

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 496 493**

51 Int. Cl.:

A61K 31/70 (2006.01)
A61K 38/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
C07K 1/00 (2006.01)
C12P 21/06 (2006.01)
C12P 21/04 (2006.01)
G01N 33/53 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2003 E 03717870 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **28.05.2014 EP 1463512**

54 Título: **Uso de p97 como sistema de administración de enzimas para la administración de enzimas lisosómicas terapéuticas**

30 Prioridad:

11.01.2002 US 347758 P

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

19.09.2014

73 Titular/es:

**BIOASIS TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
Suite 125-10551 Shellbridge Way
Richmond, BC V6X 2W9, CA**

72 Inventor/es:

**STARR, CHRISTOPHER M. y
ZANKEL, TODD**

74 Agente/Representante:

LINAGE GONZÁLEZ, Rafael

ES 2 496 493 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

Uso de p97 como sistema de administración de enzimas para la administración de enzimas lisosómicas terapéuticas

5 **Campo de la invención**

La presente memoria descriptiva está relacionada con el campo de la farmacia y específicamente con el tratamiento de enfermedades a través de la introducción en un sujeto de la proteína o polipéptido p97 conjugado con un agente terapéutico o de diagnóstico. En particular, esta memoria descriptiva se refiere a conjugados de p97 y proteínas deficientes en una enfermedad de almacenamiento lisosómico y métodos para el tratamiento, la mejora o la prevención de enfermedades de almacenamiento lisosómico mediante la administración de los conjugados a sujetos afectados por tales enfermedades.

15 **Antecedentes de la invención**

Las enfermedades de almacenamiento lisosómico (EAL) surgen como resultado de la ausencia o reducción de la actividad de enzimas específicas dentro de los lisosomas de una célula. Se ha identificado un gran número de estas enzimas y se han correlacionado con sus enfermedades relacionadas. Una vez identificada la enzima ausente o deficiente, el tratamiento se puede reducir al problema de administrar una enzima de reemplazo (fármaco) a los tejidos afectados de un paciente. Dentro de las células, el efecto de la enzima ausente se puede observar como una acumulación de «material de almacenamiento» no degradado dentro del lisosoma intracelular. Esta acumulación provoca que los lisosomas se hinchen y funcionen mal, lo que se traduce en daño celular y tisular. Puesto que las enfermedades de almacenamiento lisosómico típicamente tienen una etiología genética, muchos tejidos carecerán de la enzima en cuestión. Sin embargo, diferentes tejidos sufren la ausencia de la misma enzima de manera diferente. La magnitud de la afectación adversa de un tejido viene determinada, en cierta medida, por el grado en el que el tejido genere el sustrato de la enzima ausente. Los tipos de tejido que soportan la mayor carga del almacenamiento, a su vez, dictan cómo se debe administrar el fármaco al paciente. Mientras que la terapia de reemplazo enzimático (TRE) por vía intravenosa resulta beneficiosa para la EAL (por ejemplo, MPS I, MPS II), contar con medios para la mejora de la administración de la enzima terapéutica a los lisosomas en estas enfermedades resultaría ventajoso en términos de reducción de costes y aumento de la eficacia terapéutica.

Además, la barrera hematoencefálica (BHE) bloquea la libre transferencia de muchos agentes de la sangre al cerebro. Por esta razón, no se espera que las EAL que presentan una afectación neurológica significativa (por ejemplo, MPS III, MLD, GM1) sean tan sensibles a la TRE intravenosa. Para tales enfermedades, sería altamente deseable disponer de un método de administración de la enzima a través de la BHE y hasta los lisosomas de las células afectadas.

A principios de los 1980, se identificó la melanotransferrina (MTf) o p97 como un antígeno oncofetal que o bien no se expresa o solo se expresa ligeramente en los tejidos normales, pero que se encuentra en cantidades mucho más grandes en las células neoplásicas (en particular en las células de melanoma malignas) y en los tejidos fetales (Woodbury, y cols., P.N.A.S. USA, 77:2183-2187 (1980)). Más recientemente, se han documentado informes adicionales que describen la identificación de la MTf humana en tejidos normales, tales como los conductos de las glándulas sudoríparas, las células endoteliales del hígado, y el endotelio y la microglía reactiva del cerebro (Jefferies, y cols., Brain Res., 712:122-126 (1996); and Rothenberger, y cols., Brain Res., 712:117-121 (1996)). Curiosamente, el suero normal contiene niveles muy bajos de MTf soluble circulante, pero se ha encontrado un aumento de la MTf sérica soluble en pacientes con enfermedad de Alzheimer avanzada (Kennard, y cols., Nat. Med., 2:1230-1235 (1996); patente de EE.UU. nº 5981194).

Ha resultado difícil de elucidar la función bioquímica y el metabolismo de la MTf. A juzgar por su aspecto, la MTf es engañosamente similar a la transferrina (Tf) y a la lactotransferrina (lactoferrina o Lf). En los seres humanos, estas proteínas comparten una homología de la secuencia de aminoácidos del 37-39 %. En particular, cada una de estas proteínas se une reversiblemente al hierro, y sus dominios N-terminales de unión al hierro son bastante similares (Baker, y cols., TIBS, 12:350-353 (1987)).

Sin embargo, no se ha confirmado la existencia de paralelismos funcionales entre estas proteínas. Por un lado, a diferencia de la Tf y la Lf, la MTf existe tanto en forma unida a la membrana como en forma soluble en suero. Además, en contraste con la Tf y la Lf, no se ha identificado receptor celular para la MTf. Se sabe que la Tf soluble en suero es absorbida por las células en un proceso dependiente de la energía mediado por el receptor de la transferrina (Tf-R) (Cook, y cols., Annu. Rev. Med., 44:63-74 (1993)). Asimismo, es probable que la internalización de la Lf esté mediada por un proceso mediado por receptor (Fillebeen, y cols., J. Biol. Chem., 274(11):701-7017 (1999)). Dos receptores conocidos para la Lf son LRP-1 y RAGE, aunque podrían existir otros (Melinger, y cols., FEBS Letters, 360:70-74 (1995); Schmidt, J. Biol. Chem., 269(13):9882-9888 (1994)).

Con respecto al sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro, médula espinal), existen al menos tres formas de mejorar la administración: inyección, permeabilización de la BHE y modificación del fármaco. La inyección directa implica la inyección del fármaco en el tejido cerebral, evitando por completo la vasculatura. Este método adolece

principalmente del riesgo de complicaciones (infección, daño tisular) relacionado con las inyecciones intracraneales. Este riesgo se agrava cuando se considera en el contexto de una pauta de tratamiento regular aplicada a lo largo de la vida del paciente. También resulta difícil, usando un número limitado de inyecciones en un único sitio, lograr la misma penetración que los vasos sanguíneos (y por lo tanto, potencialmente, los fármacos) tienen en todo el cerebro.

El segundo método consiste en alterar la BHE de forma no específica mediante la inyección concomitante de fármacos por vía intravenosa. La permeabilización de la BHE se lleva a cabo químicamente. Este método adolece de una falta de especificidad. Todos aquellos componentes de la sangre que quedan necesariamente excluidos por la BHE entrarán en el cerebro junto con el fármaco. En estas condiciones, el cerebro se vuelve vulnerable y es previsible que se produzcan daños en el transcurso de una pauta de tratamiento durante toda la vida.

El tercer medio de aumento de la disponibilidad cerebral del fármaco transportado por la sangre implica la funcionalización específica del fármaco con radicales que faciliten el transporte a través de una BHE no alterada. Este método tiene las ventajas de lograr una infiltración específica en la BHE y de una cómoda administración intravenosa. En la patente de EE.UU. nº 6455494 se muestra un método para aumentar la capacidad de un agente terapéutico para cruzar la barrera hematoencefálica, y se describe el uso de p97 como vehículo para administrar un fármaco terapéutico a través de la barrera hematoencefálica.

La p97 (melanotransferrina) es una proteína humana natural. La p97 fue descubierta y caracterizada como un marcador de la superficie celular del melanoma humano (antígeno asociado al melanoma), pero más recientemente se ha encontrado en otros tipos de tumores, así como en el cerebro humano normal y en el tejido hepático, en cantidades traza en otros tejidos del cuerpo y en el suero. Se desconoce la función de p97 en el cuerpo, pero a juzgar por su estructura y propiedades de unión, que se cree que está implicada en el transporte de iones metálicos (por ejemplo, hierro) hasta las células. Jefferies, y cols. han estado trabajando con la p97 desde 1992 (patente de EE.UU. nº 5981194). Estas investigaciones se han centrado en la p97 como marcador de diagnóstico para la enfermedad de Alzheimer (EA). Synapse ha desarrollado una prueba en sangre (suero) para la EA que se basa en el descubrimiento de que la concentración sérica de la p97 aumenta a medida que avanza la enfermedad. Durante el desarrollo de esta prueba, se descubrió que la p97 se transporta de forma activa desde la sangre hacia el tejido cerebral de los individuos normales. Este descubrimiento fue el impulso para el desarrollo de la p97 como posible sistema de transporte para administrar moléculas desde la sangre, a través de la BHE, para llegar hasta los líquidos intersticiales cerebrales.

El acontecimiento clave para la administración satisfactoria de agentes terapéuticos al cerebro es el transporte de estas grandes moléculas a través de la estrecha red de células endoteliales capilares que componen la BHE. Durante los últimos años, se ha demostrado tanto *in vitro* como en modelos animales que es posible transportar a través de la BHE hasta las células cerebrales pequeñas moléculas sintéticas, grandes enzimas de glucoproteínas y grandes partículas inorgánicas (partículas de oro coloidal de 5 nm) ligadas químicamente a la p97. Tal transporte de grandes moléculas a través de la BHE implica un proceso conocido como transcitosis. Este es un mecanismo por el cual las moléculas son recogidas de la sangre y transportadas a través de las células capilares de la BHE por lo demás intacta hasta al tejido cerebral.

Las rutas de la transcitosis son distintas del resto del tráfico vesicular que tiene lugar dentro de la célula endotelial capilar y el tránsito se produce sin alteración de los materiales transportados. La transcitosis es un proceso específico de tipo celular mediado por receptores sobre la superficie endotelial de la BHE. El transporte de conjugados de p97 (es decir, p97 químicamente ligada a macromoléculas) a través de la BHE se produce por transcitosis. La p97 conjugada a la enzima peroxidasa de rábano picante (HRP) (un ejemplo de una «carga útil» enzimática) se puede transportar a través de la BHE.

El documento US 4866042 describe el tratamiento de trastornos cerebrales genéticos y adquiridos mediante el uso de material genético (por ejemplo, vectores virales) que se introduce en el torrente sanguíneo para su administración al cerebro. El documento US 4866042 describe que, con el fin de que el vector viral pase a través de la barrera hematoencefálica, se administra en combinación con una ruptura osmótica.

El documento WO 94/01463 da a conocer que la p97 está implicada en el transporte del hierro. El documento WO 94/01463 describe métodos para el tratamiento de enfermedades que implican alteraciones del metabolismo del hierro que comprenden la administración de la p97.

Para un tratamiento eficaz de la EAL, es necesario que las células afectadas absorban un agente terapéutico (por ejemplo, la enzima deficiente, u otra enzima o proteína que tenga una actividad terapéutica o de la enzima ausente deseada) y lo dirijan hacia los lisosomas, en donde actuará sobre la cantidad excesiva o perjudicial de material de almacenamiento existente en los mismos. Los solicitantes dan a conocer a continuación composiciones y métodos para el tratamiento de la EAL que implican el uso de las proteínas p97 para dirigir la administración de agentes terapéuticos, incluyendo las proteínas o las enzimas deficientes en la EAL, a los lisosomas de las células.

Breve resumen de la invención

La presente invención se refiere a una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto afectado por una enfermedad de almacenamiento lisosómico; comprendiendo dicho método una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca la enfermedad; en donde la proteína se selecciona entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde la composición se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.

En otro aspecto, la presente invención se refiere al uso de un compuesto que comprende una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca una enfermedad de almacenamiento lisosómico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto afectado por una enfermedad de almacenamiento lisosómico; en donde la proteína se selecciona entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde el medicamento se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.

En un aspecto adicional, la presente invención se refiere a un método de detección de la actividad terapéutica de un compuesto en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, comprendiendo dicho método:

poner en contacto una célula que tiene un lisosoma *in vitro* con el compuesto, en donde el compuesto comprende p97 unida covalentemente a una proteína deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico; en donde la proteína se selecciona entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y el seguimiento de la administración del compuesto al lisosoma.

La presente invención, en otro aspecto, se refiere a una composición farmacéutica para uso en la administración de una proteína a una célula en un sujeto afectado por una enfermedad de almacenamiento lisosómico; comprendiendo dicha composición una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca una enfermedad de almacenamiento lisosómico y un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde la proteína se selecciona entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde el compuesto se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.

La presente memoria descriptiva se refiere al descubrimiento de que los conjugados de p97 y un agente terapéutico, en los que el agente se une covalentemente a p97, o a un fragmento o parte de la misma, son excelentes vehículos para la administración mejorada del agente a los lisosomas de las células dentro y fuera del SNC. Por consiguiente, en un primer aspecto, la memoria descriptiva da a conocer un método para la administración de un agente terapéutico al lisosoma de una célula. En un segundo aspecto, la memoria descriptiva da a conocer un método para tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico en un paciente mediante la administración de una molécula de p97 unida covalentemente a un agente terapéutico que es una proteína o enzima deficiente en los lisosomas de un sujeto afectado por tal enfermedad (por ejemplo, terapia de reemplazo enzimático). Tales conjugados de p97-agente son particularmente útiles, por ejemplo, en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico tales como MPS I, MPS II, MPS III A, MPS III B, leucodistrofia metacromática, enfermedad de Gaucher, Krabbe, Pompe, CLN2, Niemann-Pick y Tay-Sachs, en las que la deficiencia de una proteína lisosómica contribuye al estado patológico. En un tercer aspecto, la memoria descriptiva da a conocer composiciones farmacéuticas que comprenden una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína o enzima deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico. En un cuarto aspecto, la memoria descriptiva da a conocer métodos para la identificación de conjugados de p97 que son útiles en la administración de un agente a un lisosoma.

