Por tanto la conjugación de IgG con Angiopep-2 aumenta la acumulación de IgG en el cerebro *in vivo*.

También se sometió a prueba el transporte de conjugados de Angiopep-2-IgG acoplados usando el método SATA usando experimentos de perfusión cerebral *in situ*. Se transportan conjugados de IgG-An2 en tejidos cerebrales (figura 28). Los conjugados de IgG-Angiopep-2 se acumularon en el parénquima aproximadamente 50 veces más que IgG.

Tras la conjugación de IgG con vectores, se realizaron electroforesis en gel de poli(acrilamida)-SDS, inmunodetección y autorradiografía para garantizar la conjugación apropiada; véase, por ejemplo, la figura 29, que muestra que sólo se detectaron conjugados de [<sup>125</sup>I]-IgG-Angiopep. No había pruebas de conjugado de Angiopep-2 libre, lo que muestra la eficacia del enfoque de conjugación.

## Ejemplo 12

### Acoplamiento de un anticuerpo anti-EGFR con un vector

La señalización a través del receptor del factor de crecimiento epidérmico induce señales proliferativas celulares y se asocia con la transformación de células normales a malignas. En células tumorales pueden detectarse varias mutaciones en EGFR. Una de las mutaciones más comunes de EGFR es la mutación EGFRvIII en la que se eliminan los aminoácidos 6-273.

Para mostrar que el acoplamiento de vectores de la invención a anticuerpos distintos de IgG era posible, y que el

acoplamiento mantenía la función de anticuerpo, se reticuló un anticuerpo frente a EGFR (monoclonal 528 disponible de ATCC) con el vector usando el agente de reticulación SATA como polipéptido terapéutico a modo de ejemplo. Se sometió a prueba la actividad biológica del anticuerpo frente a EGFR acoplado tiñendo células U87 positivas para EGFR. Se demostró una detección similar de EGFR en U87 usando anticuerpos frente a EGFR tanto acoplados como no acoplados mediante análisis de FACS (figura 30) mostrando que el acoplamiento de los anticuerpos de los vectores de la invención no alteraba su actividad.

En la tabla 8, se muestra que los anticuerpos no se inactivan mediante conjugación y presentan la misma afinidad para la unión en un ensayo *in vitro*.

Tabla 8: Análisis de la cinética del conjugado que se une al receptor EGFR mediante FACS

	Anticuerpo anti-EGFR	Anticuerpo anti-EGFR-Angiopep-2
Bmax (RFU)	23,6	22,0
Media saturación (nM)	1,7	1,8

Entonces se midió el transporte de conjugados de anticuerpo frente a EGFR (por ejemplo, anticuerpo anti-EGFR-Angiopep-2) a través de la BHE usando un conjugado marcado. Se midió la captación de anticuerpo anti-<sup>125</sup>I]-EGFR-Angiopep-2 al lado luminal de capilares de cerebro de ratón usando el método de perfusión cerebral *in situ* tal como se muestra en la figura 31. Hubo mayor captación cerebral para el conjugado [<sup>125</sup>I]-EGFR-Angiopep-2 que la del Ac frente a [<sup>125</sup>I]-EGFR no conjugado en todos los tejidos sometidos a prueba. Por tanto, la conjugación del Ac frente a EGFR con Angiopep-2 aumenta su acumulación en el parénquima cerebral *in vivo*. Estos conjugados representan una vía interesante ya que se mostró que varios tipos diferentes de tumores expresaban EGFR a diversos niveles (véase tabla 9).

Tabla 9

Tipo de tumor	Tumores con EGFR expresado (%)
Cabeza y cuello	90-95
Mama	82-90
Carcinoma renal	76-89
Cuello uterino/útero	90
Esófago	43-89
Pancreático	30-89
Pulmón de células no pequeñas	40-80
Próstata	40-80
Colon	25-77
Ovario	35-70
Glioma	40-63
Vejiga	31-48
Gástrico	4-33

### Ejemplo 13

#### Acoplamiento y transporte de un anticuerpo anti-VEGF con un vector

Para demostrar adicionalmente la versatilidad y aplicabilidad de acoplamiento de anticuerpos a vectores de la invención, se usó otro anticuerpo terapéutico a modo de ejemplo, Avastin. Avastin es un anticuerpo anti-VEGF de isotipo IgG1 kappa monoclonal humanizado recombinante disponible de Roche Biochemical que se une a, e inhibe, las formas biológicamente activas del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF).

Tras la conjugación, entonces se midió el transporte de conjugados de Avastin a través de la BHE usando el método de perfusión cerebral *in situ*. Existe captación cerebral superior para conjugado de [<sup>125</sup>I]-Avastin-Angiopep-2 que la de [<sup>125</sup>I]-Avastin no conjugado (figura 32).

Por tanto la conjugación de anticuerpos terapéuticos (tales como Avastin o MAb 528 disponibles de ATCC) con vectores (por ejemplo, Angiopep-1, -2, -3, -4a, -4b, 5 y 6) es una estrategia útil para su transporte en el cerebro.

**Ejemplo 14**

**Transporte de dímeros**

- 5 Los dímeros de vector también pueden transportarse. En un ejemplo, se incubó Angiopep-1 a 4°C durante al menos 12 horas, provocando de ese modo multimerización/dimerización del polipéptido. Se evaluó la capacidad de transcitosis del dímero de Angiopep-1 *in vitro*. El dímero de Angiopep-1 se transcitosa mejor que IgG. Además, tal como se muestra en la tabla 5, la forma dimérica de Angiopep-1 muestra un volumen de distribución superior al de Angiopep-1. Por tanto, los dímeros de vector pueden transportarse a través de la BHE.

10

**Ejemplo 15**

**Conjugación de un anticuerpo con más de un vector**

- 15 Normalmente, las reacciones de reticulación producen entre 1 y 6 moléculas de vector por una molécula de anticuerpo, cadenas pesada y ligera.

Se estimó el nivel de conjugación de Angiopep-2 con IgG usando un ensayo que permite la valoración de la cantidad de grupos sulfhidrilo tras la desprotección de SATA en la amina de las IgG antes y después de la reacción con el grupo maleimida en el N terminal de Angiopep-2. Al cambiar la concentración relativa de los diferentes reactivos usados en el protocolo de conjugación puede optimizarse la cantidad de Angiopep-2 conjugado con las IgG.

20

Al usar experimentos de perfusión cerebral *in vivo*, cuanto mayor es el nivel de conjugación, mayor es la captación en la parénquima de conjugados (figura 33). Por tanto, puede ser deseable tener un número mayor de vectores por molécula. Como tal, pueden usarse más de 6 vectores para transportar un compuesto (agente) a través de la BHE.

25

**REIVINDICACIONES**

1. Polipéptido que comprende una secuencia de aminoácidos que tiene la siguiente fórmula:

5 X1-X2-X3-X4-X5-X6-X7-X8-X9-X10-X11-X12-X13-X14-X15-X16-X17-X18-X19

en la que X1-X19 son cualquier aminoácido o están ausentes;

al menos uno de X10 y X15 es Arg; y

10 dicha secuencia de aminoácidos tiene al menos el 80% de identidad con Angiopep-7, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112;

15 en el que dicho polipéptido se transporta de manera eficaz a al menos una célula o tejido seleccionado del grupo que consiste en de hígado, pulmón y riñón, y en el que dicho polipéptido se transporta a través de la barrera hematoencefálica a niveles inferiores a Angiopep-6, que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 111.

2. Polipéptido según la reivindicación 1, en el que dicho polipéptido, cuando se conjuga con un agente, puede aumentar la acumulación de este agente en al menos el 50% en dicha al menos una célula o tejido en comparación con el agente no conjugado.

3. Polipéptido según la reivindicación 2, en el que dicho agente es paclitaxel.

4. Composición farmacéutica que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 y un portador farmacéuticamente aceptable.

5. Conjugado que comprende:

30 (a) un vector que comprende el polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3; y

(b) un agente terapéutico, agente de diagnóstico o etiqueta detectable, en el que dicho agente o etiqueta se conjuga con dicho vector.

6. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o conjugado según la reivindicación 5, en el que dicha identidad es de al menos el 90%.

7. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o conjugado según la reivindicación 5, en el que:

40 a.) X10 es Lys o Arg; X15 es Lys o Arg; o ambos,

b.) en el que X1 es Arg,

c.) en el que X10 es Arg,

45 d.) en el que X15 es Arg,

e.) en el que X10 y X15 son Arg,

50 f.) en el que X7 es Ser o Cys, o

g.) en el que X7 es Ser.

8. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o conjugado según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido o dicho vector comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112.

9. Polipéptido según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3 o conjugado según la reivindicación 5, en el que dicho polipéptido o dicho vector consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 112.

10. Conjugado según la reivindicación 5, en el que dicho vector se conjuga con un agente terapéutico.

60 11. Conjugado según la reivindicación 5, en el que dicho agente terapéutico es un agente anticanceroso.

12. Conjugado según la reivindicación 11, en el que dicho agente anticanceroso se selecciona del grupo que consiste en abarelix, aldesleucina, alemtuzumab, alitretinoína, alopurinol, altretamina, amifostina, anakinra, anastrozol, trióxido de arsénico, asparaginasa, azacitidina, BCG vivo, bevacuzimab, bexaroteno, bleomicina, bleomicina, bortezomib, busulfano, calusterona, capecitabina, carboplatino, carmustina, celecoxib, cetuximab,

- clorambucilo, cisplatino, cladribina, clofarabina, ciclofosfamida, citarabina, dacarbacina, dactinomicina, actinomicina D, dalteparina, darbepoetina alfa, dasatinib, daunorubicina, daunomicina, decitabina, denileucina, denileucina diftotox, dexrazoxano, docetaxel, doxorubicina, propionato de dromostanolona, eculizumab, epirubicina, epoetina alfa, erlotinib, estramustina, etopósido, exemestano, fentanilo, filgrastim, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, 5-FU, fulvestrant, gefitinib, gemcitabina, gemtuzumab ozogamicina, goserelina, histrelina, hidroxiurea, ibritumomab tiuxetán, idarubicina, ifosfamida, imatinib, interferón alfa-2b, irinotecán, ditosilato de lapatinib, lenalidomida, letrozol, leucovorina, leuprolida, levamisol, lomustina, CCNU, mecloretamina, megestrol, melfalán, mercaptopurina, mesna, metotrexato, metoxsaleno, mitomicina C, mitotano, mitoxantrona, fenpropionato de nandrolona, nelarabina, nofetumomab, oprelvecina, oxaliplatino, paclitaxel, palifermina, pamidronato, panitumumab, pegademas, pegaspargasa, pegfilgrastim, peginterferón alfa-2b, pemetrexed, pentostatina, pipobromano, plicamicina, porfímero, procarbacin, quinacrina, rasburicasa, rituximab, sargramostim, sorafenib, estreptozocina, sunitinib, maleato de sunitinib, talco, tamoxifeno, temozolomida, tenipósido, testolactona, talidomida, tioguanina, tiotepa, topotecán, toremifeno, Tositumomab/I-131, trastuzumab, tretinoína, mostaza de uracilo, valrubicina, vinblastina, vincristina, vinorelbina, vorinostat, zoledronato y ácido zoledrónico.
13. Conjugado según la reivindicación 12, en el que dicho agente es paclitaxel.
14. Conjugado según la reivindicación 11, en el que dicho agente es un anticuerpo.
15. Conjugado según la reivindicación 14, en el que dicho anticuerpo se selecciona del grupo que consiste en ABX-EGF, OvaRex, Theragyn, Therex, Bivatuzumab, Panorex, ReoPro, Bexxar, AcM, 105AD7 idiopático, Anti-EpCAM, AcM contra el cáncer de pulmón, Herceptin, Rituxan, Avastin, AMD Fab, E-26, Zevalin, Cetuximab, BEC2, IMC-1C11, nuC242-DM1, LymphoCide, LymphoCide Y-90, CEA-Cide, CEA-Cide Y-90, HumaRAD-HN, MDX-101, MDX-210, MDX-210/MAK, Vitaxin, MAb 425, IS-IL-2, Campath, CD20 estreptavidina, Avidicin, Oncolym, Cotara, C215, nacolomab tafenatox, Nuvion, SMART M195, SMART 1D10, CEA Vac, TriGem, TriAb, NovoMAb-G2 radiomarcado, Monopharm C, GliOMA-H, Rituxan e ING-1.
16. Conjugado según la reivindicación 5, en el que dicho conjugado se acumula más rápidamente, se acumula a una concentración superior o presenta eflujo mediado por P-gp reducido en una célula hepática, pulmonar, renal o de bazo, en comparación con dicho agente o etiqueta cuando no se conjuga con dicho vector.
17. Composición que comprende el conjugado según la reivindicación 5 y un portador farmacéuticamente aceptable.
18. Conjugado según cualquiera de las reivindicaciones 11 a 15 para su uso en un método de tratamiento de un sujeto que tiene un cáncer, comprendiendo dicho método proporcionar a dicho sujeto dicho conjugado en una cantidad suficiente para tratar dicho sujeto.
19. Conjugado para su uso según la reivindicación 18, en el que dicho cáncer es un cáncer de pulmón, hígado, riñón o bazo.
20. Conjugado para su uso según la reivindicación 19, en el que dicho cáncer se selecciona del grupo que consiste en carcinoma hepatocelular, cáncer de mama, cánceres de la cabeza y cuello, linfoma, linfoma de células de manto, linfoma no Hodgkin, adenoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma laríngeo, cánceres de la retina, cánceres del esófago, mieloma múltiple, cáncer de ovario, cáncer uterino, melanoma, cáncer colorrectal, cáncer de vejiga, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, carcinoma de pulmón de células no pequeñas, cáncer pancreático, cáncer cervical, cáncer de cabeza y cuello, cánceres de piel, carcinoma nasofaríngeo, liposarcoma, carcinoma epitelial, carcinoma de células renales, adenocarcinoma de vesícula biliar, adenocarcinoma de parótida, sarcoma endometrial y cánceres resistentes a múltiples fármacos.
21. Conjugado para su uso según la reivindicación 18, en el que dicho agente anticanceroso tiene eficacia aumentada o efectos secundarios reducidos cuando se conjuga con dicho polipéptido, en comparación con dicho agente cuando no se conjuga con dicho polipéptido.
22. Conjugado para su uso según la reivindicación 18, en el que dicho sujeto es un ser humano.