En algunas formas de realización, los métodos de la memoria descriptiva se pueden utilizar para tratar este tipo de enfermedades de almacenamiento lisosómico, tales como aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol/enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber/enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis de tipo I/II, enfermedad de Gaucher de tipo I/II/III, leucodistrofia de las células globoides/enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glucógeno (glucogenosis) II/enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 de tipo I/II/III, gangliosidosis GM2 de tipo I/enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 de tipo II/enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α -manosidosis de tipo I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolipidosis de tipo I/sialidosis de tipo I/II, mucopolipidosis de tipo II/III, enfermedad de células I, mucopolipidosis de tipo IIIC/polidistrofia pseudo-Hurler, mucopolisacaridosis de tipo I, mucopolisacaridosis de tipo II/síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis de tipo IIIA/síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIIB/síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIIC/síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IIID/síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis de tipo IVA/síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo IVB/síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis de tipo VI, mucopolisacaridosis de tipo VII/síndrome de Sly, mucopolisacaridosis de tipo IX, deficiencia múltiple de sulfatasa, ceroidlipofuscinosis neuronales, enfermedad de Batten CLN1,

ceroidolipofuscinosis neuronales, enfermedad de Batten CLN2, enfermedad de Niemann-Pick de tipo A/enfermedad de Niemann-Pick de tipo B, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler de tipo I/enfermedad de Schindler de tipo II, y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico.

5 En algunas realizaciones, las composiciones de conjugados de p97 comprenden entre aproximadamente 1 y aproximadamente 5 moléculas del agente de interés ligado a una sola molécula de p97. En algunas realizaciones, más de un agente de interés puede estar ligado a una sola molécula de p97. La biodistribución selectiva de los
10 agentes-p97 puede mejorar la capacidad de dirigir selectivamente los agentes ligados a p97 hasta órganos específicos.

Además, la presente memoria descriptiva da a conocer ensayos de detección para identificar conjugados de p97-
15 agente que pueden prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico poniendo en contacto una célula que contiene un lisosoma con el conjugado y determinando si el conjugado administra el agente al lisosoma. La administración se puede evaluar marcando el conjugado y realizando el seguimiento o detección de la ubicación del marcador en la célula o determinando el efecto del conjugado sobre la cantidad del material de almacenamiento encontrado en el lisosoma. En una realización preferente, el agente es una proteína o enzima deficiente en la enfermedad de almacenamiento lisosómico. En otra realización, la célula es deficiente en el agente conjugado con la molécula de p97.

20 En algunas realizaciones, el método trata enfermedades de almacenamiento lisosómico en las que los tejidos que se han de tratar están aislados del sistema circulatorio por la barrera hematoencefálica (por ejemplo, el cerebro). En una realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método para administrar un compuesto de interés a través de la barrera hematoencefálica de un sujeto a un lisosoma de una célula del sujeto que consiste en:
25 administrar un agente conjugado al sujeto, en donde el agente conjugado comprende una melanotransferrina ligada al agente a través de un enlazador; mediante el cual el agente conjugado pasa a través de la barrera hematoencefálica del sujeto, y mediante el cual el agente entra en un lisosoma de una célula del sujeto.

30 En otra realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método para tratar, mejorar o prevenir una enfermedad de almacenamiento lisosómico de un sujeto que consiste en: administrar un agente conjugado a un sujeto, en donde el agente conjugado comprende una melanotransferrina ligada al agente a través de un enlazador; mediante el cual el agente el agente entra en un lisosoma de una célula periférica (por ejemplo, células no del SNC) del sujeto.

35 En aún otra realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método de terapia de reemplazo enzimático que consiste en: administrar un agente conjugado a un sujeto que necesita una terapia de reemplazo enzimático, en donde el agente conjugado comprende una melanotransferrina ligada al agente a través de un enlazador, en donde el células del paciente tienen lisosomas que contienen cantidades insuficientes de la enzima para prevenir o reducir el daño a las células; mediante el cual el agente conjugado pasa a través de la barrera
40 hematoencefálica del sujeto, y mediante el cual cantidades suficientes de la enzima entran en los lisosomas para prevenir o reducir el daño a las células.

45 En incluso otra realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método para tratar a un paciente que sufre una enfermedad de almacenamiento lisosómico que surge como resultado de la ausencia de una enzima dentro de los lisosomas de una célula que se encuentra en el cerebro, que consiste en: administrar al paciente un agente conjugado, en donde el agente conjugado comprende p97 ligada a la enzima a través de un enlazador; mediante el cual el agente conjugado pasa a través de la barrera hematoencefálica del paciente, y mediante el cual cantidades suficientes de la enzima entran en los lisosomas para prevenir o reducir el daño a las células.

50 En aún incluso otra realización, la presente memoria descriptiva da a conocer un método para identificar un agente que puede prevenir, mejorar o tratar una enfermedad de almacenamiento lisosómico, que consiste en: administrar un agente conjugado de p97 a una célula, en donde la ausencia de la enzima provoca la enfermedad de almacenamiento lisosómico; y determinar si el agente reduce el daño a la célula en comparación con el daño a la célula en caso de no administrar el agente conjugado a la célula. En ciertas realizaciones, el método es un ensayo
55 de alto rendimiento.

60 En una realización adicional, la presente memoria descriptiva da a conocer una nueva composición que comprende un agente conjugado, en donde el agente conjugado comprende una molécula de p97 ligada a una enzima a través de un enlazador, en donde la enzima es una enzima, tal como las expuestas en este documento, que se encuentra en los lisosomas de las células contenidas dentro de la BHE. La composición puede comprender además un vehículo farmacéutico adecuado.

65 Además, la presente memoria descriptiva da a conocer un lisosoma que comprende el agente conjugado. La presente memoria descriptiva también da a conocer una célula que comprende un lisosoma que comprende el agente conjugado. Preferentemente, la célula es una célula que se encuentra rodeada de una barrera hematoencefálica. Más preferentemente, la célula es una neurona o una célula cerebral.

En algunas realizaciones, el conjugado de p97-agente comprende una cualquiera de las siguientes proteínas como el agente activo unido covalentemente a una molécula de p97: aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, α -galactosidasa A, ceramidasa ácida, α -L-fucosidasa, β -hexosaminidasa A, deficiencia de la proteína activadora de GM2, α -D-manosidasa, β -D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, α -N-acetilglucosaminidasa, fosfotransferasa, subunidad y de la fosfotransferasa, L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA:N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas múltiples, palmitoil-proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, tráfico de colesterol, catepsina K, α -galactosidasa B, transportador de ácido siálico. En algunas realizaciones, el agente es una proteína de secuencia, origen o derivación humana o de mamífero. La proteína o el fragmento p97 también pueden ser de secuencia, origen o derivación humana o de mamífero.

Breve descripción de los dibujos

Las figuras 1A-1D representan neuronas hNT humanas (derivados de teratocarcinoma humano) teñidas con anticatapsina L y el anticuerpo monoclonal L235 contra p97 (para más detalles véase el ejemplo 1).

Las figuras 2A-2C representan neuronas vivas alimentadas con Alexa Fluor 594-p97 y LysoSensor Green (para más detalles véase el ejemplo 2).

Descripción detallada de la invención

I. INTRODUCCIÓN

La presente memoria descriptiva da a conocer en términos generales métodos y composiciones para mejorar la administración de los agentes relacionadas con las enfermedades de almacenamiento lisosómico a los lisosomas de las células afectadas por una enfermedad de almacenamiento lisosómico. La invención se refiere al sorprendente descubrimiento de que las proteínas MTf o p97 y los fragmentos de las mismas no solo son capaces de realizar la transcitosis a través de la barrera hematoencefálica, sino que también se transportan a los lisosomas. Como resultado, las moléculas de p97 que son vehículos demostrados para la administración de agentes a través de la barrera hematoencefálica sorprendentemente también resultan particularmente útiles como medio de administración de proteínas o enzimas deficientes a los lisosomas para el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico resultantes de tales deficiencias.

Los agentes conjugados de la presente memoria descriptiva ofrecen muchas ventajas importantes en el tratamiento de las enfermedades de almacenamiento lisosómico. La MTf o p97 es un compuesto natural que se encuentra normalmente en las células humanas a diferentes niveles. Debido a que p97 es una proteína natural de los seres humanos, es poco probable que desencadene una hiperreactividad inmunológica, como ocurre con frecuencia con el uso de terapias con anticuerpos monoclonales, lo que hace que no resulten adecuadas para su uso en inyecciones repetidas.

En cuanto a la administración de fármacos, el sistema de p97 puede cruzar la barrera hematoencefálica rápidamente (en el plazo de una hora), y se metaboliza en 12 horas, por lo que se elimina de manera eficiente de los tejidos. Estas características ofrecen la oportunidad de realizar inyecciones repetidas sin saturación de los receptores. Por otra parte, p97 no compite con la transferrina endógena, cuya cantidad se estima que es 10.000 veces mayor que la p97 sérica. Por consiguiente, la transferrina no competirá con el método de administración de agentes terapéuticos mediante unión covalente o de otro tipo a p97. La proteína p97 muestra poca o ninguna toxicidad. La proteína p97 es biodegradable y no se mantiene en la circulación durante períodos prolongados. La proteína tiene una capacidad demostrada para cruzar la BHE y, debido a su afinidad por las células endoteliales que recubren el lecho vascular del cerebro, el vector p97 es particularmente útil para administrar un agente conjugado o unido de otro modo a los lisosomas situados dentro del tejido cerebral.

II. DEFINICIONES

A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado entendido comúnmente por un experto en la materia a la que pertenece esta invención.

Debe apreciarse que, tal y como se utiliza en la memoria descriptiva y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares «un», «una», «el» y «la» incluyen los referentes plurales, a menos que el contexto indique claramente lo contrario.

La MTf o p97 incluye p97 unida a la membrana (es decir, p97 unida a un anclaje GPI o algún otro anclaje), p97 secretada, p97 soluble, p97 escindida, análogos de p97 que son equivalentes funcionales de p97 (que tienen una homología de sus secuencias de aminoácidos correspondientes generalmente mayor que el 40 %, el 60 %, el 80 %,

- el 90 % o el 95 %, e incluyendo las variantes alélicas de p97), p97 de humano, ratón, pollo y/o conejo, y derivados, partes o fragmentos de los mismos. La p97 se puede presentar en forma de sales ácidas o básicas, o en su forma neutra. Además, se pueden modificar los residuos de aminoácidos individuales, como por ejemplo por oxidación o reducción. Por otra parte, se pueden hacer diversas sustituciones, eliminaciones o adiciones a la secuencias de aminoácidos o de ácidos nucleicos, cuyo efecto neto es retener o mejorar la actividad biológica deseada de p97. Debido a la degeneración del código, por ejemplo, puede existir una variación considerable en las secuencias de nucleótidos que codifican para la misma secuencia de aminoácidos. Una caracterización adicional de la p97, incluida la secuencia completa de aminoácidos de p97, se encuentra en la patente de EE.UU. nº 5981194.
- Un fragmento de p97, como se usa en este documento, incluye cualquier parte de p97 o sus análogos biológicamente equivalentes, que contiene una parte suficiente de p97 para que pueda unirse al receptor de la MTf o LRP1 o LRP1B y ser transportado a través de la barrera hematoencefálica; o que de otro modo conserva o mejora las actividades biológicas deseadas de p97 en la transcitosis y/o la administración de un agente al lisosoma.
- Se encontrarán explicaciones adicionales sobre la fabricación y el uso de p97 como agentes de diagnóstico y terapéuticos en la solicitud internacional nº PCT/CA93/00272 y en la patente de EE.UU. nº 5981194.
- «Modular», como se usa en esta invención, se refiere a la capacidad de alterar, mediante aumento o disminución (por ejemplo, para actuar como un antagonista o agonista).
- «Receptor de la melanotransferrina» («MTf-R»), tal como se usa en este documento, se refiere a cualquier sistema biológico que se une específicamente o preferentemente a la MTf. Se pretende que este término incluya aquellos receptores que se unen competitivamente a la proteína Lf y/o β -amiloide, pero excluye aquellos receptores que son específicos para la Tf, tal como el receptor de la transferrina (Tf-R) (que se describe en la entrada 190010 del Proyecto de Herencia Mendeliana en el Hombre, OMIM, y que también se conoce como TGF, TRFR y CD71). Un receptor conocido por unirse específicamente o preferentemente a la Lf se denomina en este documento un «receptor de la lactotransferrina» (Lf-R). Entre los Lf-R conocidos se incluyen, aunque no en sentido limitativo, los receptores relacionados con las LDL. Un receptor relacionado con las LDL conocido es la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas/el receptor de la alfa 2-macroglobulina («LRP1»). El término MTf-R incluye específicamente otros receptores que se encuentran en las células endoteliales y que se unen específicamente tanto a MTf como a Lf, pero no a Tf. En una realización preferente, el MTf-R es el LRP1. En una realización más preferente, el MTf-R es el LRP1B.
- Los miembros de la familia del receptor de lipoproteínas de baja densidad (LDL) incluyen LDL-R (132 kDa); LRP/LRP1 y LRP1B (600 kDa); megalina ((LRP2), 600 kDa); VLDL-R (130 kDa); ER-2 (LRP-8, 130 kDa); LDL-R mosaico (LR11, 250 kDa); y otros miembros como LRP3, LRP6 y LRP-7. Los rasgos característicos de la familia de LDL-R incluyen expresión de la superficie celular; repeticiones del dominio de unión al ligando extracelular (DxSDE); necesidad de Ca^{++} para la unión del ligando; reconocimiento de RAP y ApoE; repeticiones del dominio de homología del precursor de EGF (YWTD); región con un solo segmento transmembranal; señal de internalización en el dominio citoplásmico (FDNPXY); y endocitosis mediada por receptor de diversos ligandos.
- LRP se refiere a la proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad y a los miembros de esta familia de receptores. La LRP es una gran proteína de 4525 aminoácidos (600 kDa) que se escinde por furina para producir dos subunidades de 515-(α) and 85-(β) kDa que permanecen unidas no covalentemente. La LRP se expresa principalmente en el hígado, el riñón, las neuronas, el sistema nervioso central, la BHE, las células del músculo liso y diversas células cultivadas.
- El ligando LRP se refiere a un número de moléculas conocidas por unirse a la LRP. Estas moléculas incluyen, por ejemplo, lactoferrina, RAP, lipoproteína lipasa, ApoE, factor VIII, precursor de β -amiloide, α 2-macroglobulina, trombospondina 2 MMP 2, MPP-9-TIMP-1; uPA:PAI-1:uPAR; y tPA:PAI-1:uPAR.
- La LRP 1B es un miembro recientemente descubierto de la familia de receptores de lipoproteínas de baja densidad. Es un receptor de la superficie celular multifuncional de 600 kDa. Véase Liu y cols., J. Biol. Chem. 276 (31):28889-28896 (2001). Véase también Liu y cols, Genomics 69, 271-274 (2000); y Liu y cols., Cancer Res. 60, 1961-1967 (2000). Este receptor está más estrechamente relacionado con la LRP que la megalina y comparte una homología del 59 % a nivel del ADNc y una homología del 52 % a nivel de los aminoácidos predichos. El gen LRP 1B se expresa en el cerebro, y las glándulas tiroideas y salivales. Los ligandos conocidos para el LRP 1B incluyen RAP, tPA, PAI-1.
- LRP1B de ratón es accesible a través de los números de acceso a GenBank XM 143023 XM 130241. LRP1B de humano es accesible a través del número de acceso a GenBank XM 015452.
- «Proteína relacionada con el receptor de lipoproteínas / receptor de la alfa 2-macroglobulina» («LRP1»), tal como se utiliza en este documento, se refiere a un receptor multifuncional. Se cree que es una agrupación de tipo rica en cisteína. Una repetición de unión, que se asemeja a las encontradas en el receptor de LDL, es el principio molecular de la capacidad de unión a una variedad de ligandos que previamente se pensaba que no guardaban relación: alfa-

2-macroglobulina activada, apolipoproteína E, lipoproteína lipasa, activadores del plasminógeno y complejos con su inhibidor (PA y PA/PAI-1), lipoproteína (a), exotoxina A de Pseudomonas, rinovirus humano, Lf y la denominada proteína asociada al receptor (RAP). Véase Meilinger, y cols., FEBS Let., 360:70-74 (1995). LRPI es accesible a través del número de acceso a GenBank X 13916 y del número de acceso primario a Swiss-Prot Q07954. Los nombres alternativos para el gen/proteína LRP1 incluyen: proteína 1 relacionada con el receptor de lipoproteínas de baja densidad [precursora], LRP, receptor de la alfa-2-macroglobulina, A2MR, receptor de la apolipoproteína E, APOER, CD91, LRP1 o A2MR.

Un «conjugado de p97» se refiere a una composición que comprende p97 o un fragmento de la mismo, conjugado covalentemente a un agente. La conjugación puede ser directa o indirecta (es decir, a través de un enlazador extendido), siempre y cuando se trate de una conjugación química. La construcción general de la composición de la memoria descriptiva se muestra en la figura 3.

El agente puede tener un fin terapéutico o profiláctico en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico en los mamíferos, y en particular, en los seres humanos.

«Mayor administración relativa», tal como se utiliza en este documento, se refiere al efecto por el cual la acumulación en los lisosomas de un agente conjugado de p97 se incrementa en relación con la acumulación del agente original.

«Índice terapéutico» se refiere al intervalo posológico (cantidad y/o frecuencia) por encima de la cantidad terapéutica mínima y por debajo de una cantidad inaceptablemente tóxica.

«Dosis equivalente» se refiere a una dosis que contiene la misma cantidad de agente activo.

El conjugado de p97-agente puede comprender uno o más restos del agente (por ejemplo, entre 1 y 10 o entre 1 y 4 o entre 2 y 3 restos) unidos a p97. Por ejemplo, las reacciones de conjugación pueden conjugar entre 1 y 4 o más moléculas de alfa-L-iduronidasa a una sola molécula de p97. Estas formulaciones se pueden emplear como mezclas o se pueden purificar para dar formulaciones p97:agente (mol:mol) específicas. Los expertos en la materia son capaces de determinar el formato y la proporción mol:mol preferentes. Además, se pueden unir mezclas de agentes a p97 para facilitar una degradación más completa de los sustratos almacenados. Estos agentes-p97 puede comprender un intervalo de proporciones mol:mol. Asimismo, estos se pueden separar en mezclas purificadas o se pueden utilizar en forma agregada.

Los agentes conjugados de p97 pueden entrar en, o ser transportados hacia, o terminar residiendo en, los lisosomas de una célula dentro o fuera del SNC. La velocidad de paso del agente conjugado se puede modular mediante cualquier compuesto o proteína que pueda modular la actividad de un receptor de la MTf. Los métodos para la identificación o determinación de un modulador de este tipo se describen en la solicitud provisional de patente de EE.UU. nº 60/308002 y la solicitud de patente de EE.UU. nº 10/206448, presentada el 25 de julio de 2002. La célula puede ser de cualquier sistema de tejidos u órganos afectado por la enfermedad de almacenamiento lisosómico. La célula puede ser, por ejemplo, una célula endotelial, epitelial, muscular, cardíaca, ósea, pulmonar, de grasa, renal o hepática. En algunas realizaciones, la célula es preferentemente una célula que se encuentra dentro de la BHE. En algunas realizaciones, la célula es una neurona o una célula cerebral. En otras realizaciones, la célula es una célula de la periferia o una que no está aislada de la circulación general por un endotelio, tal como el de la BHE.

El agente puede ser una proteína o una enzima o cualquier fragmento de estas que aún conserva parte, sustancialmente toda o la totalidad de la actividad de la enzima. En algunas realizaciones, la proteína o enzima es una que, si no se expresa o se produce, o si se reduce sustancialmente su expresión o producción, daría lugar a una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Preferentemente, la proteína o la enzima se deriva o se obtiene a partir de un humano o de ratón. En algunas realizaciones, en el tratamiento de las EAL humanas, el conjugado de p97-agente comprende una proteína o enzima que es deficiente en la enzima de almacenamiento lisosómico deficiente en el sujeto o paciente a tratar. Tales enzimas, incluyen, por ejemplo, α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, alfa-glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida, α -galactosidasa o cualquier otra enzima de almacenamiento lisosómico. A continuación se incluye una tabla de enfermedades de almacenamiento lisosómico y las proteínas deficientes:

| Enfermedad de almacenamiento lisosómico | Deficiencia de proteína |
|---|-----------------------------------|
| Mucopolisacaridosis de tipo I | L-iduronidasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo II / síndrome de Hunter | Iduronato-2-sulfatasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IIIA / síndrome de Sanfilippo | Heparán-N-sulfatasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IIIB / síndrome de Sanfilippo | α -N-Acetilglucosaminidasa |

| | |
|---|--|
| Mucopolisacaridosis de tipo IIIC / síndrome de Sanfilippo | Acetil-CoA:N-acetiltransferasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IIID / síndrome de Sanfilippo | N-acetilglucosamina 6-sulfatasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IVA / síndrome de Morquio | Galactosa 6-sulfatasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IVB / síndrome de Morquio | β -galactosidasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo VI | N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo VII / síndrome de Sly | β -glucuronidasa |
| Mucopolisacaridosis de tipo IX | Hialuronoglucosaminidasa |
| Aspartilglucosaminuria | Aspartilglucosaminidasa |
| Enfermedad de almacenamiento de ésteres de colesterol / enfermedad de Wolman | Lipasa ácida |
| Cistinosis | Transportador de cistina |
| Enfermedad de Danon | Lamp-2 |
| Enfermedad de Fabry | α -galactosidasa A |
| Lipogranulomatosis de Farber / enfermedad de Farber | Ceramidasa ácida |
| Fucosidosis | α -L-fucosidasa |
| Galactosialidosis de tipo I/II | Proteína protectora |
| Enfermedad de Gaucher de tipo I/II/III | Glucocerebrosidasa (β -glucosidasa) |
| Leucodistrofia de las células globoides / enfermedad de Krabbe | Galactocerebrosidasa |
| Enfermedad de almacenamiento de glucógeno (glucogenosis) II / enfermedad de Pompe | α -glucosidasa |
| Gangliosidosis GM1 de tipo I/II/III | β -galactosidasa |
| Gangliosidosis GM2 de tipo I / enfermedad de Tay Sachs | β -hexosaminidasa A |
| Gangliosidosis GM2 de tipo II / enfermedad de Sandhoff | β -hexosaminidasa A |
| Gangliosidosis GM2 | Deficiencia de proteína activadora de GM2 |
| α -manosidosis de tipo I/II | α -D-manosidasa |
| β -manosidosis | β -D-manosidasa |
| Leucodistrofia metacromática | Arilsulfatasa A |
| Leucodistrofia metacromática | Saposina B |
| Mucopolipidosis de tipo I / sialidosis de tipo I/II | Neuraminidasa |
| Mucopolipidosis de tipo II/III / enfermedad de células I | Fosfotransferasa |
| Mucopolipidosis de tipo IIIC / polidistrofia pseudo-Hurler | Subunidad γ de la fosfotransferasa |
| Deficiencia múltiple de sulfatasas | Sulfatasas múltiples |
| Ceroidolipofuscinosis neuronales, enfermedad de Batten CLN1 | Palmitoil-proteína tioesterasa |
| Ceroidolipofuscinosis neuronales, enfermedad de Batten CLN2 | Tripeptidil peptidasa I |
| Enfermedad de Niemann-Pick de tipo A / enfermedad de Niemann-Pick de tipo B | Esfingomielinasa ácida |
| Enfermedad de Niemann-Pick de tipo C1 | Tráfico de colesterol |
| Enfermedad de Niemann-Pick de tipo C2 | Tráfico de colesterol |
| Picnodisostosis | Catepsina K |
| Enfermedad de Schindler de tipo I/II | α -galactosidasa B |
| Enfermedad de almacenamiento de ácido siálico | Transportador de ácido siálico |

5 La melanotransferrina o p97 y el agente se conjugan directa o indirectamente entre sí (es decir, a través de un enlazador extendido). El enlazador puede comprender un enlace covalente o un péptido de virtualmente cualquier secuencia de aminoácidos o cualquier molécula capaz de conjugarse con la melanotransferrina o p97 y el agente. Si el enlazador es un enlace covalente o un péptido, entonces todo el conjugado puede ser una proteína de fusión. Tales proteínas de fusión se pueden producir mediante métodos de ingeniería genética recombinante conocidos

para un experto en la materia.

El conjugado p97-enzima de acuerdo con la memoria descriptiva se puede modificar como se desee para mejorar sus propiedades de estabilidad o farmacocinéticas (por ejemplo, PEGilación).

5

III. COMPOSICIONES Y SU PREPARACIÓN

En general, los conjugados de p97 se pueden preparar usando técnicas bien conocidas en la técnica. Se puede optar entre numerosos planteamientos para la conjugación o reticulación química de los agentes a un polipéptido tal como p97, y un experto en la materia puede determinar qué método es el más adecuado para la conjugación de un agente particular. El método empleado debe ser capaz de unir el agente con la p97 sin interferir con la capacidad de la p97 para unirse a su receptor, preferentemente sin influir en la biodistribución del agente-p97 en comparación con la p97 sola, y/o sin alterar significativamente la actividad deseada del agente (ya sea terapéutica o profiláctica o similar) una vez administrado. Los métodos preferentes para conjugar la p97 a diversos agentes se describen más adelante en el apartado de ejemplos. Un método particularmente preferente para unir moléculas complejas a la p97 es la reacción de reticulación de SATA/sulfo-SMCC (Pierce (Rockford, IL)).

10

15

Los métodos para la reticulación de proteínas y péptidos son bien conocidos por los expertos en la materia. Existen varios cientos de agentes de reticulación para la conjugación de un compuesto de interés con la p97 o con una sustancia que se una a la p97 (véase, por ejemplo, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor (1991) y la patente de EE.UU. nº 5981194 y las publicaciones PCT de patente nº WO 02/13843 y WO 01/59459. Se puede utilizar muchos reactivos y agentes de reticulación para preparar conjugados de un agente activo y una molécula de p97. Véase, por ejemplo, Hermanson, GT y cols. Bioconjugate Techniques, Academic Press, (1996). El agente de reticulación se elige generalmente basándose en los grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en el agente terapéutico. Además, si no hay grupos reactivos, se puede utilizar un agente de reticulación fotoactivable. En ciertos casos, puede ser deseable incluir un separador entre la p97 y el agente. En una realización, la p97 y los agentes terapéuticos proteínicos se pueden conjugar mediante la introducción de un grupo sulfhidrilo en la p97 y mediante la introducción de un agente de reticulación que contiene un grupo tiol reactivo en el compuesto proteínico a través de grupos carboxilo (Wawizynczak y Thorpe en Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer, Vogel (Ed.) Oxford University Press, págs. 28-55 (1987); y Blair y Ghose (1983) J. Immunol. Methods 59:129). En algunas realizaciones, el enlazador es vulnerable a la hidrólisis en el pH ácido del lisosoma para liberar el agente de la p97 y/o del enlazador.

20

25

30

En algunas realizaciones de la presente memoria descriptiva, el conjugado de p97-agente es una proteína de fusión-p97. Las proteínas de fusión se pueden preparar usando técnicas estándar conocidas en la técnica. Típicamente, una molécula de ADN que codifica para la p97 o una parte de la misma está unida a una molécula de ADN que codifica para el compuesto proteínico. La construcción de ADN quimérico, junto con elementos reguladores adecuados, se puede clonar en un vector de expresión y expresar en un huésped adecuado. Las proteínas de fusión resultantes contienen la p97 o una parte de la misma usado para el compuesto proteínico seleccionado.

35

40

Cuando se utiliza un enlazador, el enlazador es preferentemente un resto orgánico construido para contener una cadena principal alquilo, arilo y/o de aminoácidos, y que contiene un enlace de tipo amida, éter, éster, hidrazona, disulfuro o cualquier combinación de los mismos. Los enlaces que contienen componentes unidos de tipo aminoácido, éter y amida son estables en condiciones de pH fisiológico, normalmente 7,4 en suero. Los enlaces preferentes son los que contienen ésteres o hidrazonas que son estables al pH del suero, pero que se hidrolizan para liberar el fármaco cuando se exponen al pH lisosómico. Los enlaces disulfuro son preferentes porque son sensibles a la escisión reductora. Además, los enlazadores de aminoácidos pueden estar diseñados de manera que sean sensibles a la escisión por enzimas específicas en el órgano diana deseado o, más preferentemente, en el propio lisosoma. Se describen ejemplos de enlazadores en Blattler y cols. (1985) Biochem. 24:1517-1524; King y cols. (1986) Biochem. 25:5774-5779; Srinivasachar y Nevill (1989) Bio chem. 28:2501-2509.