Péptido	Secuencia de aminoácidos	Carga
Angiopep	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY	+2
n.º 67	TFFYGGCRGKRNNFKTEEY-amida	+2
n.º 76	TFFYGGCRGKRNNFKTKEY-amida	+3
n.º 91	RFKYGGCLGNKNNYLRLKY-amida	+5
n.º 5	TFFYGGCRAKRNNFKRAKY-amida	+6

Carga +: lisina (K), arginina (R)

Carga -: ácido glutámico (E), ácido aspártico (D)

Fig. 1

## Agente de reticulación: BS<sup>3</sup>

Razón 40:1

Vector  
(Aprotinina o Angiopep) + <sup>125</sup>I- proteínas  
(IgG, Fab, Fab<sup>'</sup><sub>2</sub>)

↓ Adición de BS<sup>3</sup>  
(en exceso)  
2 h a 4°C

↓  
Diálisis frente a tampón de Ringer  
Punto de corte 100 000 Da

Fig. 2

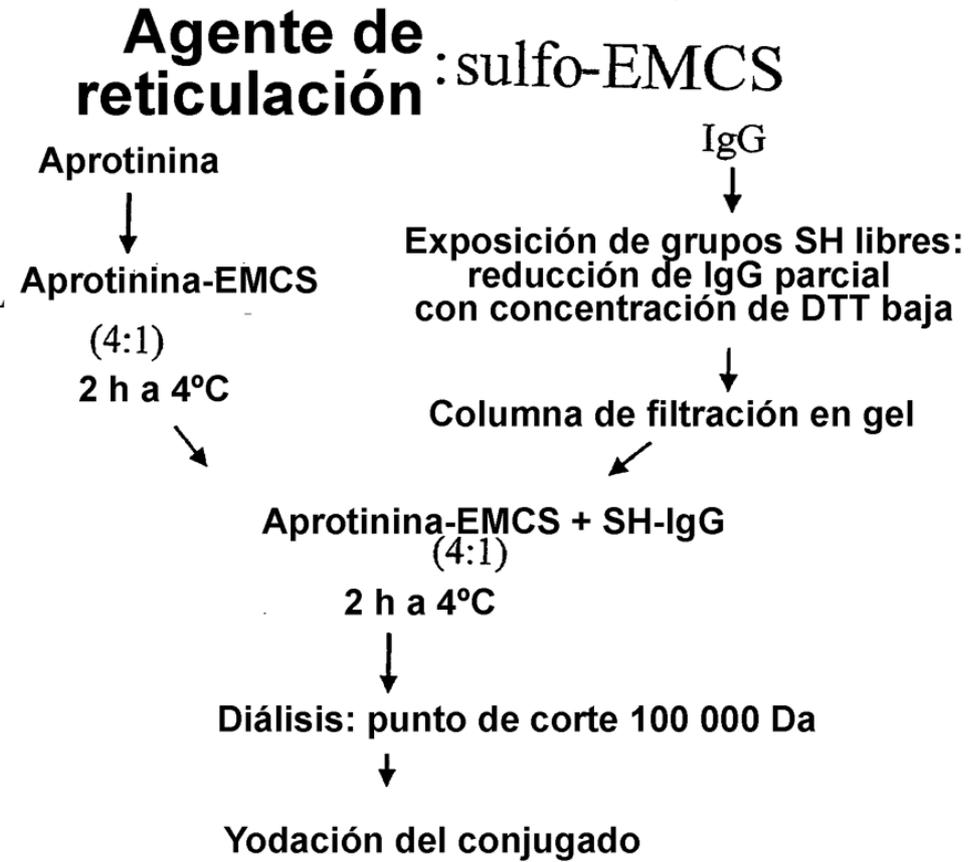


Fig. 3

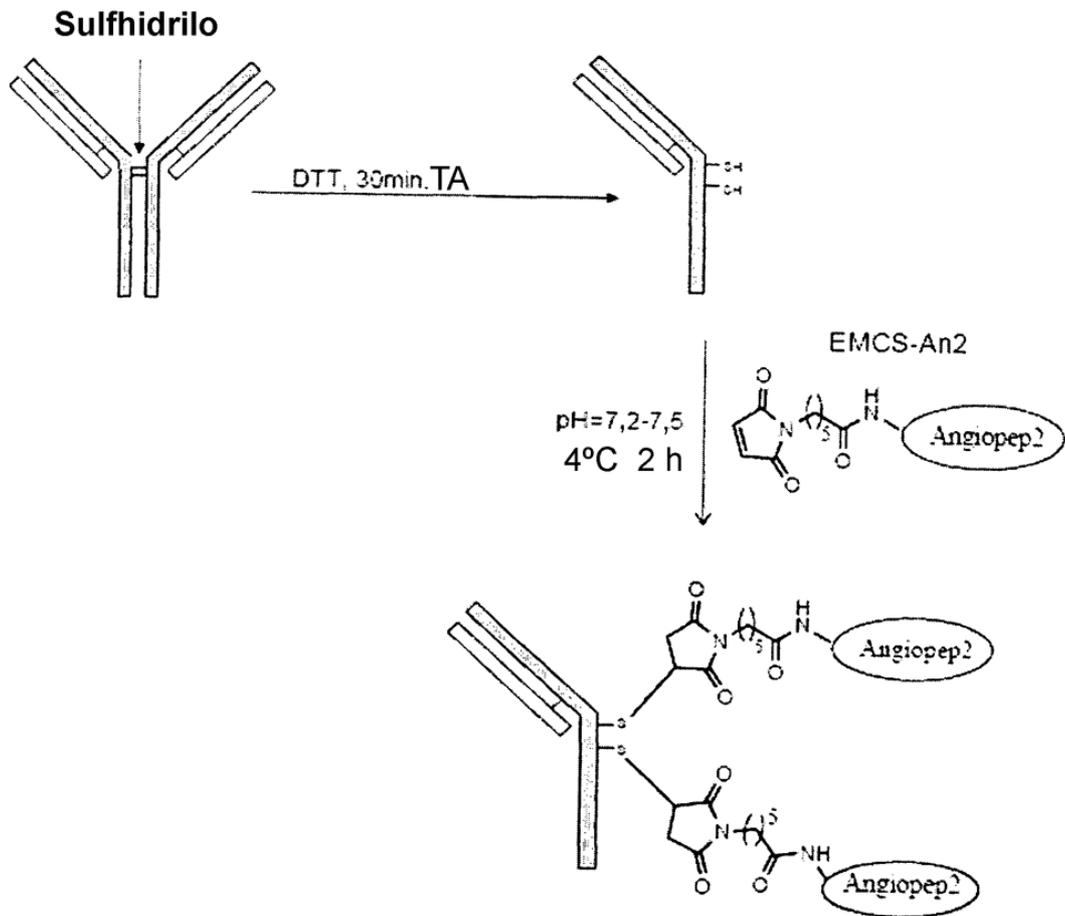


Fig. 4

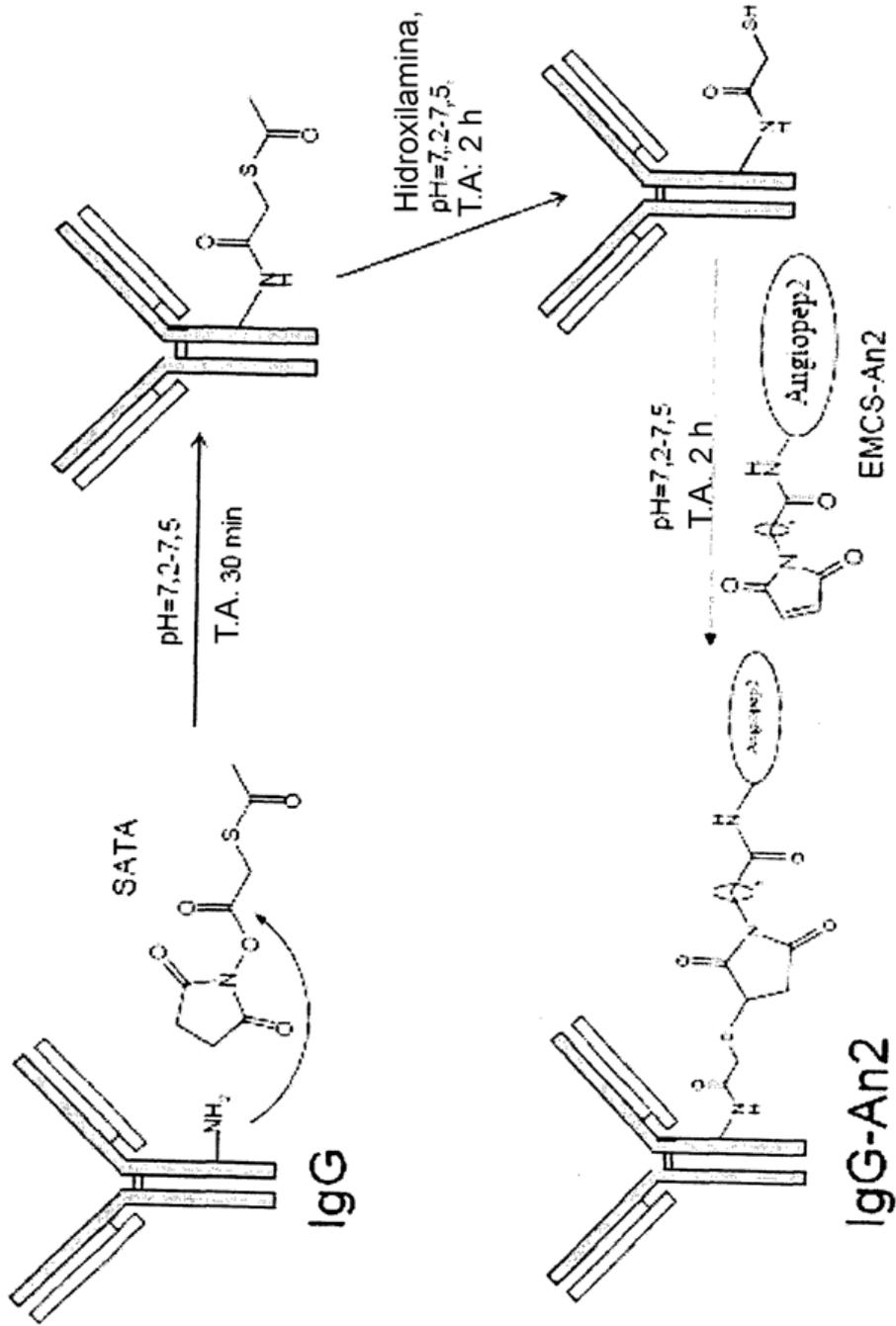


Fig. 5

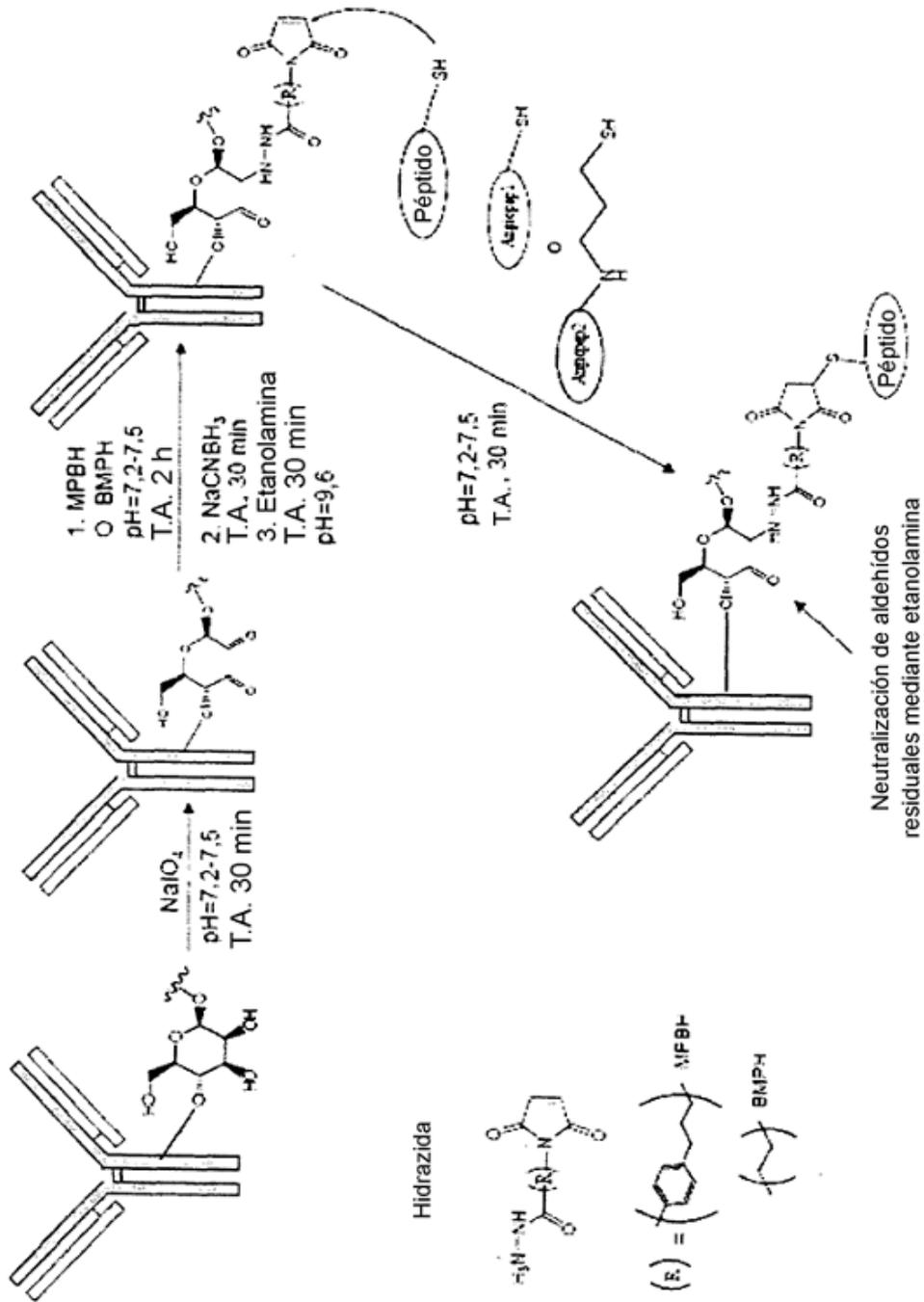


Fig. 6