45

50

En algunas realizaciones, el enlazador es un polietilenglicol o polipropilenglicol. En otras realizaciones, el enlazador tiene una longitud comprendida entre 4 y 20 átomos. En otras realizaciones, el enlazador tiene una longitud comprendida entre 1 y 30 átomos, con átomos de carbono de la cadena que pueden estar sustituidos por heteroátomos seleccionados independientemente entre el grupo compuesto por O, N o S. En algunas realizaciones, entre 1 y 4 o entre 5 y 15 de los átomos de C están sustituidos por un heteroátomo seleccionado independientemente entre O, N, S. En otras realizaciones, el enlazador contiene un resto sujeto a la hidrólisis tras la administración al entorno lisosómico (por ejemplo, susceptible a la hidrólisis en el pH lisosómico o al entrar en contacto con una enzima lisosómica). En algunas realizaciones, el grupo enlazador es preferentemente hidrófilo para mejorar la solubilidad del conjugado en los líquidos corporales. En algunas realizaciones, el enlazador contiene o está unido a la molécula de p97 o al agente proteínico por un grupo funcional sujeto al ataque de otras enzimas lisosómicas (por ejemplo, enzimas no deficientes en el lisosoma diana o una enzima lisosómica no conjugada con el vehículo de p97). En algunas realizaciones, la p97 y el agente están unidos por un enlazador que comprende residuos de aminoácidos o péptidos, lípidos o azúcar. En algunas realizaciones, la p97 y el agente se unen en grupos introducidos sintéticamente o mediante modificaciones posteriores a la traducción.

55

60

65

En algunas realizaciones, los compuestos intermedios de agente-enlazador son similares a lo que se ha descrito anteriormente, pero comprenden, por ejemplo, un éster activo que puede reaccionar con grupos amina libres de la p97 o una maleimida que pueden reaccionar con los tioles libres creados en la p97 a través de una reacción SATA o a través de otros grupos que los expertos en la materia pueden unir a la p97.

5

A. Preparación de la p97

El péptido o molécula p97 para su uso en los métodos y las composiciones de la presente invención se pueden obtener, aislar o preparar a partir de una variedad de orígenes.

10

En un aspecto, se pueden usar técnicas estándar de ADN recombinante para preparar la p97 o derivados de la misma. En una realización, el ADN que codifica para la p97 se puede obtener mediante amplificación por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, *polymerase chain reaction*) de la secuencia de la p97 (véase, en general, las patentes de EE.UU. n° 4683202, n° 4683195 y n° 4800159; véase, también, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (ed.), Stockton Press (1989)). Brevemente, el ADN bicatenario procedente de células que expresan p97 (por ejemplo, células SK-MEL-28) se desnaturaliza por calentamiento en presencia de Taq polimerasa termoestable, cebadores de ADN de secuencias específicas, tales como 5' GCGGACTTCCTCGG 3' (SEQ ID N° 1) y 5' TCGCGAGCTTCCT 3' (SEQ ID N° 2), ATP, CTP, GTP y TTP. Se produce ADN bicatenario cuando la síntesis es completa. Este ciclo puede repetirse muchas veces, dando como resultado una amplificación factorial del ADN de p97. A continuación, el ADN de la p97 amplificado se puede insertar fácilmente en un vector de expresión como se describe a continuación.

15

20

Alternativamente, el ADN que codifica para la p97 se puede aislar usando las técnicas de clonación descritas por Brown y cols. en la solicitud de patente del Reino Unido n° GB 2188637. Los clones que contienen secuencias que codifican para ADNc de la p97 se han depositado en la colección americana de cultivos tipo (ATCC, *American Type Culture Collection*) con los números de depósito CRL 8985 (PMTp97b) y CRL 9304 (pSVp97a).

25

Dentro de una realización de la presente invención, se dan a conocer derivados truncados de p97. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al locus se puede realizar con el oligonucleótido WJ31 5'CTCAGAGGGCCGCTGCGCCC-3' (SEQ ID N° 3) con el fin de eliminar el dominio hidrófobo C-terminal más allá del nucleótido 2219 o con el oligonucleótido WJ32 5' CCA GCG CAG CTAGCGGGGGCAG 3' (SEQ ID N° 4) con el fin de introducir un locus Nhe I y un codón de parada en la región de los nucleótidos 1146-166 y, de esa manera, construir también una forma truncada de la p97 que comprenda solo el dominio N-terminal. De igual manera, la mutagénesis también se puede realizar en p97 de tal manera que solo se exprese el dominio C-terminal. En una realización, los sitios Xho se insertan mediante mutagénesis con el oligonucleótido WJ 5'-ACACCAGCGCAGCTCGAGGGGCAGCCG 3' (SEQ ID N° 5) en ambos dominios N-terminal y C-terminal, lo que permite la posterior eliminación del dominio N-terminal. En el contexto de la presente invención también se pueden utilizar otras diversas enzimas de restricción, tales como, por ejemplo, Eco RI, con el fin de construir derivados por eliminación o truncamiento de la p97.

30

35

Es posible introducir mutaciones en locus particulares sintetizando oligonucleótidos que contengan una secuencia mutante, flanqueada por sitios de restricción que permitan la ligación de los fragmentos mutados a fragmentos de la secuencia nativa. Después de la ligación, la secuencia reconstruida resultante codifica para un derivado que tiene la inserción, sustitución o eliminación de aminoácidos deseada. Alternativamente, como se señaló anteriormente, se pueden emplear procedimientos de mutagénesis específica de locus dirigida por oligonucleótidos para obtener un gen alterado que contenga codones particulares alterados de acuerdo con la sustitución, eliminación o inserción deseada. Ejemplos de métodos para realizar las alteraciones expuestas anteriormente se describen en el documento de Sambrook y cols. *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989).

40

45

Dentro de una realización particularmente preferente de la invención, la p97 se clona en un vector de expresión como un ADNc truncado con una eliminación de la secuencia de anclaje GPI situada en el extremo carboxílico de la proteína.

50

Brevemente, el gen p97 puede ser generado mediante una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) usando el ADNc de la p97 clonado como plantilla. La p97 truncada se sintetiza usando WJ47, el cebador 5' de PCR que abarca las coordenadas 36 a 60 (coordenadas basadas en el mapa de ADNc) y que contiene adicionalmente un sitio de restricción Sna BI. La secuencia de WJ47 es 5'-GCG CTA CGT ACT CGA GGC CCC AGC CAG CCC CGA CGG CGC C-3' (SEQ ID N° 6). El cebador 3', WJ48, comprende las coordenadas 2172 a 2193 y, además, contiene tanto un codón de terminación TGA como un sitio de restricción Sna BI. La secuencia de ADN de WJ48 es 5'-CGC GTA CGT ATG ATC ATC AGC CCG AGC ACT GCT GAG ACG AC-3' (SEQ ID N° 7). Después de la amplificación, el producto de p97 truncado se inserta en pNUTΔH (obtenido de Palmiter (1986) PNAS 83:1261-1265) en el sitio de restricción Sma I. Las orientaciones de los plásmidos resultantes se pueden determinar por PCR utilizando un oligonucleótido de cebado que se hibrida con la secuencia del vector y un segundo oligonucleótido de cebado que se hibrida con la secuencia del inserto. Alternativamente, se pueden realizar digestiones de restricción apropiadas para verificar la orientación. La expresión de la secuencia amplificada se traduce en la producción de una proteína p97 soluble que carece del dominio hidrófobo.

60

65

Como se señaló anteriormente, la presente memoria descriptiva da a conocer vectores de expresión recombinantes que incluyen fragmentos de ADN sintético o derivados de ADNc que codifican para la p97 o derivados de la misma, que se unen operativamente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados. Los elementos reguladores adecuados se pueden derivar de una variedad de fuentes, incluidas, aunque no en sentido limitativo, genes bacterianos, fúngicos, virales, de mamíferos y de insectos. La selección de los elementos reguladores apropiados depende de la célula huésped elegida, y un experto en la materia podrá llevar a cabo fácilmente esta selección. Los ejemplos de elementos reguladores incluyen, en particular, un promotor y potenciador de la transcripción o una secuencia de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de iniciación de la traducción. Además, dependiendo de la célula huésped elegida y el vector empleado, se pueden incorporar en el vector de expresión otros elementos genéticos, tales como un origen de replicación, sitios de restricción, potenciadores y secuencias de ADN adicionales que confieran inducibilidad de transcripción, y marcadores seleccionables.

Las secuencias de ADN que codifican para la p97 pueden ser expresadas por una amplia variedad de células huésped procariotas y eucariotas, incluidas, aunque no en sentido limitativo, células bacterianas, de mamífero, de levaduras, fúngicas, virales, de plantas y de insectos. Los métodos para transformar o transfectar tales células para la expresión de ADN exógeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Itakura y cols., patente de EE.UU. nº 4704362; Hinnen y cols. (1978) PNAS USA 75:1929-1933; Murray y cols., patente de EE.UU. nº 4801542; Upshall y cols., patente de EE.UU. nº 4935349; Hagen y cols., patente de EE.UU. nº 4784950; Axel y cols., patente de EE.UU. nº 4399216; Goeddel y cols., patente de EE.UU. nº 4766075; y Sambrook y cols., véase más arriba).

Los expertos en la materia dominan fácilmente los promotores, los terminadores y los métodos para introducir vectores de expresión de un tipo apropiado en, por ejemplo, células de plantas, aviares y de insecto. Dentro de una realización particularmente preferente de la memoria descriptiva, la p97 se expresa a partir de baculovirus (véase, por ejemplo, Luckow y Summers (1988) BioTechnology 6:47; Atkinson y cols. (1990) Petic. Sci. 28:215-224). El uso de baculovirus tales como AcMNPV es particularmente preferente, ya que las células de insectos huésped expresan las formas escindidas en GPI de la p97. La p97 se puede preparar a partir de cultivos de los sistemas huésped/vector descritos anteriormente que expresan la p97 recombinante. La p97 producida de forma recombinante se puede purificar adicionalmente como se describe con más detalle a continuación.

La forma soluble de p97 se puede preparar mediante el cultivo de células que contienen la p97 soluble durante la fase logarítmica de crecimiento celular y recogiendo el sobrenadante. Preferentemente, se recoge el sobrenadante antes del momento en el que las células pierdan viabilidad. Entonces, la p97 soluble se puede purificar como se describe a continuación, con el fin de obtener p97 soluble aislada. Los métodos adecuados para la purificación de la p97 soluble se pueden seleccionar basándose en la propiedad hidrófila de la p97 soluble. Por ejemplo, la p97 soluble se puede obtener fácilmente por separación de fases en Triton X-114.

En otra realización, la p97 se puede aislar a partir de células CHO cultivadas, modificadas genéticamente para expresar la p97 anclada a GPI. La proteína anclada a GPI se puede recolectar tras una breve incubación con una enzima capaz de escindir el anclaje GPI. Tales enzimas son conocidas en la técnica (Ferguson (1988) Ann. Rev. Biochem. 57:285-320) y más arriba se describen los ejemplos representativos. La proteína soluble escindida se puede recuperar del medio y, seguidamente, las células se pueden devolver al medio de crecimiento para una expresión adicional de la proteína. Los ciclos de crecimiento y recolección se pueden repetir hasta obtener cantidades suficientes de la proteína. Una enzima GPI particularmente preferente es la fosfolipasa C (PI-PLC), que se puede obtener a partir de fuentes bacterianas (véase Low, «Phospholipase Purification and Quantification», The Practical Approach Series: Cumulative Methods Index, Rickwood and Hames, eds. IRC Press, Oxford, NY (1991); Kupe y cols. (1989) Eur. J. Biochem. 185:151-155; Volwerk y cols. (1989) J. Cell. Biochem. 39:315-325) o de fuentes recombinantes (Koke y cols. (1991) Protein Expression and Purification 2:51-58; y Henner y cols. (1986) Nuc. Acids Res. 16:10383).

La p97 y derivados de la misma, incluyendo la p97 soluble, se pueden purificar fácilmente de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento. Brevemente, la p97 se puede purificar a partir de sobrenadantes que contengan p97 solubilizada o de sistemas de huésped/vector cultivados según lo descrito anteriormente. Para purificar la p97, se puede utilizar una variedad de etapas de purificación, usadas solas o en combinación. Por ejemplo, los sobrenadantes obtenidos mediante la solubilización de la p97 o a partir de los cultivos huésped/vector según lo descrito anteriormente, se pueden concentrar fácilmente utilizando filtros de concentración de proteínas disponibles comercialmente, tales como una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon o por «precipitación salina» (*salting out*) de la proteína seguida de diálisis. Además, los sobrenadantes o concentrados se pueden aplicar a una matriz de purificación por afinidad tal como un anticuerpo anti-p97 unido a un soporte adecuado. De manera alternativa, se puede emplear una resina de intercambio de aniones, tal como una matriz o sustrato que tenga grupos colgantes de dietilaminoetil (DEAE). Las matrices representativas incluyen acrilamida, agarosa, dextrano, celulosa u otros tipos comúnmente empleados en la purificación de proteínas. De la misma manera, también se pueden usar intercambiadores de cationes que utilicen diversas matrices insolubles, tales como grupos sulfopropilo o carboximetilo.

Finalmente, pueden emplearse uno o más pasos de cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) que usan medios de RP-HPLC hidrófobos, por ejemplo, gel de sílice con grupos metilo u otros grupos alifáticos colgantes, para purificar adicionalmente la p97.