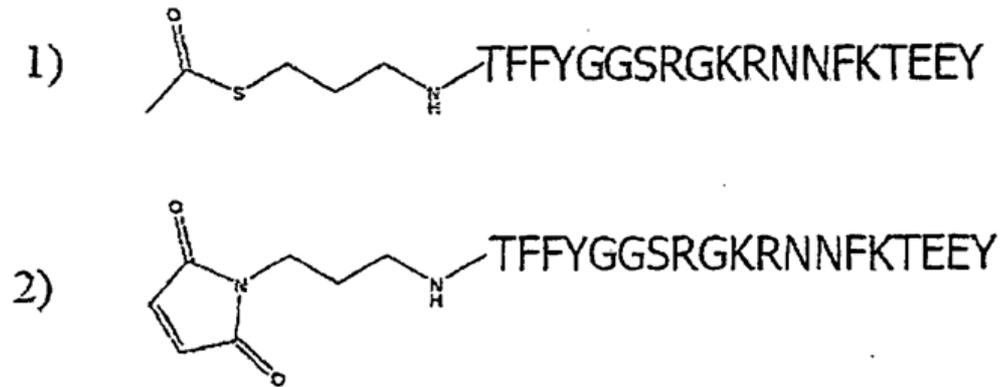


Fig. 7

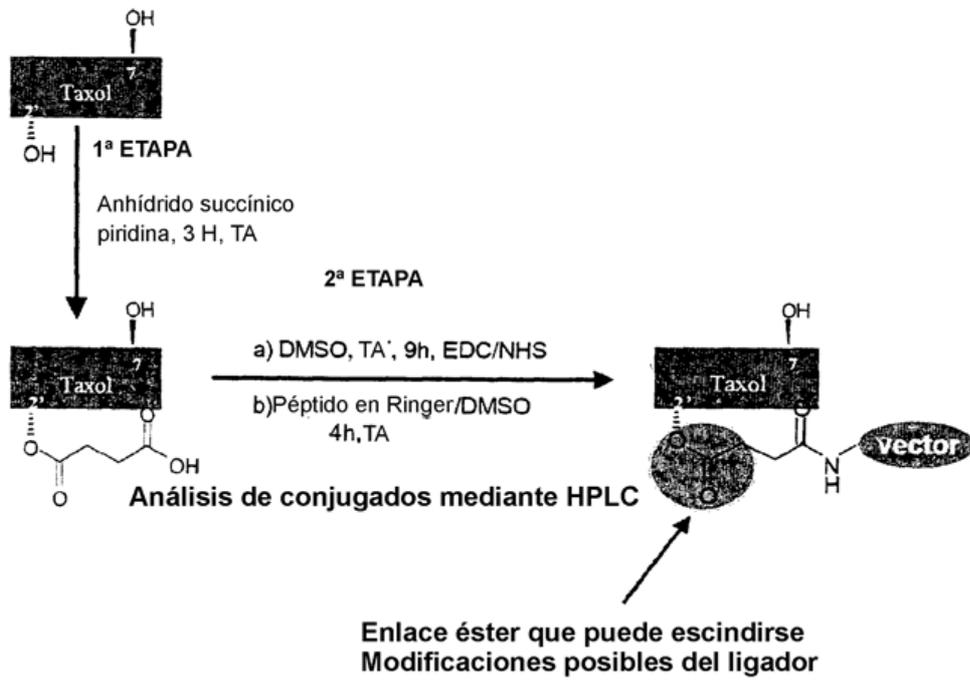


Fig. 8

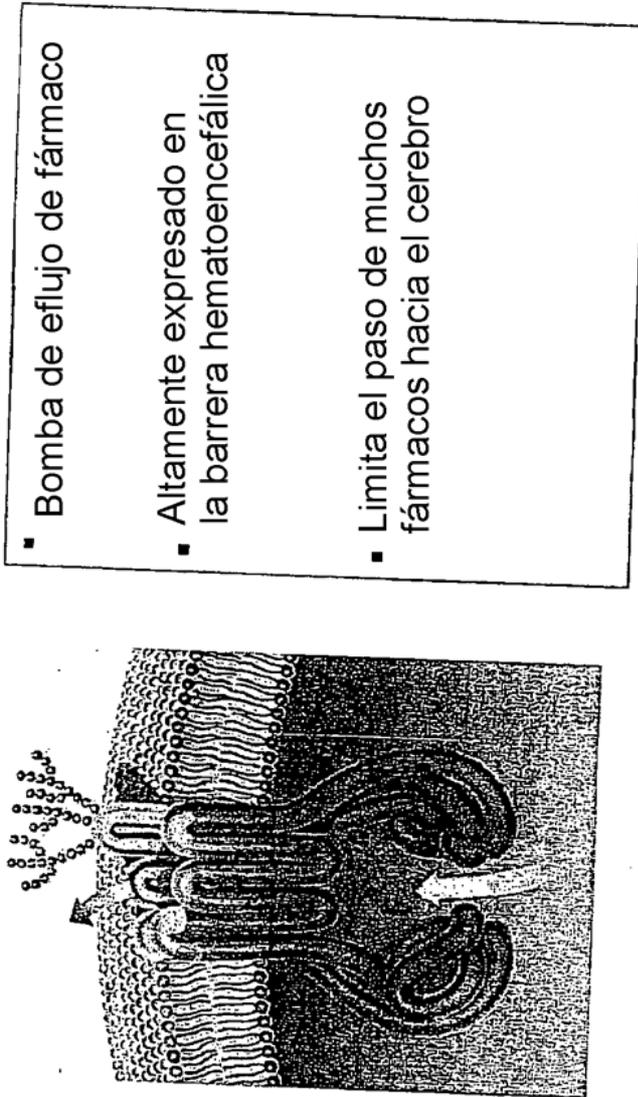


Fig. 9

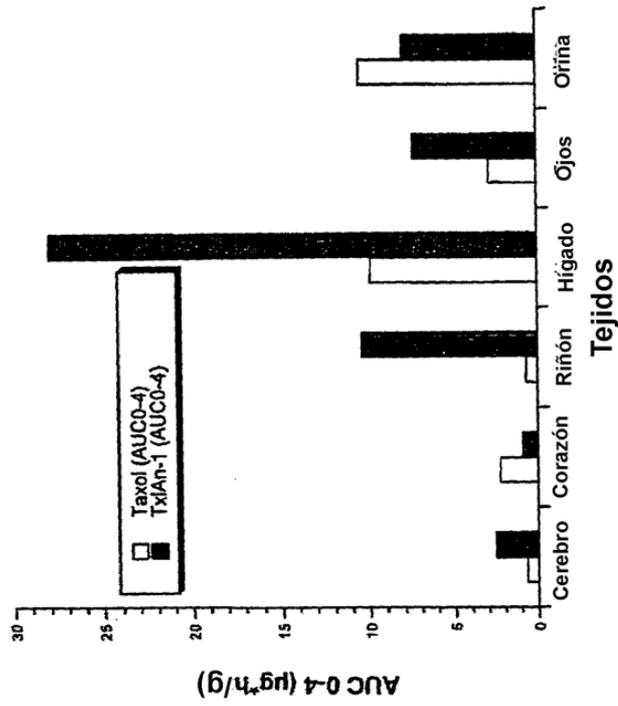


Fig. 10A



Fig. 10B

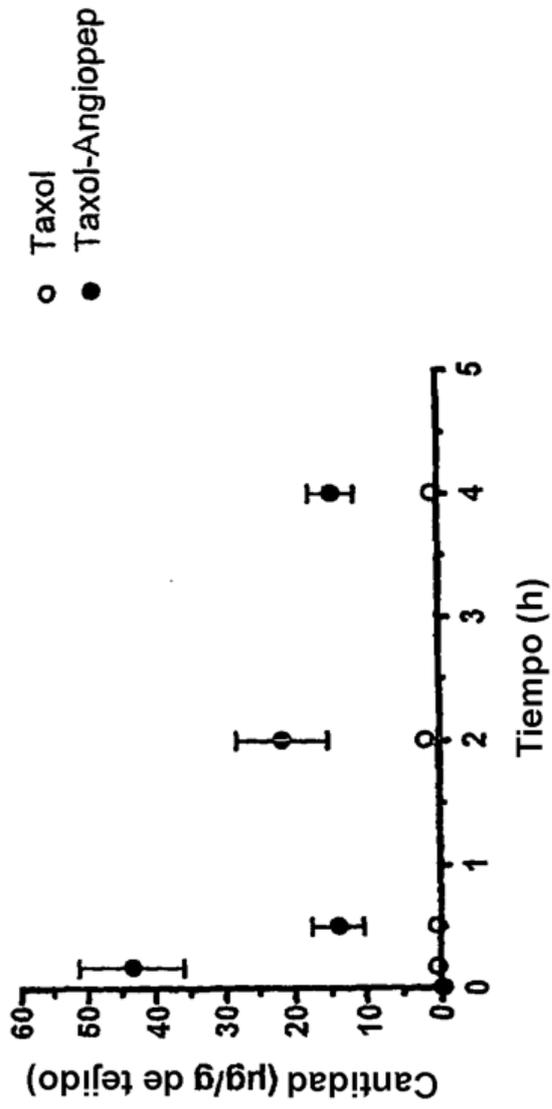


Fig. 11

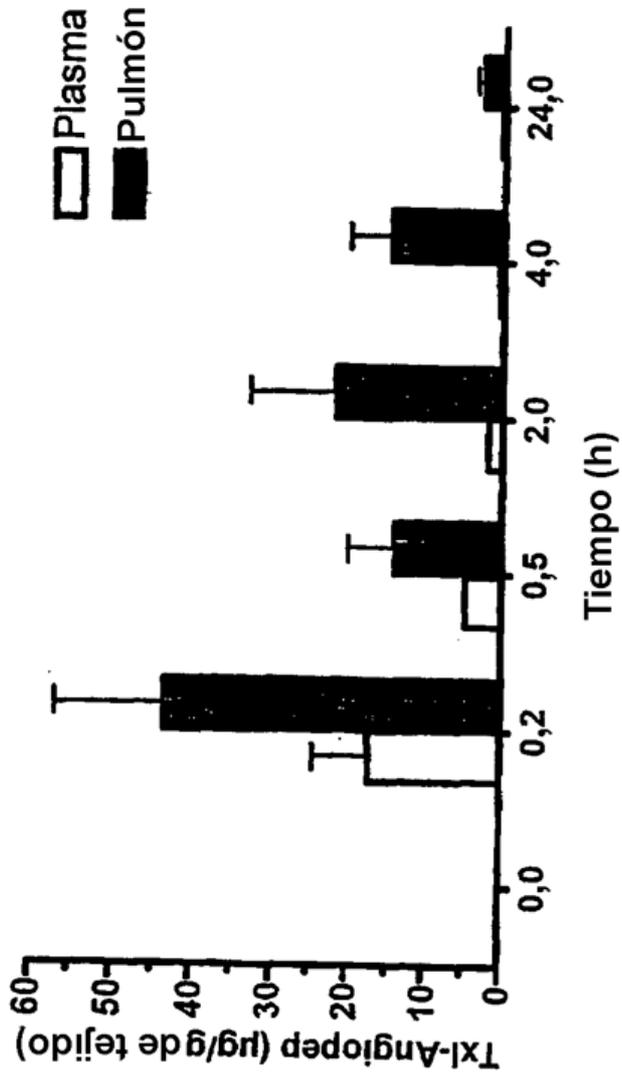


Fig. 12

# AngioPep-7

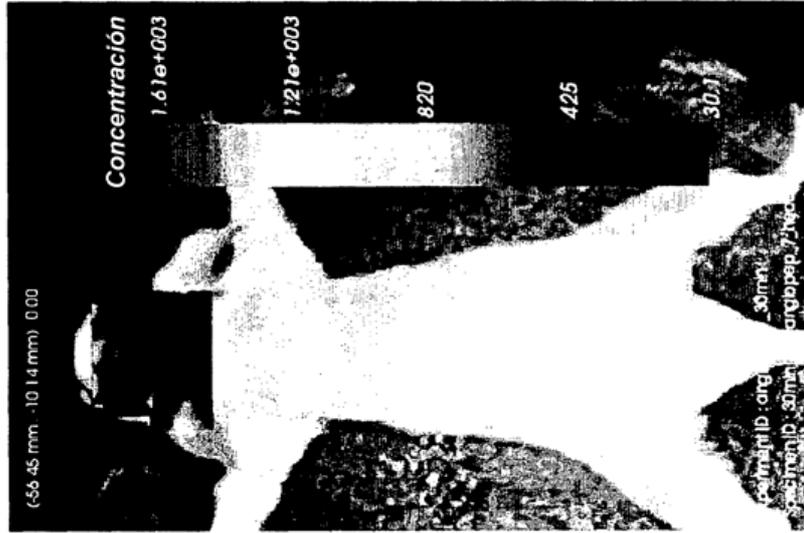


Fig. 13B

# AngioPep-2

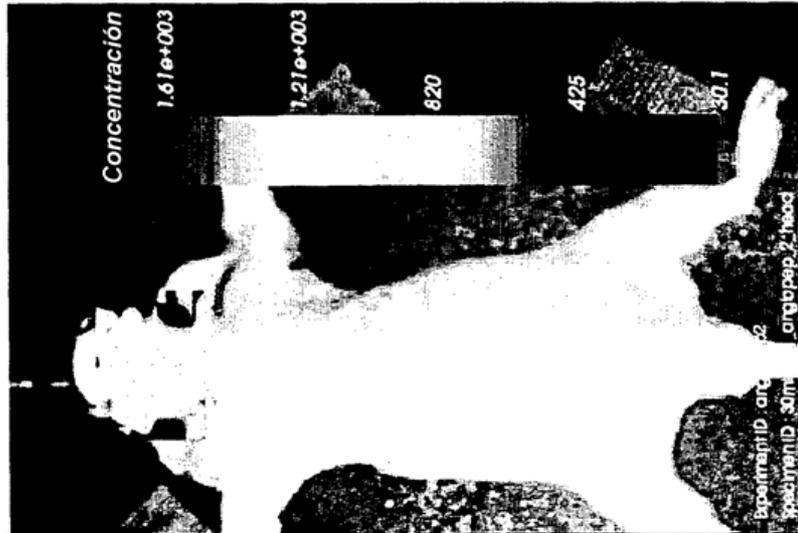


Fig. 13A

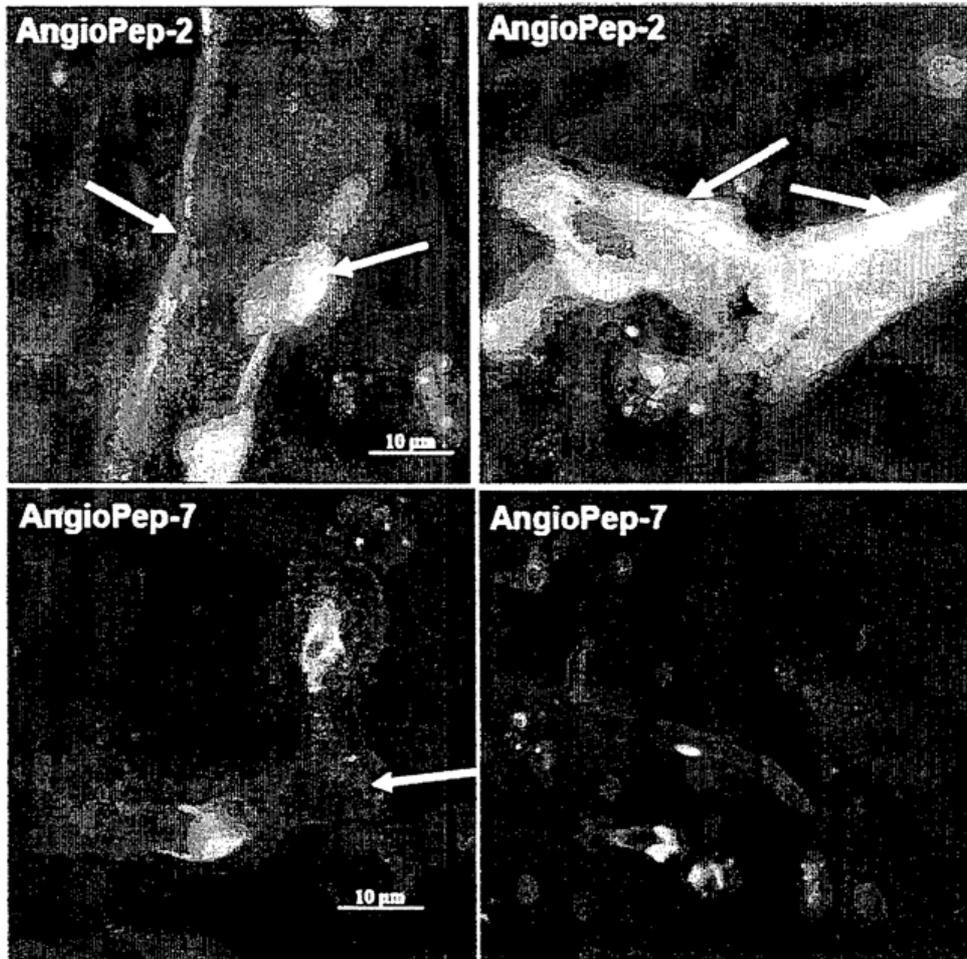


Fig. 14

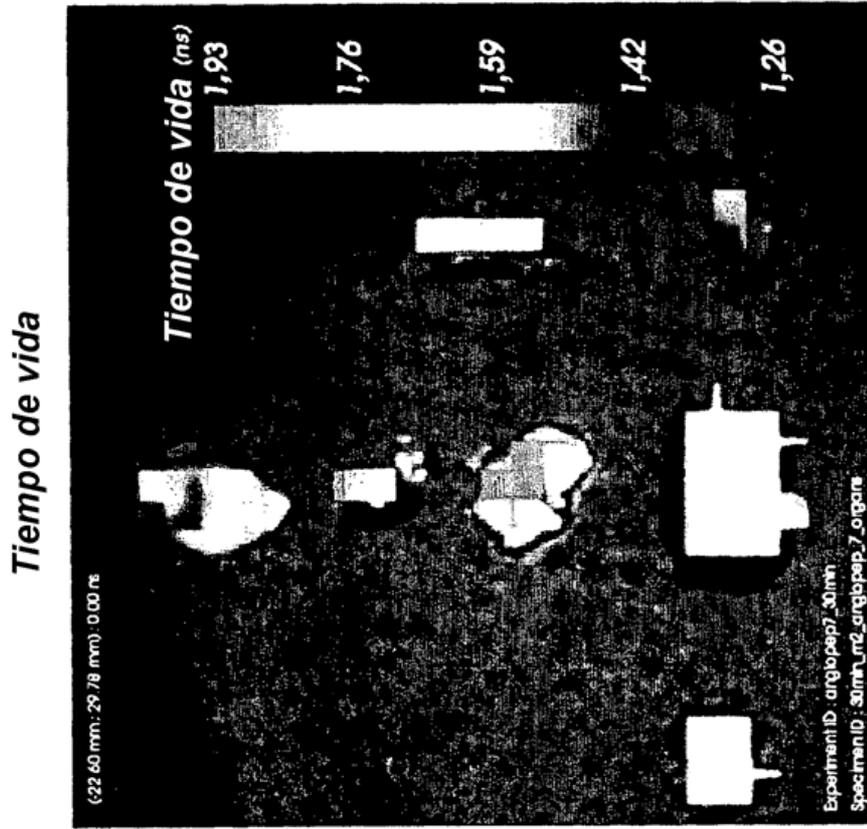


Fig. 15B

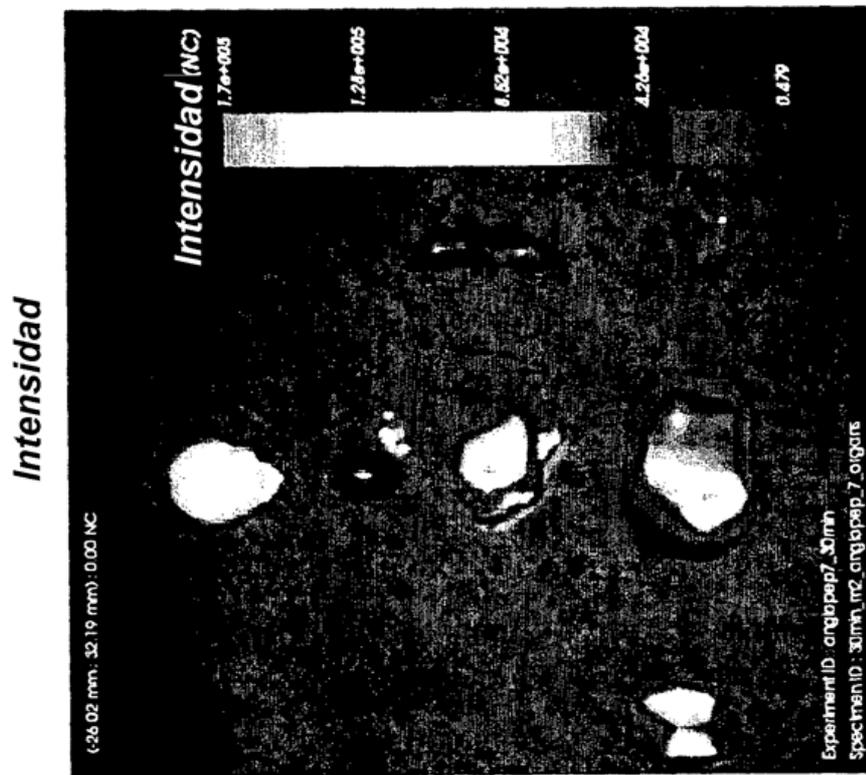


Fig. 15A

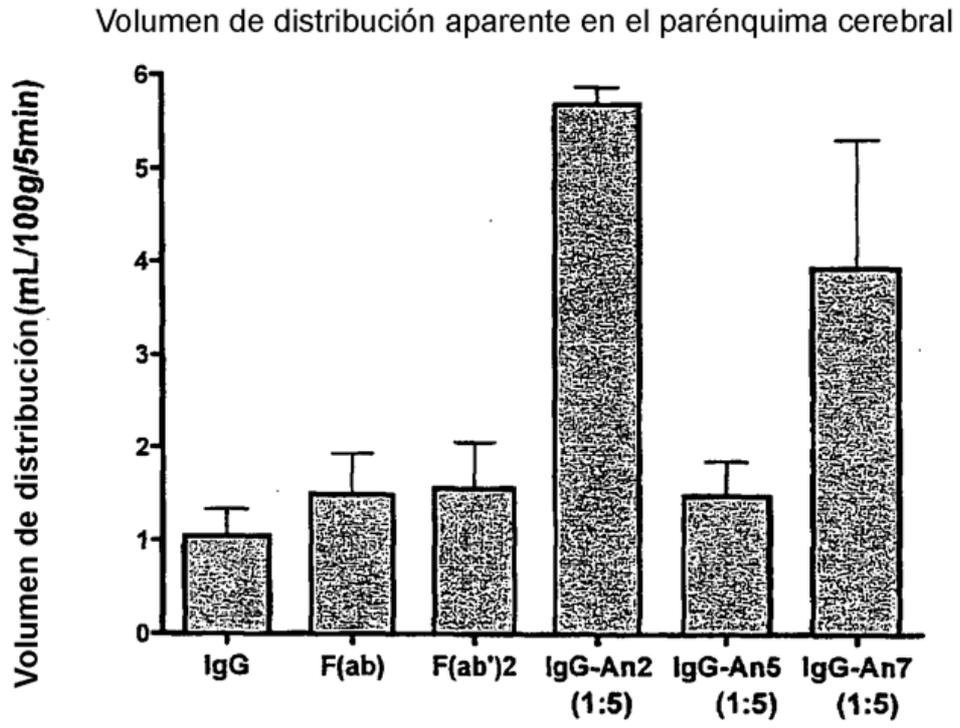


Fig. 16

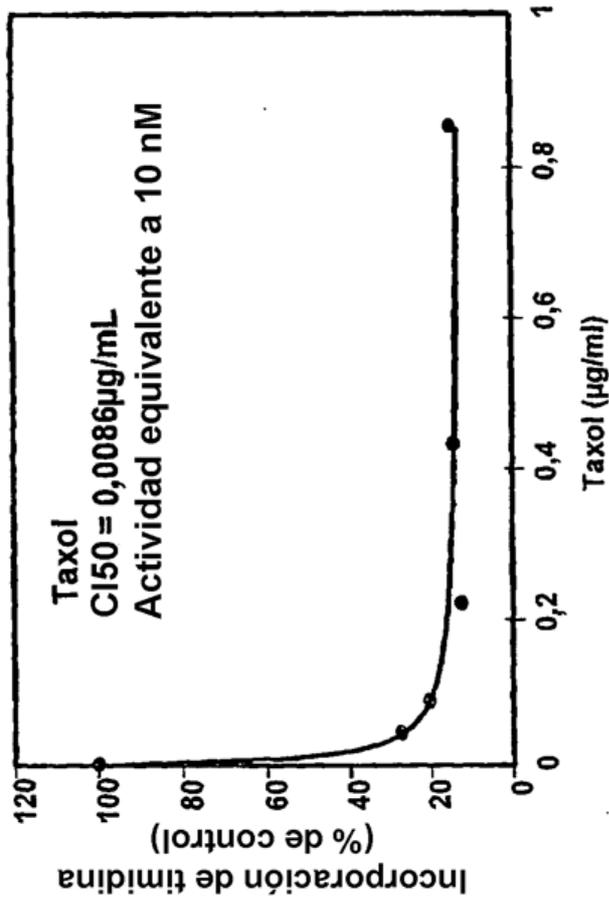


Fig. 17

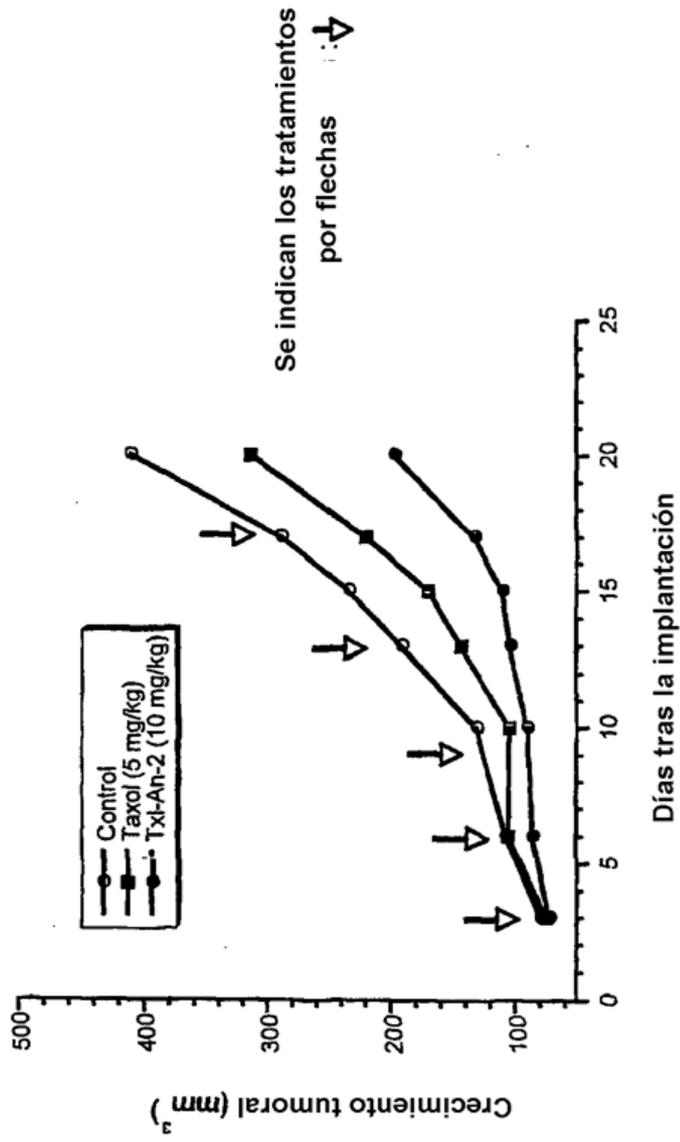


Fig. 18A

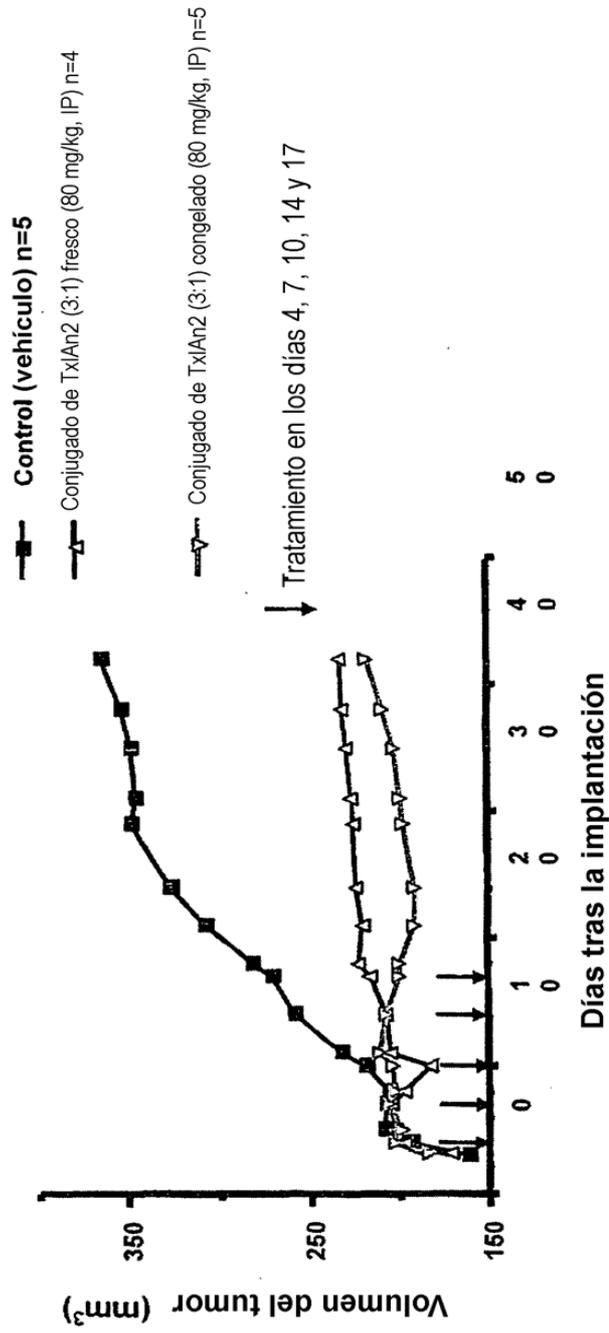
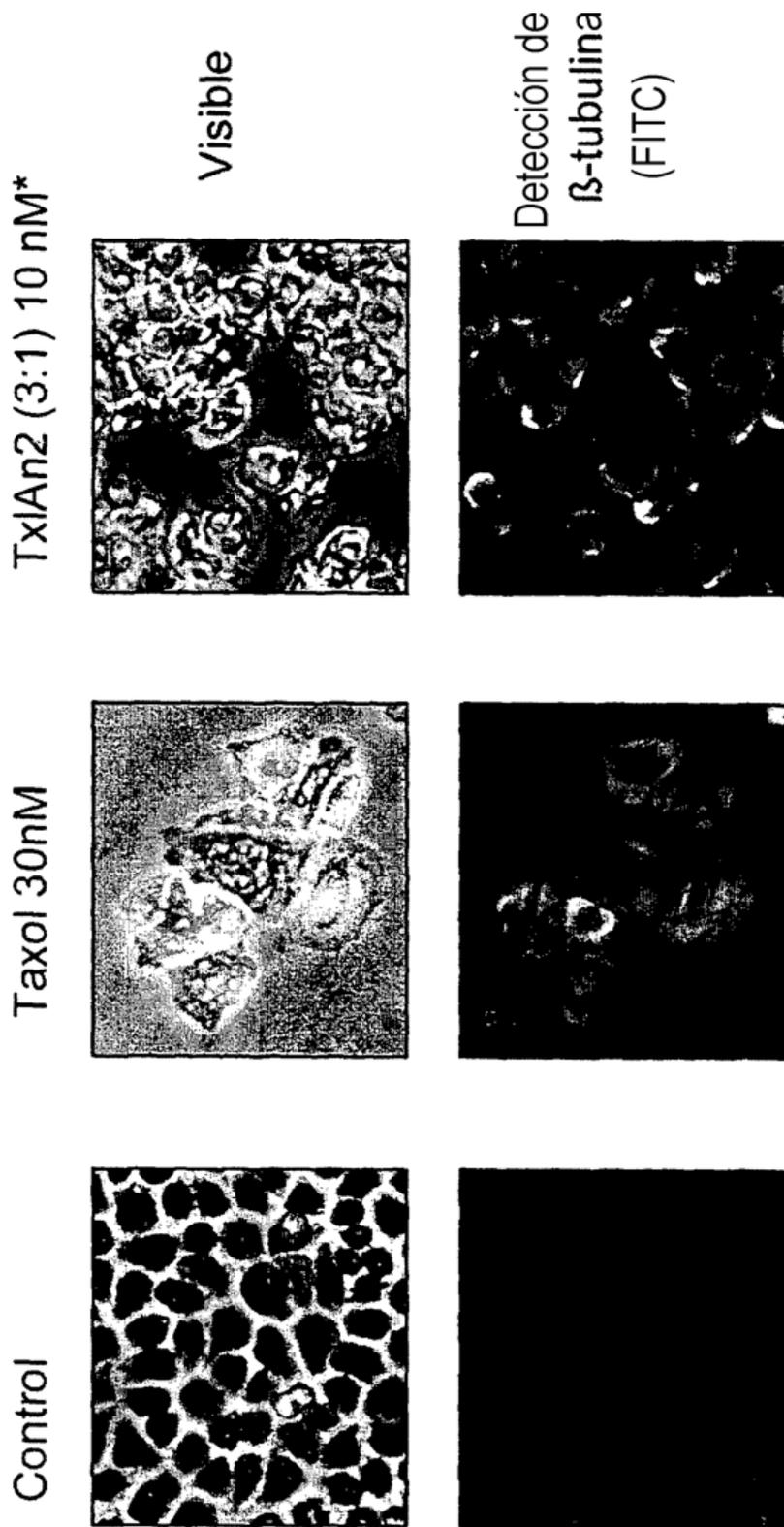