5 Los fragmentos de p97 también se pueden generar usando las técnicas descritas anteriormente, con modificaciones bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, vectores de expresión de p97 se pueden modificar de manera que la proteína expresada sea un fragmento deseado de la p97. Esta proteína se puede aislar a partir del sistema de expresión (es decir, extraída de las células) o tal vez se puede diseñar para que sea secretada en el sobrenadante del sistema de expresión y aislarse utilizando las técnicas descritas anteriormente. Alternativamente, se puede
10 generar y purificarla proteína p97 de longitud completa, y entonces es posible generar fragmentos de la p97 por reacciones de escisión diseñadas para generar el fragmento deseado. La síntesis química es una ruta alternativa para obtener la proteína p97 deseada o fragmentos de la misma.

15 En el contexto de la presente memoria descriptiva, «aislada» o «purificada», como se usan para definir la pureza de la p97, se refieren a una proteína que está sustancialmente exenta de otras proteínas de origen natural o endógeno, y que contiene menos de aproximadamente el 5 % y preferentemente menos de aproximadamente el 1 % en masa de contaminantes proteínicos originados durante los procesos de producción. Se puede considerar que la p97 está «aislada» si es detectable como una sola banda de proteína en SDS-PAGE, seguido de tinción con azul de Coomassie.

20 Producción de proteínas de fusión/quiméricas

La proteína quimérica de la presente memoria descriptiva se puede producir utilizando células huésped que expresan un único ácido nucleico que codifica para toda la proteína de fusión o más de una secuencia de ácido
25 nucleico, cada una de las cuales codifica para un dominio de la proteína quimérica y, opcionalmente, un aminoácido o aminoácidos que servirán para enlazar los dominios. Las proteínas quiméricas también se pueden producir mediante síntesis química.

30 A. Células huésped

Las células huésped utilizadas para producir proteínas quiméricas son células bacterianas, de levaduras, de insectos, de vertebrados no mamíferos o de mamíferos; entre las células de mamíferos se incluyen, aunque no en sentido limitativo, células de hámster, de mono, de chimpancé, de perro, de gato, bovinas, porcinas, de ratón, de rata, de conejo, de oveja y humanas. Las células huésped pueden ser células inmortalizadas (una estirpe celular) o
35 células no inmortalizadas (primarias o secundarias) y pueden ser cualquiera de una amplia variedad de tipos de células, tales como, aunque no en sentido limitativo, fibroblastos, queratinocitos, células epiteliales (por ejemplo, células epiteliales mamarias, células epiteliales intestinales), células de ovario (por ejemplo, células de ovario de hámster chino o CHO), células endoteliales, células gliales, células neurales, elementos formes de la sangre (por ejemplo, linfocitos, células de la médula ósea), células musculares, hepatocitos y precursores de estos tipos de
40 células somáticas.

Las células que contienen y expresan ADN o ARN que codifica para la proteína quimérica se denominan en este documento células modificadas genéticamente. Las células de mamíferos que contienen y expresan ADN o ARN que codifica para la proteína quimérica se denominan células de mamífero modificadas genéticamente. La
45 introducción del ADN o ARN en las células se realiza mediante un método de transfección conocidos, tal como electroporación, microinyección, bombardeo con microproyectiles, precipitación con fosfato de calcio, precipitación con fosfato de calcio modificado, tratamiento con lípidos catiónicos, fotoporación, metodologías de fusión, transferencia mediada por receptor o precipitación con polibreno. Alternativamente, el ADN o ARN se pueden introducir mediante infección con un vector viral. Los métodos para la producción de células, incluidas las células de mamífero, que expresan ADN o ARN que codifica para una proteína quimérica, se describen en las solicitudes de patente de EE.UU. en tramitación conjunta nº 08/334797, titulada «*In vivo* Protein Production and Delivery System for Gene Therapy» (Sistema de producción *in vivo* y administración de proteínas para la terapia génica), de Richard F Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentada el 4 de noviembre de 1994), en la solicitud de patente de EE.UU. nº 08/334455, titulada «*In vivo* Production and Delivery of Erythropoietin or Insulinotropin for Gene Therapy» (Sistema de producción *in vivo* y administración de eritropoyetina o insulínotropina para la terapia génica), de Richard F Selden, Douglas A. Treco y Michael W. Heartlein (presentada el 4 de noviembre de 1994), y en la solicitud de patente de EE.UU. nº 08/231439, titulada «Targeted Introduction of DNA Into Primary or Secondary Cells and Their Use for Gene Therapy» (Introducción dirigida de ADN en células primarias o secundarias y su uso para la terapia génica», de Douglas A. Treco, Michael W. Heartlein y Richard F Selden (presentada el 20 de abril de
50 1994).
55
60

B. Construcciones de ácidos nucleicos

Una construcción de ácido nucleico usada para expresar la proteína quimérica puede ser una que se exprese de forma extracromosómica (episomal) en la célula de mamífero transfectada o una que se integre, ya sea al azar o en un sitio diana preseleccionado a través de recombinación homóloga, en el genoma de la célula receptora. Una

construcción que se expresa de forma extracromosómica comprende, además de las secuencias que codifican para las proteínas quiméricas, las secuencias suficientes para la expresión de la proteína en las células y, opcionalmente, para la replicación de la construcción. Por lo general incluye un promotor, el ADN que codifica para la proteína quimérica y un sitio de poliadenilación. El ADN que codifica para la proteína quimérica se posiciona en la construcción de tal manera que su expresión se encuentre bajo el control del promotor. Opcionalmente, la construcción puede contener componentes adicionales, tales como uno o más de los siguientes: un sitio de empalme, una secuencia potenciadora, un gen marcador seleccionable bajo el control de un promotor apropiado, y un gen marcador amplificable bajo el control de un promotor apropiado.

En aquellas realizaciones en las que la construcción de ADN se integra en el genoma de la célula, solo es necesario incluir las secuencias de ácidos nucleicos que codifican para proteínas quiméricas. Opcionalmente, se puede incluir un promotor y una secuencia potenciadora, un sitio o sitios de poliadenilación, un sitio o sitios de empalme, secuencias de ácido nucleico que codifican para un marcador o marcadores seleccionables, secuencias de ácido nucleico que codifican para un marcador amplificable y/o ADN homólogo a ADN genómico en la célula receptora para dirigir la integración del ADN a un sitio seleccionado en el genoma (integración dirigida de ADN o secuencias de ADN).

C. Métodos de cultivo celular

Las células de mamíferos que contienen el ADN que codifica para la proteína quimérica o ARN se cultivan en condiciones apropiadas para el crecimiento de las células y la expresión del ADN o ARN. Aquellas células que expresan la proteína quimérica se pueden identificar, usando métodos conocidos y métodos descritos en este documento, y la proteína quimérica se puede aislar y purificar, usando métodos conocidos y métodos también descritos en este documento; ya sea con o sin amplificación de la producción de la proteína quimérica. La identificación puede llevarse a cabo, por ejemplo, mediante métodos de detección de las células de mamífero modificadas genéticamente que muestren un fenotipo indicativo de la presencia de ADN o ARN que codifica para la proteína quimérica, tales como detección por PCR, detección por análisis de transferencia de Southern o detección de la expresión de la proteína quimérica. La selección de células que han incorporado el ADN que codifica para la proteína quimérica se puede lograr mediante la inclusión de un marcador seleccionable en la construcción de ADN y el cultivo de células transfectadas o infectadas que contengan un gen marcador seleccionable en condiciones apropiadas para la supervivencia solamente de aquellas células que expresan el gen marcador seleccionable. Se puede conseguir una amplificación adicional de la construcción de ADN introducida mediante el cultivo de células de mamífero modificadas genéticamente en condiciones apropiadas para la amplificación (por ejemplo, el cultivo de células de mamífero modificadas genéticamente que contengan un gen marcador amplificable en presencia de una concentración de un fármaco en el que solo puedan sobrevivir las células que contengan múltiples copias del gen marcador amplificable). Las células de mamífero modificadas genéticamente que expresan la proteína quimérica se pueden identificar, como se describe en este documento, mediante la detección del producto de expresión. Por ejemplo, las células de mamífero que expresan la proteína quimérica en la que el portador es p97 se pueden identificar mediante un inmunoensayo enzimático de tipo sándwich. Los anticuerpos se pueden dirigir hacia la parte de la LPR o hacia la parte del agente activo.

B. Preparación de anticuerpos contra la p97

Sobre la base de las explicaciones de la presente memoria descriptiva, los anticuerpos contra la p97 humana o de ratón tienen muchos usos, incluidos, aunque no en sentido limitativo, el uso para el aislamiento y la purificación de la p97, el uso en la investigación y la identificación de la p97 tanto *in vitro* como *in vivo*, y posibles usos de diagnóstico (por ejemplo, seguimiento de los niveles de dosificación del conjugado) y terapéuticos (por ejemplo, modulación de los niveles de dosificación del conjugado de p97). Por consiguiente, resulta útil exponer brevemente los anticuerpos preferentes contra la p97 y los métodos de producción de tales anticuerpos.

Los anticuerpos reactivos contra la p97 son bien conocidos en la técnica. La presente memoria descriptiva da a conocer anticuerpos adicionales contra la p97. Entre los ejemplos representativos de los anticuerpos anti-p97 se incluye L235 (nº ATCC HB 8466; véase, Real y cols. (1985) *Cancer Res.* 45:4401-4411; véase también, Food y cols. (1994) *J. Biol. Chem.* 269(4): 3034-3040), 4.1, 8.2, 96.5 y 118.1 (véase, Brown y cols. (1981) *J. Immunol.* 127(2):539-546; y Brown y cols. (1981) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78(1):539-543); y HybC (Kennard y cols. (1996) *Nat. Med.* 2(11):1230-1235). Synapse Technologies Inc. ha generado otros anticuerpos monoclonales, incluyendo, aunque no en sentido limitativo, 2C7 y 9B6. Los anticuerpos contra la p97 de ratón incluyen, por ejemplo, un anticuerpo policlonal de conejo contra la p97 humana generado contra un fragmento de la p97 de ratón. En el contexto de la presente memoria descriptiva, se entiende que los anticuerpos incluyen, por ejemplo, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, Fab, y F(ab')₂) y pares de unión producidos de forma recombinante. Se entiende que los anticuerpos son reactivos contra la p97 si el K_a es mayor que o igual a 10⁻⁷ M.

Un experto en la materia puede generar fácilmente anticuerpos policlonales a partir de una variedad de animales de sangre caliente. Asimismo, se pueden generar fácilmente anticuerpos monoclonales mediante técnicas convencionales (véase, por ejemplo, las patentes de EE.UU. nº RE 32011, 4902614; 4543439; y 4411993; véase

también, Kennett, McKearn y Bechtol (eds.) *Monoclonal Antibodies, Hybridomas: A New Dimension in Biological Analyses*, Plenum Press, (1980); y Harlow y Lane (eds.) *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1988)). La preparación de los anticuerpos preferentes se describe adicionalmente más adelante en el apartado de ejemplos.

5

Marcadores

En algunas realizaciones, el conjugado de p97 está marcado para facilitar su detección. Un «marcador» o un «resto detectable» es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, por ejemplo, marcadores radiactivos (por ejemplo, ^{32}P), fluoróforos (por ejemplo, fluoresceína), reactivos de alta densidad electrónica, enzimas (por ejemplo, como las utilizadas habitualmente en un ELISA), biotina, digoxigenina o haptenos y proteínas que puedan hacerse detectables, por ejemplo, mediante la incorporación de un radiomarcador en el hapteno o péptido, o que se puedan utilizar para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o péptido.

Como se señaló anteriormente, dependiendo del ensayo de detección empleado, el agente, el enlazador o la parte de la molécula de p97 de un conjugado pueden estar marcados. El marcador o grupo detectable particular utilizado no es un aspecto crítico de la memoria descriptiva, siempre que no interfiera significativamente con la actividad biológica del conjugado. El grupo detectable puede ser cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Entre los ejemplos de marcadores adecuados para su uso en la presente invención se incluyen, aunque no en sentido limitativo, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina y similares), radiomarcadores (por ejemplo, ^3H , ^{125}I , ^{35}S , ^{14}C o ^{32}P), enzimas (por ejemplo, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y otras utilizadas habitualmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o vidrio coloreado o microesferas de plástico (por ejemplo, poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directamente o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el marcador en una realización se une covalentemente a la p97 utilizando un reactivo de isocianato para conjugar un agente activo de acuerdo con la memoria descriptiva. En un aspecto de la memoria descriptiva, los reactivos de isocianato bifuncionales de la memoria descriptiva se pueden utilizar para conjugar un marcador a la p97 para formar un conjugado de marcador-p97 sin un agente activo unido al mismo. El conjugado de marcador-p97 se puede utilizar como compuesto intermedio para la síntesis de un conjugado marcado de acuerdo con la memoria descriptiva o se puede utilizar para detectar el conjugado de p97. Como se indicó anteriormente, se puede utilizar una amplia variedad de marcadores, dependiendo de la elección del marcador de la sensibilidad requerida, de la facilidad de conjugación con el componente deseado del ensayo, de los requisitos de estabilidad, de la instrumentación disponible y de las condiciones de eliminación. Los marcadores no radiactivos normalmente se unen por medios indirectos. Generalmente, una molécula ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se une a otras moléculas (por ejemplo, estreptavidina), que son inherentemente detectables o están unidas covalentemente a un sistema de señalización, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente o un compuesto quimioluminiscente.

Los conjugados también se pueden conjugar directamente a compuestos generadores de señales, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Entre las enzimas adecuadas para su uso como marcadores se incluyen, aunque no en sentido limitativo, hidrolasas, en particular fosfatasas, esterasas y glicosidasas, u oxidotases, en particular peroxidasas. Entre los compuestos fluorescentes, es decir, fluoróforos, adecuados para uso como marcadores se incluyen, aunque no en sentido limitativo, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansilo, umbeliferona, etc. Otros ejemplos de fluoróforos adecuados incluyen, aunque no en sentido limitativo, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo de acridina, lisamina rodamina, cloruro de sulfonilo, eritrosina B, rutenio (tris, bipyridinio), rojo Texas, dinucleótido de nicotinamida y adenina, dinucleótido de flavina y adenina, etc. Entre los compuestos quimioluminiscentes adecuados para uso como marcadores se incluyen, aunque no en sentido limitativo, luciferina y 2,3-dihidroftalazinadionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de diversos sistemas de producción de marcadores o señales que se pueden utilizar en los métodos de la presente invención, véase la patente de EE.UU. n° 4391904.

Los medios para detectar marcadores son bien conocidos por los expertos en la materia. Así, por ejemplo, en el caso en el que el marcador sea un marcador radiactivo, los medios para la detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en una autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar excitando el fluorocromo con una luz de la longitud de onda apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, mediante el uso de detectores electrónicos tales como dispositivos de carga acoplada (DCA) o fotomultiplicadores y similares. Del mismo modo, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos apropiados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcado y detección adecuados para su uso en

los métodos de la presente invención resultarán evidentes para los expertos en la materia. Tales moduladores y ligandos marcados se pueden usar en el diagnóstico de una enfermedad o estado de salud.

Composiciones farmacéuticas y métodos de uso/tratamiento/administración

5 Entre las enfermedades que se pueden tratar, mejorar o prevenir mediante los métodos de la presente memoria
 descriptiva se incluyen, aunque no en sentido limitativo, las siguientes: mucopolisacaridosis I (MPS I), MPS II, MPS
 10 IIIA, MPS IIIB, leucodistrofia metacromática (LDM), Krabbe, Pompe, CLN2, Tay-Sachs, Niemann-Pick A y B, y otras
 enfermedades lisosómicas. Para cada enfermedad, el agente conjugado comprenderá un compuesto, proteína o
 enzima específicos. Para los métodos relacionados con la MPS I, el compuesto o la enzima preferente es la α -L-
 iduronidasa. Para los métodos relacionados con la MPS II, el compuesto o la enzima preferente es la iduronato-2-
 15 sulfatasa. Para los métodos relacionados con la MPS IIIA, el compuesto o la enzima preferente es la heparán-N-
 sulfatasa. Para los métodos relacionados con la MPS IIIB, el compuesto o la enzima preferente es la α -N-
 acetilglucosaminidasa. Para los métodos relacionados con la leucodistrofia metacromática (LDM), el compuesto o la
 enzima preferente es la arilsulfatasa A. Para los métodos relacionados con Krabbe, el compuesto o la enzima
 preferente es la galactosilceramidasa. Para los métodos relacionados con Pompe, el compuesto o la enzima
 preferente es la alfa-glucosidasa ácida. Para los métodos relacionados con la CLN, el compuesto o la enzima
 preferente es la tioesterasa. Para los métodos relacionados con Tay-Sachs, el compuesto o la enzima preferente es
 20 la hexosaminidasa A. Para los métodos relacionados con Niemann-Pick A y B, el compuesto o la enzima preferente
 es la esfingomielinasa ácida. Para los métodos relacionados con los otros trastornos de la glucogenosis, el
 compuesto o la enzima preferente son las glucolipidasas, las mucopolisacaridasas y las oligosacaridasas.

Los conjugados de p97 de la presente memoria descriptiva se pueden administrar con un «vehículo
 25 farmacéuticamente aceptable». Tales vehículos incluyen cualquiera de los vehículos farmacéuticos estándar,
 tampones y excipientes, incluyendo solución con tampón fosfato, agua y emulsiones (tales como emulsiones
 oleoacuosas o acuo-oleosas), y diversos tipos de adyuvantes y/o agentes humectantes. Los vehículos farmacéuticos
 adecuados y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.,
 Easton, 19th ed. 1995). Los vehículos farmacéuticos preferentes dependen del modo de administración deseado
 para el agente activo. A continuación se describen los modos de administración típicos.

30 El término «cantidad eficaz» significa una dosis suficiente para producir un resultado deseado en una dolencia,
 patología o enfermedad de un sujeto o para un propósito de diagnóstico. El resultado deseado puede comprender
 una mejora subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación.

35 Un «tratamiento profiláctico» es un tratamiento administrado a un sujeto que no muestra signos de una enfermedad
 o que solamente muestra los signos tempranos de una enfermedad, en donde el tratamiento se administra con el
 propósito de disminuir el riesgo de desarrollar una patología. Los conjugados de la memoria descriptiva se pueden
 administrar como un tratamiento profiláctico.

40 Un «tratamiento terapéutico» es un tratamiento administrado a un sujeto que muestra signos de patología, en donde
 el tratamiento se administra con el propósito de disminuir o eliminar esos signos patológicos. Los signos pueden ser
 subjetivos u objetivos.

45 El término «composición», como en composición farmacéutica, pretende abarcar un producto que comprende el
 principio o principios activos y el principio o principios inertes que constituyen el vehículo, así como cualquier
 producto que sea el resultado, directo o indirecto, de la combinación, formación de complejos o agregación de
 cualquiera de dos o más de los principios o de la disociación de uno o más de los principios o de otros tipos de
 reacciones o interacciones de uno o más de los principios. Por consiguiente, las composiciones farmacéuticas de la
 presente invención abarcan cualquier composición obtenida mezclando un conjugado de p97-agente de la presente
 50 memoria descriptiva y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

El término «composición farmacéutica» indica una composición adecuada para uso farmacéutico en un sujeto,
 incluyendo un animal o un humano. Una composición farmacéutica comprende generalmente una cantidad eficaz del
 conjugado de p97 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

55 Los conjugados se pueden administrar a través de una variedad de rutas. En el caso de las preparaciones orales,
 los conjugados se pueden usar solos o en combinación con aditivos apropiados para preparar comprimidos, polvos,
 gránulos o cápsulas, por ejemplo, con aditivos convencionales, tales como lactosa, manitol, almidón de maíz o
 almidón de patata; con aglutinantes, tales como celulosa cristalina, derivados de celulosa, acacia, almidón de maíz o
 60 gelatinas; con disgregantes, tales como almidón de maíz, almidón de patata o carboximetilcelulosa de sodio; con
 lubricantes, tales como talco o estearato de magnesio; y si se desea, con diluyentes, agentes tamponantes, agentes
 humectantes, conservantes y agentes aromatizantes.

Los conjugados de p97-agente se puede formular en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o
 65 emulsionando en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como origen vegetal u otros aceites similares, glicéridos de
 ácidos alifáticos sintéticos, ésteres de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y, si se desea, con aditivos

convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes de suspensión, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

5 Los conjugados de p97-agente se puede utilizar en formulación en forma de aerosol para su administración por vía inhalatoria. Los conjugados de la presente memoria descriptiva se pueden formular con propulsores presurizados aceptables tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

10 Además, los conjugados de p97-agente se pueden preparar en forma de supositorios mediante mezcla, con una variedad de bases tales como bases emulsionantes o bases solubles en agua. Los conjugados de la presente memoria descriptiva se pueden administrar por vía rectal a través de un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de cacao, carboceras y polietilenglicoles, que se funden a la temperatura corporal, pero que son sólidos a temperatura ambiente.

15 Se pueden proporcionar formas de dosis unitaria de los conjugados de p97-agente para la administración oral o rectal como, por ejemplo, jarabes, elixires y suspensiones, en las que cada unidad de dosificación, por ejemplo, cucharadita, cucharada, tableta o supositorio, contenga una cantidad predeterminada de la composición que contiene el agente activo. De la misma manera, las formas de dosis unitaria para inyección o administración intravenosa pueden comprender el conjugado en una composición tal como una solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. El término «forma de dosis unitaria», como se usa en
20 este documento, se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosis unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada de los conjugados de la presente memoria descriptiva calculada en una cantidad suficiente para producir el efecto deseado en asociación con un diluyente, portador o vehículo farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las formas de dosis unitaria novedosas de la presente memoria descriptiva dependen del conjugado particular empleado y del efecto que se desee conseguir, y de la farmacodinámica asociada con cada compuesto en el huésped.

30 En el uso práctico, los conjugados de acuerdo con la memoria descriptiva se pueden combinar como el principio activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico según técnicas de composición farmacéutica convencionales. El vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas, dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para una forma de dosificación oral, se puede aplicar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes,
35 aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas, y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones sólidas orales frente a las preparaciones líquidas.

40 Con respecto a las rutas de administración transdérmica, los métodos para la administración transdérmica de fármacos se dan a conocer en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17th Edition, (Gennaro y cols. Eds., Mack Publishing Co., 1985). Los parches dérmicos son un medio preferente para la administración transdérmica de los conjugados de p97-agente de la memoria descriptiva. Los parches incluyen preferentemente un potenciador de la absorción, tal como DMSO, con el fin de aumentar la absorción de los conjugados. En las patentes de EE.UU. nº 5962012, nº 6261595 y nº 6261595 se dan a conocer otros métodos para la administración transdérmica de fármacos.
45

50 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como vehículos, adyuvantes, portadores o diluyentes, están disponibles comercialmente. Además, están disponibles comercialmente sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como agentes de ajuste del pH y tamponantes, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares.

55 Los expertos en la materia apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del agente específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos adversos. Los expertos en la materia determinarán fácilmente las dosis preferidas de un conjugado determinado mediante una diversidad de medios.

60 En cada uno de estos aspectos, las composiciones incluyen, aunque no en sentido limitativo, composiciones adecuadas para administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo subcutánea, intramuscular, e intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal) o administración nasal, aunque la ruta más adecuada en cualquier caso determinado dependerá en parte de la naturaleza y gravedad de las afecciones que se desee tratar y de la naturaleza del principio activo. Como ejemplos de rutas de administración se encuentran las vías oral e intravenosa. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosis unitaria y prepararse mediante cualquiera de los métodos bien conocidos en la técnica de la farmacia.

65 En el uso práctico, los conjugados de acuerdo con la memoria descriptiva se pueden combinar como el principio activo en mezcla íntima con un vehículo farmacéutico según técnicas de composición farmacéutica convencionales.

El vehículo puede adoptar una amplia variedad de formas, dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo intravenosa). En la preparación de las composiciones para una forma de dosificación oral, se puede aplicar cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes aromatizantes, conservantes, agentes colorantes y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes de granulación, lubricantes, aglutinantes, agentes disgregantes y similares en el caso de preparaciones sólidas orales tales como, por ejemplo, polvos, cápsulas duras y blandas, y comprimidos, prefiriéndose las preparaciones sólidas orales frente a las preparaciones líquidas.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y las cápsulas representan la forma de dosis unitaria oral más ventajosa, en cuyo caso se utilizan obviamente vehículos farmacéuticos sólidos. Si así se desea, los comprimidos se pueden recubrir mediante técnicas acuosas o no acuosas estándar. Evidentemente, se puede variar el porcentaje de un agente activo en estas composiciones y puede estar convenientemente comprendido entre aproximadamente el 2 por ciento y aproximadamente el 60 por ciento del peso de la unidad.

Los conjugados de la memoria descriptiva son útiles para una intervención terapéutica, profiláctica y de diagnóstico en animales, y en particular en los seres humanos.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar encapsuladas en o unidas a vesículas o envolturas virales. Los liposomas son vesículas formadas a partir de una membrana bicapa. Entre las vesículas adecuadas se incluyen, aunque no en sentido limitativo, vesículas unilamelares y vesículas lipídicas multilamelares o liposomas. Tales vesículas y liposomas se pueden preparar a partir de una amplia gama de lípidos o fosfolípidos compuestos, tales como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomielina, glucolípidos, gangliósidos, etc. utilizando técnicas estándar, tales como las descritas en, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 4394448. Tales vesículas o liposomas se pueden utilizar para administrar los conjugados intracelularmente y para administrar los conjugados a los órganos diana. La liberación controlada de una composición de p97 de interés también se puede conseguir mediante encapsulación (véase, por ejemplo, la patente de EE.UU. nº 5186941).

Se puede utilizar cualquier vía de administración que ponga los conjugados en contacto con las células, los tejidos o los órganos diana. Los conjugados se pueden administrar de manera periférica o central. Los conjugados también se pueden administrar por vía intravenosa o intraperitoneal. Los conjugados se pueden administrar de manera local o regional.

Las dosis a administrar dependerán de las necesidades y las características individuales (edad, peso, gravedad de la dolencia, efecto deseado, agente activo utilizado, y ruta de administración y pauta de tratamiento elegidas). Las dosis preferentes de los conjugados de p97 están comprendidas entre aproximadamente 0,02 pmol/kg y aproximadamente 2,5 nmol/kg, y las dosis particularmente preferentes oscilan entre 2 y 250 pmol/kg; alternativamente, las dosis preferentes del conjugado p97 pueden estar comprendidas en el intervalo comprendido entre 0,02 y 2000 mg/kg. Estas dosis se verán influidas por el número de restos de agente asociados con cada molécula de p97. Además, las dosis se pueden calcular sobre la base del agente que se desea administrar y la gravedad de la dolencia que se ha de tratar. El experto en la materia estará familiarizado con los métodos empíricos y teóricos para la determinación de las relaciones dosis-respuesta y la optimización de las posologías empleadas en el tratamiento de los pacientes individuales.

Los conjugados de p97 de la memoria descriptiva son, por ejemplo, útil para la intervención terapéutica y profiláctica en el tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico en animales, y en particular en los seres humanos. Los métodos de la invención encuentran utilidad en el tratamiento de una variedad de diferentes enfermedades de almacenamiento lisosómico. En ciertas realizaciones, es de particular interés el uso de los métodos objeto de la invención en estados patológicos, en los que un agente activo que tiene la actividad deseada ha sido previamente identificado, pero en los que el agente activo no está dirigido adecuadamente al sitio, área o compartimento diana. Con tal agente activo, los presentes métodos se pueden utilizar para mejorar la eficacia terapéutica y el índice terapéutico del agente activo.

El tratamiento pretende abarcar cualquier resultado beneficioso para un sujeto asociado con la administración de un conjugado, tales como una probabilidad reducida de adquisición de una enfermedad, la prevención de una enfermedad, ralentizar, detener o invertir el avance de una enfermedad o una mejora de los síntomas asociados con el estado patológico que padezca el huésped, en donde mejora o beneficio se utiliza en un sentido amplio para referirse a al menos una reducción de la gravedad de la enfermedad o de una magnitud de un parámetro representativo de la gravedad o de la presencia de la enfermedad, por ejemplo, daño tisular, muerte celular, cantidades en exceso o perjudiciales de los materiales de almacenamiento lisosómico, síntomas, asociados con el estado patológico que se desea tratar, tales como la inflamación y el dolor asociado con la misma. Como tal, el tratamiento también incluye, pero no se limita a, situaciones en las que la afección patológica o al menos los síntomas asociados con las mismas, son completamente inhibidos, por ejemplo, se impide que ocurran o se detienen, por ejemplo, se terminan, de tal manera que el huésped ya no sufra el estado patológico o al menos los

síntomas que caracterizan el estado patológico.