Fig. 18B



\* TxIAn2 (3:1) conjugado equivalente a 30 nM de Taxol (tratamiento de 24 h)

Fig. 19

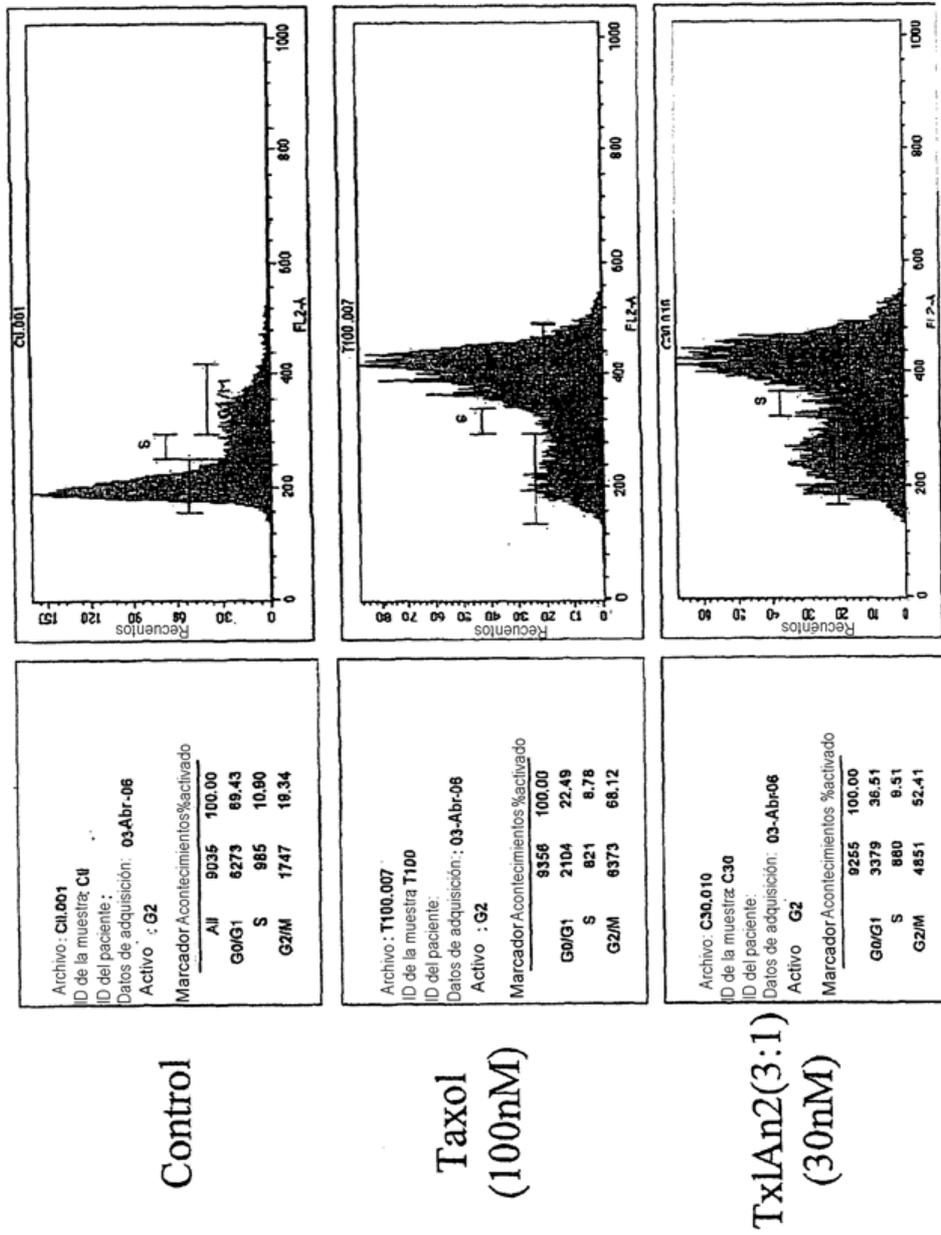


Fig. 20

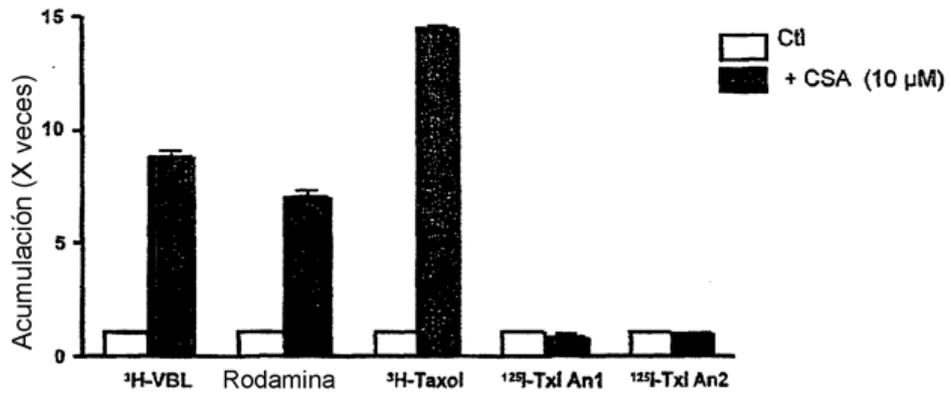


Fig. 21A

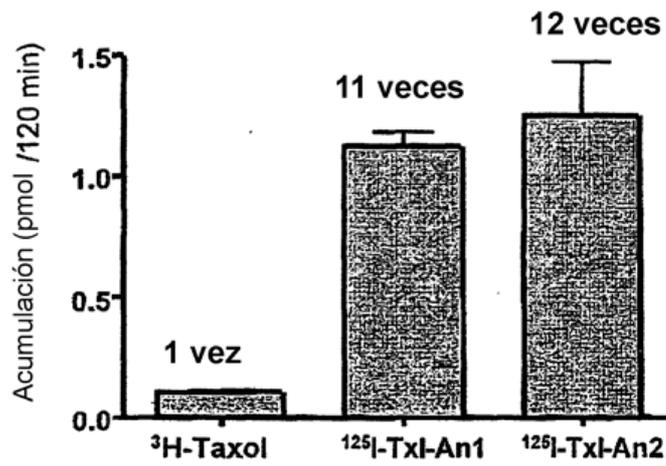


Fig. 21B

Expresión de LRP en tumores cerebrales

A. Tumores cerebrales primarios

U-87 Glioblastomas

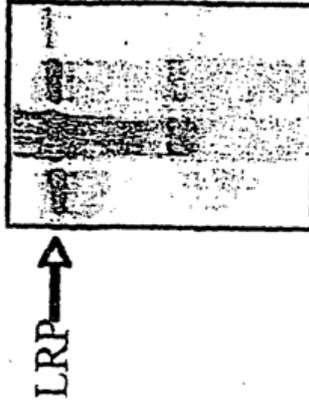


Fig. 22A

B. Metástasis cerebral de

U-87 Pulmón Mamma Melanomas

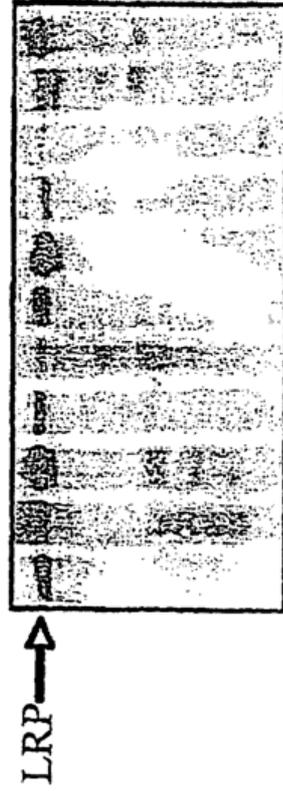


Fig. 22B

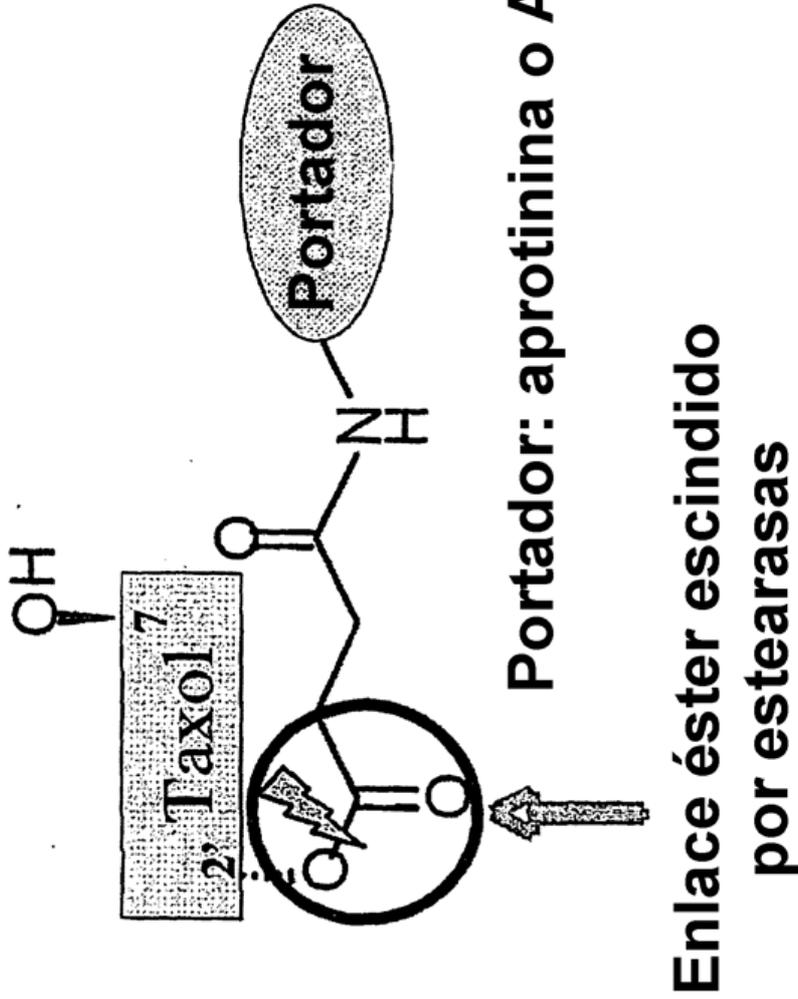
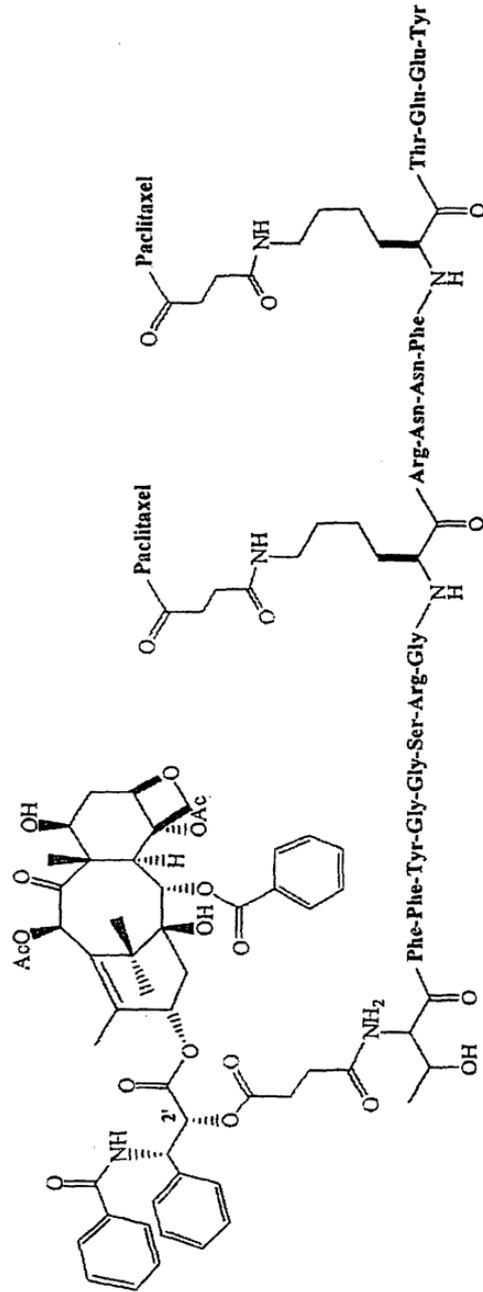


Fig. 23A



[Tx|An2 (3:1)]