De acuerdo con los métodos de la invención es posible tratar a una variedad de huéspedes o sujetos. Generalmente, tales sujetos son «mamíferos», utilizándose estos términos ampliamente para describir organismos que están dentro de la clase de los mamíferos, incluyendo los órdenes de los carnívoros (por ejemplo, perros y gatos), roedores (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas) y primates (por ejemplo, seres humanos, chimpancés y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes o los sujetos serán los seres humanos.

Métodos de detección de conjugados para determinar la actividad terapéutica

La capacidad de los conjugados de la presente memoria descriptiva para aumentar la administración de un agente terapéutico a un lisosoma se puede evaluar *in vitro* comparando la administración de un agente conjugado a p97 con un control tal como el agente no conjugado. En una realización preferente, el conjugado y el agente se administran *in vitro* a las células y se determina la localización del conjugado dentro de los lisosomas. La evaluación se facilita mediante la conjugación de un marcador al conjugado de p97 o al agente no conjugado, de manera que se puede determinar y cuantificar más fácilmente su ubicación dentro de la célula. Los métodos de seguimiento de la localización de compuestos dentro de una célula son bien conocidos para un experto en la materia y se ejemplifican adicionalmente en los ejemplos 1 y 2. También se incluyen ejemplos de tales métodos en la solicitud de patente de EE.UU. n° 10/206448 presentada el 25 de julio 2002.

En otro planteamiento funcional, el conjugado con un agente deficiente en una EAL se puede poner en contacto *in vitro* con células afectadas por la EAL y comparar el efecto del conjugado sobre la cantidad del material de almacenamiento que se encuentra dentro de los lisosomas con el efecto de una cantidad equivalente del agente no conjugado. Se pueden medir los volúmenes celulares o lisosómicas, o cuantificar directamente el material almacenado.

En algunas realizaciones, la memoria descriptiva da a conocer un método de detección de la actividad terapéutica de un compuesto en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico poniendo en contacto una célula que tiene un lisosoma con el compuesto, en donde el compuesto comprende p97 unida covalentemente a una enzima deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico; y, seguidamente, realizando el seguimiento de la administración del compuesto al lisosoma. El seguimiento se puede realizar por medio de un marcador en el conjugado y detectando el marcador dentro del lisosoma o determinando el efecto del compuesto sobre el material de almacenamiento lisosómico (por ejemplo, evaluando si reduce la cantidad de material de almacenamiento.) En algunas realizaciones, la célula es humana.

En un método adicional, se llevan a cabo ensayos clínicos de la forma conocida por un experto en la materia y como se ejemplifica en el ejemplo 3. Más preferentemente, los conjugados se administran a animales de ensayo que sirven como modelo animal de la EAL de interés. Tales modelos animales son bien conocidos para un experto en la materia Véase, por ejemplo, la publicación PCT de patente n°: WO 01/83722.

Los siguientes ejemplos no limitativos ilustran la invención: Estos ejemplos pretenden ser meramente ilustrativos de la presente invención y no se han de interpretar como limitantes.

Ejemplos

EJEMPLO 1: localización inmunocitoquímica de la p97

El planteamiento de nuestra primera serie de experimentos ha sido demostrar que la p97 no conjugada se localiza en los lisosomas de las células cerebrales cultivadas. Esto se logra mediante mostrando la «colocalización» de p97 con un marcador para los lisosomas dentro de la célula. Demostrar la «colocalización» lisosómica es el primer paso para la validación de p97 como vehículo adecuado para las enzimas lisosómicas.

Se utilizó una estirpe neuronal humana para llevar a cabo los experimentos iniciales. Stratagene comercializa neuronas NT2 humanas diferenciadas derivadas de un teratocarcinoma. Las estirpes neuronales humanas son el sistema más relevante, ya que la proteína p97 en estudio es de origen humano y la diana final es el tejido neural dentro de los pacientes afectados.

La tinción inmunocitoquímica de p97 dentro de las células se llevó a cabo con el anticuerpo monoclonal L235 de Synapse en conjunción con un anticuerpo secundario conjugado con fluoresceína para localizar el L235. El anticuerpo L235 anti-p97 detecta el material endógeno (la p97 se expresa en las células neuronales normales), además del material que ha sido absorbido del medio de cultivo. Los marcadores son necesarios para proporcionar un patrón de fluorescencia específico de los orgánulos frente al cual se pueda comparar el patrón de fluorescencia de p97 observado. La superposición de los dos patrones confirma la localización intracelular específica de la p97. Para este propósito, se utilizó un anticuerpo contra la catepsina L, una proteasa lisosómica, en combinación con L235 en los experimentos de inmunofluorescencia. Este anticuerpo anti-catepsina L se dejó actuar contra un péptido C-terminal de catepsina L murina y muestra una fuerte tinción de los lisosomas en las células neuronales humanas.

Se utilizó un anticuerpo secundario conjugado con rojo Texas para detectar el anticuerpo primario anti-catepsina L. Se cultivaron neuronas NT2 humanas sobre cubreobjetos de vidrio y se alimentaron durante 2 horas con 0,5 mg/ml de p97. A continuación las células se enjuagaron, se fijaron con formaldehído y se permeabilizaron. Las células fijadas se cotifieron con anticuerpos primarios y secundarios y se montaron sobre portaobjetos. Las células también se trataron con una tinción para el núcleo, DAPI. Se obtuvieron imágenes de los portaobjetos utilizando conjuntos de filtros adecuados para resolver los diferentes marcadores.

Métodos experimentales

Tipo celular: para llevar a cabo estos experimentos se utilizaron principalmente estirpes celulares neuronales humanas. Stratagene comercializa neuronas NT2 humanas diferenciadas derivadas de un teratocarcinoma. ATCC suministra las neuronas corticales inmaduras CRL10742 y CRL10442. CRL10742 (designación HCN-2) se desarrolló a partir de un paciente con encefalitis de Rasmussen y tinciones para marcadores neuronales, pero no para marcadores no neuronales. Esta estirpe celular está cubierta por la patente de EE.UU. nº 5196315 para su uso en métodos de detección para la evaluación de compuestos químicos y biológicos. CRL10442 (designación de HCN-1A) es una neurona cortical derivada del cerebro de un paciente afectado por megalencefalia unilateral. Las estirpes neuronales humanas son el sistema más relevante para las investigaciones en curso, ya que la proteína p97 en estudio es de origen humano y la diana final es el tejido neuronal dentro de los pacientes afectados. Se obtuvieron fibroblastos de un paciente con MPSI de una reserva de BioMarin de esta estirpe celular obtenida originalmente del Coriell Cell Bank. Las células se mantuvieron en DMEM con 10 % de suero fetal bovino (FBS).

Anticuerpos: Synapse proporcionó amablemente el anticuerpo monoclonal L235 de ratón anti-p97. Se determinó una dilución apropiada para inmunohistoquímica por titulación de anticuerpos contra las células DG44 fijadas hasta que dejó de ser visible la señal de fondo. El anticuerpo de conejo anti-catepsina L (M-19) se adquirió a Santa Cruz Biotech. Los anticuerpos secundarios, de asno anti-ratón (DAM) y de cabra anti-conejo (GAR) conjugados con Alexa Fluor 488 o Alexa Fluor 594 se adquirieron a Molecular Probes y se usaron en las diluciones recomendadas por el fabricante.

Sondas fluorescentes: se usaron kits de marcado de proteínas Molecular Probes Alexa Fluor para marcar fluorescentemente la p97 y la iduronidasa. Molecular Probes comercializa transferrina marcada fluorescentemente. LysoSensor es un marcador de orgánulos ácidos comercializado por Molecular Probes.

Equipo: el examen de las células fijadas se llevó a cabo utilizando un Leica DMIRB con los siguientes conjuntos de filtros: cubo de filtros Leica A (intervalo de excitación UV), filtro de excitación BP340-380/emisión LP425. cubo de filtros Leica 13 (intervalo de excitación azul) filtro de excitación BP450-490/emisión LP515, que se utiliza para visualizar el marcador de Alexa Fluor 488. cubo de filtros Leica N2.1 (intervalo de excitación azul) filtro de excitación BP515-560//emisión LP590, que se utiliza para visualizar el marcador de Alexa Fluor 594.

Condiciones de captación de proteínas: las células se sembraron un día antes de un experimento de captación sobre cubreobjetos en placas de seis pocillos a una densidad de entre 2 y 5e5 células por pocillo. Las células se lavaron 3 veces con DMEM exento de suero + 1 mg/ml de BSA. Las proteínas para la captación se añadieron a las células a 60 ug/ml en DMEM + 1 mg/ml de BSA y se incubaron en una incubadora a 37 °C con un 5 % de CO₂ durante todo el período de captación. Las células se lavaron 3 veces con PBS y se fijaron con un fijador a base de formaldehído comercializado por CALTAG. Las células se permeabilizaron por inmersión en etanol al 70 %. La tinción con anticuerpos se llevó a cabo en solución de permeabilización CALTAG. Todos los pasos estuvieron separados por 3 lavados en PBS, el primero de las cuales contenía 0,1 ug/ml de DAPI para teñir los núcleos celulares. Los cubreobjetos se montaron en Antifade de Molecular Probes para su examen.

Resultados

Las imágenes de inmunofluorescencia representadas en la figura 1A-1D muestran los resultados de un experimento de colocalización en neuronas NT2 humanas usando los anticuerpos L235 y anti-catepsina L. El cuadro de «microscopía óptica» de la figura 1A muestra una sola neurona humana cultivada observada bajo contraste de fase con irradiación adicional en la longitud de onda de excitación de DAPI. El núcleo, indicado por la señal fluorescente azul, está situado en el centro del cuadro. Se puede ver el citoplasma de esta célula alejándose del núcleo.

El cuadro «tinción de catepsina» (figura 1B) es la misma célula observada bajo irradiación con luz en la longitud de onda de excitación para la detección de la catepsina L. La ubicación de la catepsina L se identifica por la fluorescencia roja. El aspecto puntiforme del patrón de señal visto en este cuadro es característico de los lisosomas.

El cuadro «tinción de L235» (figura 1C) es de la misma célula pero ahora irradia con luz en la longitud de onda de excitación para la detección de p97. La ubicación de la p97 se identifica por la fluorescencia verde. Este cuadro muestra el mismo tipo de patrón de tinción puntiforme lisosómico que el que se puede ver en la imagen de la catepsina L. Una cuidadosa comparación de los patrones fluorescentes de estos dos cuadros revela que son coincidentes. La catepsina L y la p97 se localizan de forma idéntica dentro de la célula.

La confirmación de la colocalización de la p97 y la catepsina L se muestra en la figura 1D («Superposición»). La combinación de las dos señales fluorescentes da lugar a un patrón puntiforme de color naranja, que es una combinación de la luz roja y verde de los dos anticuerpos diferentes. Estos resultados se han replicado en la estirpe neuronal ATCC CRL 10742 derivada de tejido cortical de cerebro humano.

5

EJEMPLO 2: detección de fluorescencia intracelular de la p97 marcada

El seguimiento selectivo del material endocitosado dentro de un fondo de material endógeno requiere el uso de un segundo sistema de detección. Para este propósito, las células se alimentaron con la p97 que se había conjugado con el marcador fluorescente Alexa Fluor 594. La observación del marcador de fluorescencia a partir de células vivas permite la identificación de la señal derivada únicamente de la p97 endocitosada, sin contribución alguna del material endógeno. Fue necesario un marcador lisosómico para las células vivas para la colocalización con la p97 marcada con Alexa Fluor 594. Tal marcador es LysoSensor Green, un colorante captado por las células vivas que se vuelve fluorescente tras la exposición al ambiente ácido de los compartimentos endosómico tardío y lisosómico. De manera similar al experimento indicado anteriormente, las células se alimentaron durante 2 horas con 0,5 mg/ml de p97 y se lavaron para eliminar el material no unido, y se obtuvieron imágenes de las células vivas usando juegos de filtro adecuados para resolver los diferentes marcadores.

10

15

Métodos experimentales

20

Consulte el apartado «Métodos experimentales» del ejemplo 1.

Resultados

25

La localización del Alexa Fluor 594-p97 endocitosado se determinó en células vivas. Las células se observaron directamente en un microscopio de fluorescencia utilizando conjuntos de filtros apropiados.

30

El seguimiento selectivo del material endocitosado dentro de un fondo de material endógeno requiere el uso de un segundo sistema de detección. Para este propósito, las células se alimentaron con la p97 conjugada con el marcador fluorescente Alexa Fluor 594. La observación del marcador de fluorescencia a partir de células vivas permite la identificación de la señal derivada únicamente de la p97 endocitosada, sin contribución alguna del material endógeno. Fue necesario un marcador lisosómico para las células vivas para la colocalización con la p97 marcada con Alexa Fluor 594. Tal marcador es LysoSensor Green, un colorante captado por las células vivas que se vuelve fluorescente tras la exposición al ambiente ácido de los compartimentos endosómico tardío y lisosómico. De manera similar al experimento indicado anteriormente, las células se alimentaron durante 2 horas con 0,5 mg/ml de p97 y se lavaron para eliminar el material no unido, y se obtuvieron imágenes de las células vivas usando juegos de filtro adecuados para resolver los diferentes marcadores.

35

40

La localización del Alexa Fluor 594-p97 endocitosado se determinó en células vivas. Las células se observaron directamente en un microscopio de fluorescencia utilizando conjuntos de filtros apropiados (figura 2A-2C). El cuadro «Alexa Fluor 594-p97» (figura 2A) muestra una célula neuronal hNT viva alimentada con la p97 marcada con fluoróforo y LysoSensor Green. La célula de este cuadro se observa bajo irradiación a la longitud de onda de excitación de Alexa Fluor 594. La ubicación de la p97 endocitosada se identifica por la fluorescencia roja. El patrón es puntiforme y perinuclear. El cuadro «Lysosensor Green» (figura 2B) es la misma célula observada bajo irradiación con luz en la longitud de onda de excitación para Lysosensor Green. Las ubicaciones de los compartimentos acidificados de la célula, incluyendo los lisosomas y los endosomas tardíos, se identifican por fluorescencia verde. Este patrón también es puntiforme y perinuclear. La colocalización de la p97 endocitosada y del colorante LysoSensor se muestra en el tercer cuadro («Superposición») (figura 2C). La combinación de las dos señales fluorescentes da lugar a un patrón de color naranja, que es una combinación de la luz roja y verde de los dos marcadores fluorescentes diferentes.