Fig. 23B

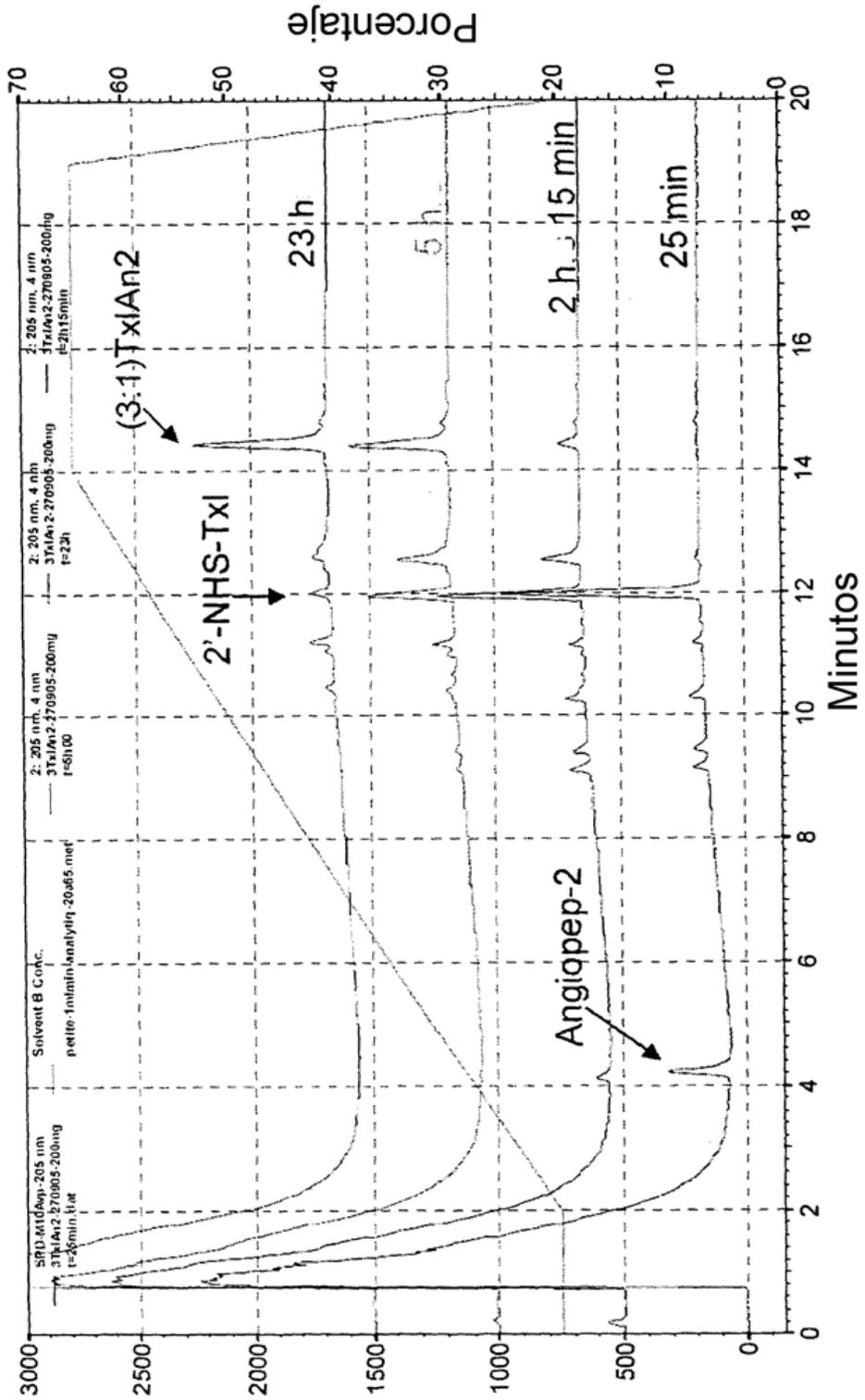


Fig. 24

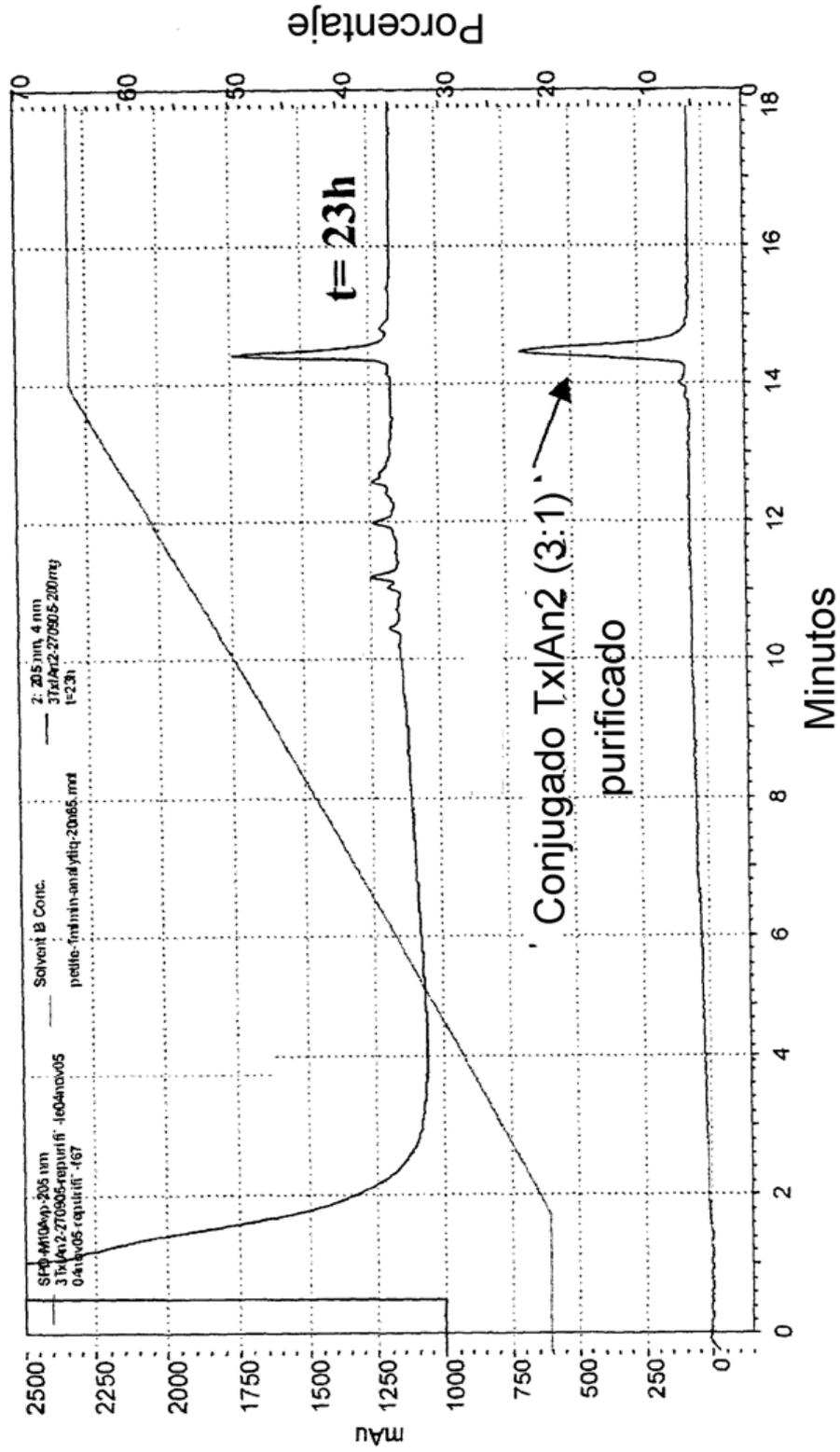


Fig. 25

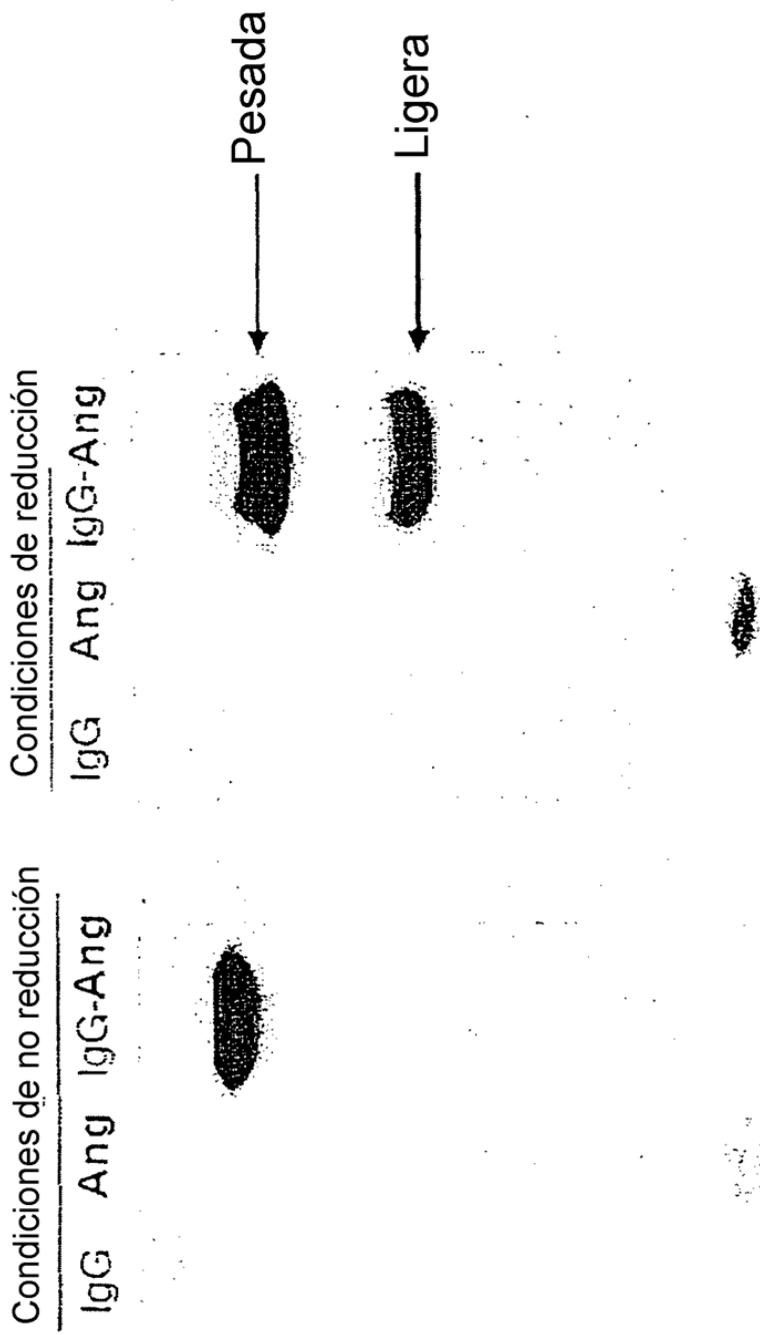


Fig. 26

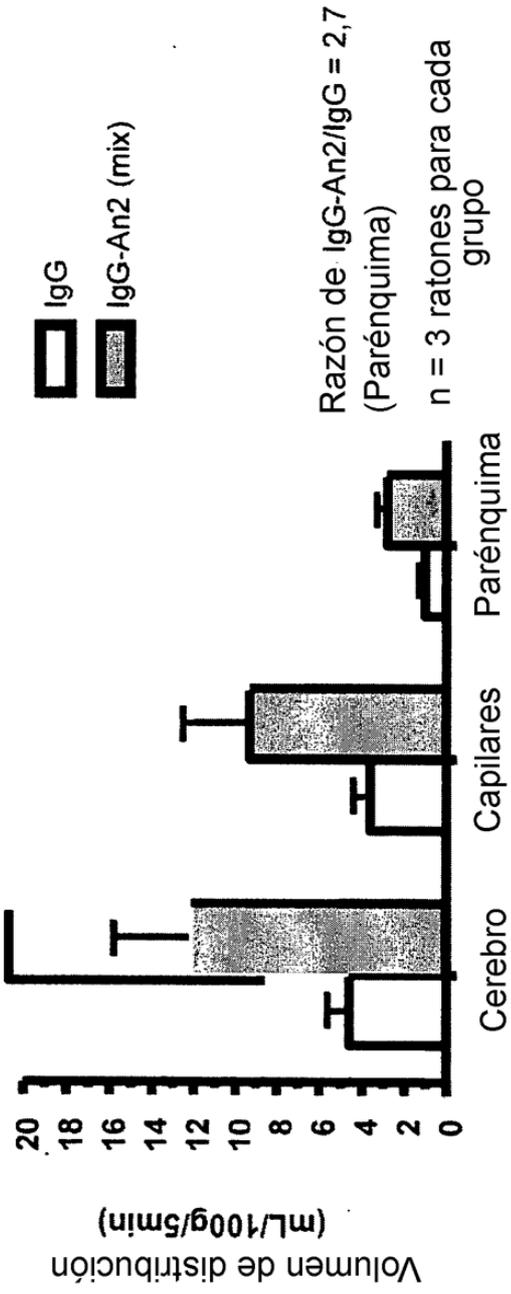


Fig. 27

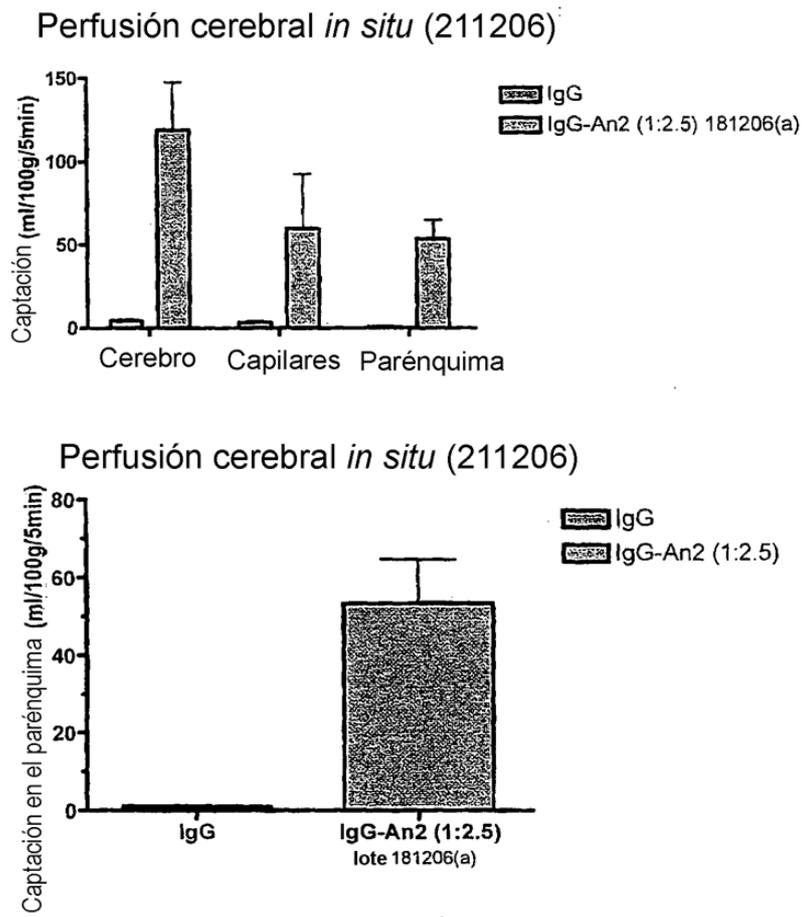


Fig.28

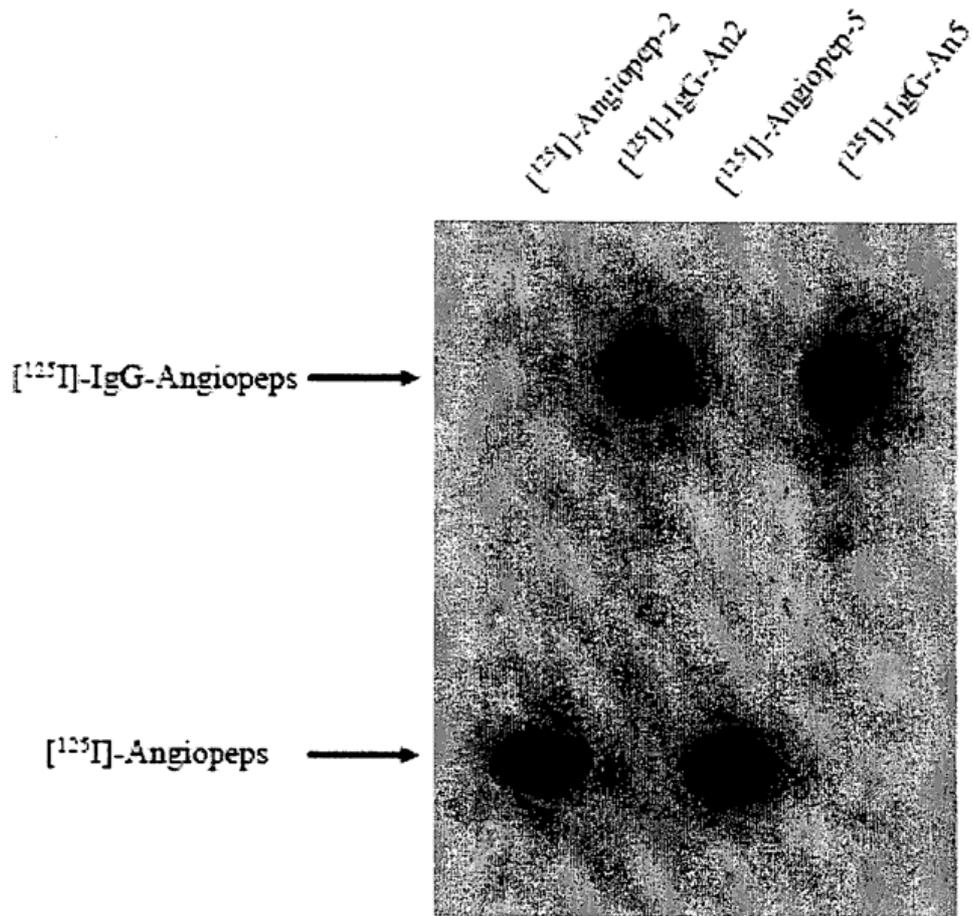


Fig. 29

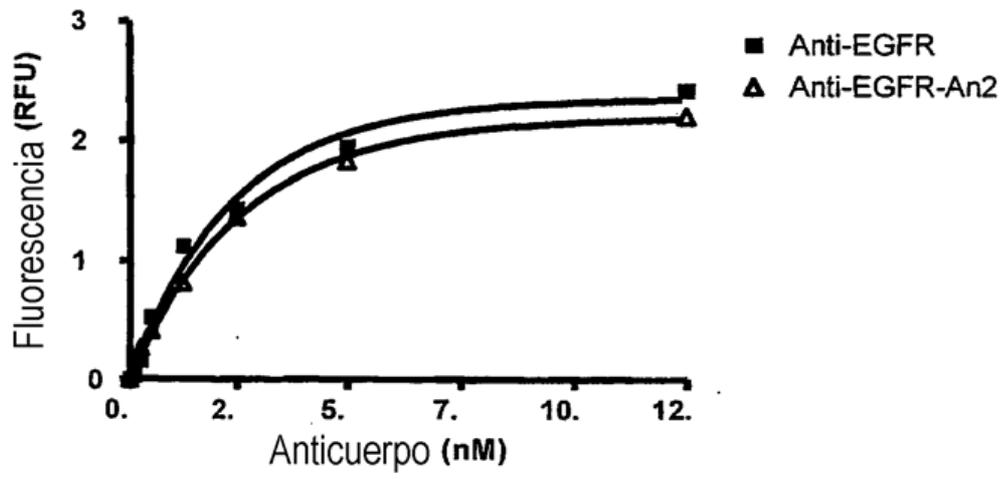


Fig.30

Perfusión cerebral *in situ* (240107)

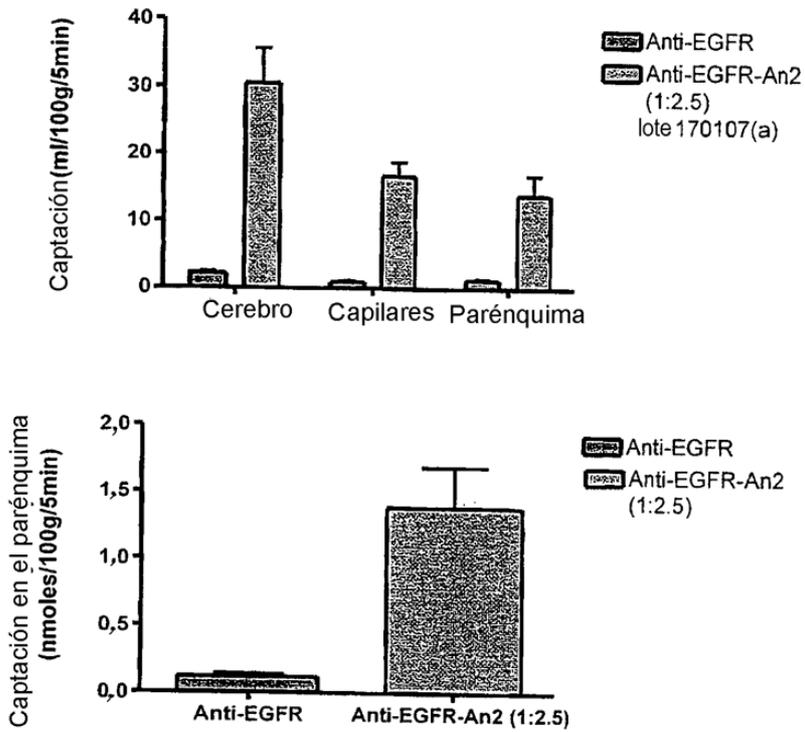


Fig.31

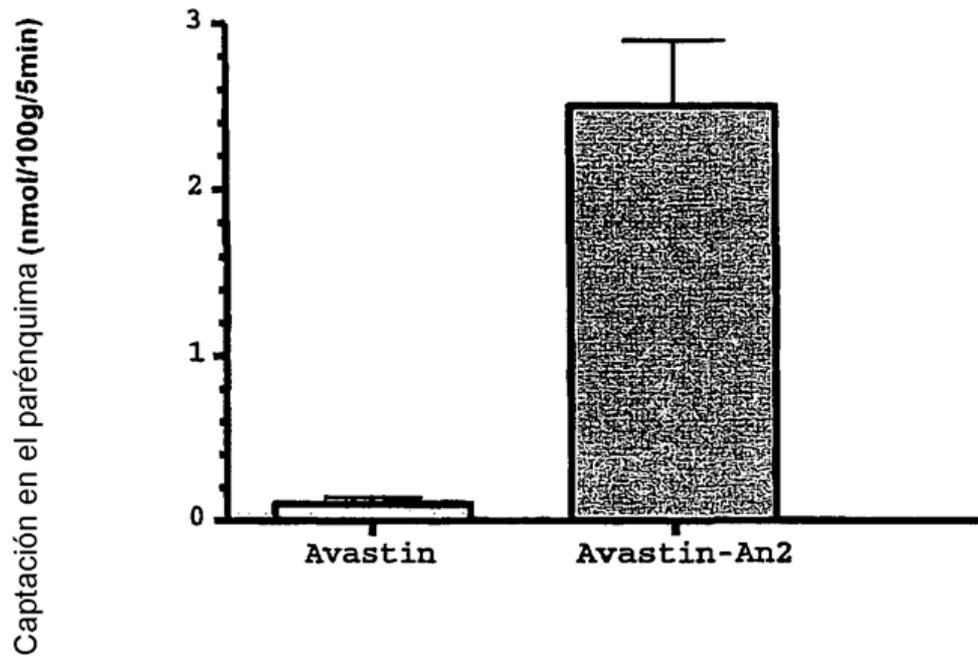


Fig.32

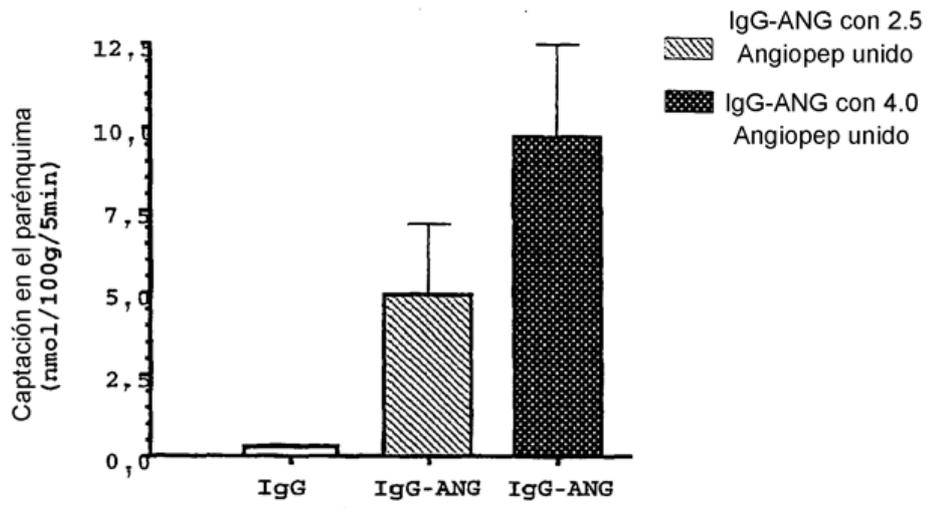


Fig.33