50

55

Los datos experimentales anteriores (ejemplos 1-2) muestran que p97 se localiza en los lisosomas y se transporta desde la superficie de la célula a los lisosomas de las células cultivadas. Parece que tienen lugar dos etapas de transporte principales necesarias para la administración mediada por p97 hasta los lisosomas de las células cerebrales. Synapse ha demostrado que la molécula p97 administra su «carga útil» a través de la BHE. Nuestros resultados han demostrado que la p97 se transporta hasta los lisosomas de las células cerebrales cultivadas. Tomados en conjunto, estos resultados indican que la p97 es un medio eficaz para administrar enzimas recombinantes a los pacientes con EAL que sufren manifestaciones neurológicas de la enfermedad.

60

EJEMPLO 3: Tratamiento de pacientes con trastorno de MPS-I

Se prepara mediante métodos bien conocidos para un experto en la materia una composición farmacéutica que comprende un agente conjugado que comprende α -L-iduronidasa humana unida a p97. Es preferente administrar la composición farmacéutica por vía intravenosa. La forma de dosificación final del líquido comprende el agente conjugado, solución salina normal, tampón de fosfato a pH 5,8 y albúmina humana a 1 mg/ml. Todo ello se prepara en una bolsa de solución salina normal.

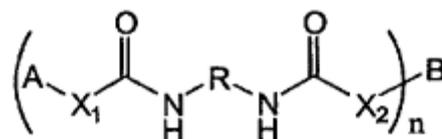
65

| Componente | Composición |
|---|---|
| Agente conjugado (α -L-iduronidasa unida a p97) | 0,05 0,5 mg/ml o 12.500-50.000 unidades por ml |
| Solución de cloruro de sodio | 150 mM en una bolsa intravenosa, volumen total de 50-250 cc |
| Tampón de fosfato de sodio | 10-50 mM, pH 5,8 |
| Albúmina humana | 1 mg/ml |

En el estudio se incluyen pacientes humanos que manifiestan un fenotipo clínico de trastorno MPS-I con un nivel de α -L-iduronidasa de menos del 1 % de lo normal en los leucocitos y fibroblastos. Todos los pacientes manifiestan alguna evidencia clínica de acumulación en tejidos viscerales y partes blandas de glucosaminoglucanos con diferentes grados de deterioro funcional. La eficacia se determina midiendo el porcentaje de reducción con el tiempo de la excreción urinaria de GAG. Los niveles de GAG en orina en pacientes con MPS-I se comparan con los valores normales de excreción. Existe una amplia gama de valores de GAG en orina en los pacientes con MPS-I no tratados. Una reducción de más del 50 % en la excreción de GAG no degradados después de la terapia con el agente conjugado es un medio válido para medir la respuesta de un individuo a la terapia. Los datos se recogen midiendo la actividad iduronidasa en leucocitos y la actividad iduronidasa bucal antes y después de la terapia en pacientes con MPS-I. Se lleva a cabo la evaluación clínica del tamaño del hígado y el bazo, ya que es el medio más ampliamente aceptado para evaluar el éxito del tratamiento de trasplante de médula ósea en pacientes con MPS-I (Hoogerbrugge y cols., Lancet 345:1398 (1995)).

EJEMPLO 4: Métodos y composiciones de enlace de agentes a la molécula p97.

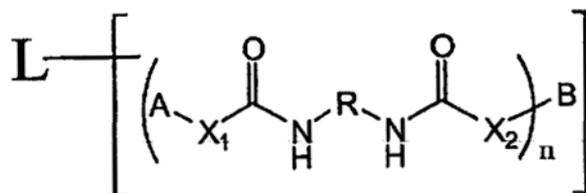
Los conjugados y las realizaciones preferentes de acuerdo con la presente memoria descriptiva incluyen los de la fórmula



Fórmula I

en la que A es un agente activo y B es una molécula de p97 para administración o administración dirigida; y X_1 y X_2 son independientemente N o O; R es un alquilo sustituido o alquilo no sustituido o heteroalquilo sustituido o no sustituido de entre 1 y aproximadamente 30 átomos de longitud o de entre 1 y 50 átomos de longitud; y n está comprendido entre 1 y 30. En los casos en los que n sea mayor que 1, los agentes activos pueden ser iguales o diferentes. En caso de diferencia, los agentes activos son útiles para el tratamiento de la misma enfermedad o dolencia. «Alquilo» abarca radicales divalentes de alcanos, como se define a continuación. Tales enlazadores se explican en la solicitud provisional de EE.UU. n° 60/395762 presentada el 07/12/2002.

En una realización adicional, un marcador, L, se une covalentemente a un compuesto de Fórmula I. El marcador puede estar unido al conjugado en la parte del agente activo, en la parte de la p97 o en el enlazador que une al agente activo a la p97:



Fórmula V

En algunas realizaciones, el marcador se une preferentemente a la parte de la p97 de un conjugado.

Estos conjugados tienen la ventaja de su capacidad de liberación. Cuando un reactivo de isocianato de acuerdo con la memoria descriptiva reacciona con un grupo hidroxilo forma un enlace carbamato, que puede ser hidrolizado por enzimas endógenas (por ejemplo, proteasas) en el cuerpo de un sujeto al que se administra. Los reactivos de isocianato de acuerdo con la memoria descriptiva reaccionan con un grupo amino para generar un enlace de isourea, que también puede ser hidrolizado por enzimas endógenas en el cuerpo de un sujeto al que se administra.

En virtud de unión al resto de p97, el agente se administra al compartimento lisosómico o sitio del cuerpo diana, y la proteasa u otra enzima endógena hidroliza el enlace carbamato o isourea para liberar el fármaco libre en el sitio o compartimento diana.

- 5 Un conjugado ejemplar comprende una p97 unida covalentemente a través del grupo funcional, como es bien conocido en la técnica de los péptidos y proteínas PEGiladas, a un resto de PEG que a su vez está unido a través de un enlace carbamato al agente activo. El término agente activo incluye, aunque no en sentido limitativo, proteínas o enzimas deficientes en una EAL. En otra realización, el conjugado está unido covalentemente a través de un grupo carbamato a un resto de PEG que a su vez está unido a través de un enlace carbamato al agente activo. En otra
- 10 realización, el conjugado está unido covalentemente a través de un grupo carbamato a un resto de PEG que a su vez está unido a través de un enlace carbamato a un resto alquilo u homoalquilo, que a su vez está unido a través de un enlace carbamato al agente activo.

- 15 Estos conjugados también tienen la ventaja de ser sintetizados con altas eficiencias de acuerdo con los métodos descritos. La reacción descrita entre los grupos isocianato con hidroxilo y amino son muy eficientes; y los rendimientos son muy altos (por lo general más del 90 %). Además, el nuevo enlace formado por la reacción de un grupo isocianato con un grupo hidroxilo o un grupo amino aumentará la solubilidad acuosa del fármaco. Esta propiedad puede tener importancia práctica.

20 EJEMPLO 5: Tratamiento de pacientes con un trastorno por enfermedad de almacenamiento lisosómico

- Se prepara mediante métodos bien conocidos para un experto en la materia una composición farmacéutica que comprende un agente conjugado que comprende una enzima o proteína humana deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico unida a p97. Es preferente administrar la composición farmacéutica por vía intravenosa.
- 25 Alternativamente, la composición se puede administrar localmente al órgano u órganos afectados. La forma de dosificación final del líquido comprende el agente conjugado, solución salina normal, tampón de fosfato a pH 5,8 y albúmina humana a 1 mg/ml. Todo ello se prepara en una bolsa de solución salina normal.

| Componente | Composición |
|---|---|
| Agente conjugado | 0,02 a 2,0 mg/ml |
| (proteína o enzima de la enfermedad de almacenamiento lisosómico unida a p97) | |
| Solución de cloruro de sodio | 150 mM en una bolsa intravenosa, volumen total de 50-250 cc |
| Tampón de fosfato de sodio | 10-50 mM, pH 5,8 |
| Albúmina humana | 1 mg/ml |

- 30 Los pacientes humanos que manifiestan un fenotipo clínico de un trastorno o enfermedad de almacenamiento lisosómico deben recibir tratamiento con un conjugado que tenga una proteína o enzima deficiente en la enfermedad o trastorno particular. Todos los pacientes manifiestan ciertas evidencias clínicas de acumulación excesiva o nociva en tejidos viscerales y partes blandas de material de almacenamiento en sus lisosomas que se manifiesta en
- 35 diversos grados de deterioro funcional o de empeoramiento del estado de salud asociados con un trastorno o enfermedad de depósito lisosómico en particular. Preferentemente, se controlan los niveles de enzimas en un paciente para confirmar la ausencia o reducción de la actividad de la proteína de la enfermedad de almacenamiento lisosómico en sus tejidos. La eficacia se determina midiendo el porcentaje de reducción en la excreción urinaria del sustrato de la enzima conjugada con el tiempo. Los niveles de sustrato urinario en los pacientes se comparan con los valores y/o niveles normales de excreción en pacientes no tratados o en los mismos pacientes antes del
- 40 tratamiento. La eficacia también se puede determinar de acuerdo con los signos y síntomas reducidos de cualquier patología asociada con una enfermedad lisosómica. La eficacia se puede determinar mediante biopsia de tejido y examen de las células y/o lisosomas para determinar el grado de reducción del sustrato o material de almacenamiento. La eficacia se puede determinar mediante evaluaciones funcionales que pueden ser objetivas o subjetivas (por ejemplo, reducción del dolor o dificultad en la función, aumento de la fuerza muscular o resistencia,
- 45 aumento del gasto cardíaco, resistencia al ejercicio físico, cambios en la masa corporal o en el aspecto, etc.). Una reducción de más del 25 % o del 50 % en la excreción del sustrato no degradado después de la terapia con el agente conjugado es un medio válido para medir la respuesta de un individuo a la terapia. También se pueden recoger los datos midiendo la actividad o presencia de la enzima conjugada en los tejidos del sujeto antes, después y durante la terapia. Se puede realizar la evaluación clínica del tamaño de los órganos como medio de evaluar la
- 50 eficacia terapéutica (véase, por ejemplo, Hoogerbrugge y cols., Lancet 345:1398 (1995)).

REIVINDICACIONES

1. Una composición farmacéutica para uso en el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad de almacenamiento lisosómico; comprendiendo dicha composición una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca la enfermedad; en donde la proteína está seleccionada de entre el grupo que consiste en α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde la composición se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.
2. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1, en la que el sujeto es humano.
3. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con la reivindicación 1 ó 2, en la que la composición se usa por vía intravenosa.
4. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que la molécula de p97 es p97 humana.
5. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en la que la molécula de p97 es p97 soluble.
6. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína es α -L-iduronidasa
7. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que la proteína es iduronato-2-sulfatasa.
8. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que la molécula de p97 está unida covalentemente a la proteína por un enlazador extendido.
9. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el conjugado es una proteína de fusión de p97 y de la proteína.
10. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que el sujeto sufre manifestaciones neurológicas de la enfermedad.
11. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la composición comprende el conjugado en una cantidad terapéuticamente eficaz.
12. La composición farmacéutica para uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que la enfermedad se selecciona entre el grupo compuesto por mucopolisacaridosis I (MPS I), MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, leucodistrofia metacromática (LDM), Krabbe, Pompe, CLN2, Tay-Sachs y Niemann-Pick A y B.
13. Un uso de un compuesto que comprende una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca una enfermedad de almacenamiento lisosómico en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un sujeto que tiene una enfermedad de almacenamiento lisosómico; en donde la proteína se selecciona de entre el grupo que consiste en α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde el medicamento se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.
14. El método de la reivindicación 13, en el que la proteína es α -L-iduronidasa.
15. El uso de la reivindicación 13 ó 14, en el que la molécula de p97 es p97 soluble.
16. El uso de una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 15, en el que el compuesto es una proteína de fusión de la molécula de p97 y la proteína.
17. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 16, en el que la molécula de p97 está unida covalentemente a la proteína por un enlazador extendido.
18. El uso de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 13 a 17, en el que el conjugado es capaz de pasar a través de la barrera hematoencefálica y entrar en un lisosoma de una célula del sistema nervioso central.
19. Un método de detección de la actividad terapéutica de un compuesto en el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico, comprendiendo dicho método:

- poner en contacto una célula que tiene un lisosoma *in vitro* con el compuesto, en donde el compuesto comprende p97 unida covalentemente a una proteína deficiente en una enfermedad de almacenamiento lisosómico; en donde la proteína se selecciona entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y el seguimiento de la administración del compuesto al lisosoma.
- 5
20. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que el compuesto está marcado y el seguimiento detecta el marcador.
- 10
21. El método de acuerdo con la reivindicación 19, en el que la célula es humana.
22. El método de una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21, en el que la célula es deficiente en la proteína.
- 15
23. El método de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22, en el que el seguimiento se realiza determinando el efecto del compuesto sobre el material de almacenamiento lisosómico.
24. Una composición farmacéutica para uso en la administración de una proteína a una célula en un sujeto que tiene una enfermedad de almacenamiento lisosómico; comprendiendo dicha composición una cantidad terapéuticamente eficaz de un compuesto que comprende una molécula de p97 unida covalentemente a una proteína cuya deficiencia provoca una enfermedad de almacenamiento lisosómico y un excipiente farmacéuticamente aceptable; en donde la proteína está seleccionada de entre el grupo formado por α -L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparan-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, arilsulfatasa A, galactosilceramidasa, α -glucosidasa ácida, tioesterasa, hexosaminidasa A, esfingomielinasa ácida y α -galactosidasa; y en donde el compuesto se administra a un lisosoma en una célula del sujeto.
- 20
- 25
25. La composición de acuerdo con la reivindicación 24, en la que el sujeto sufre manifestaciones neurológicas de la enfermedad.

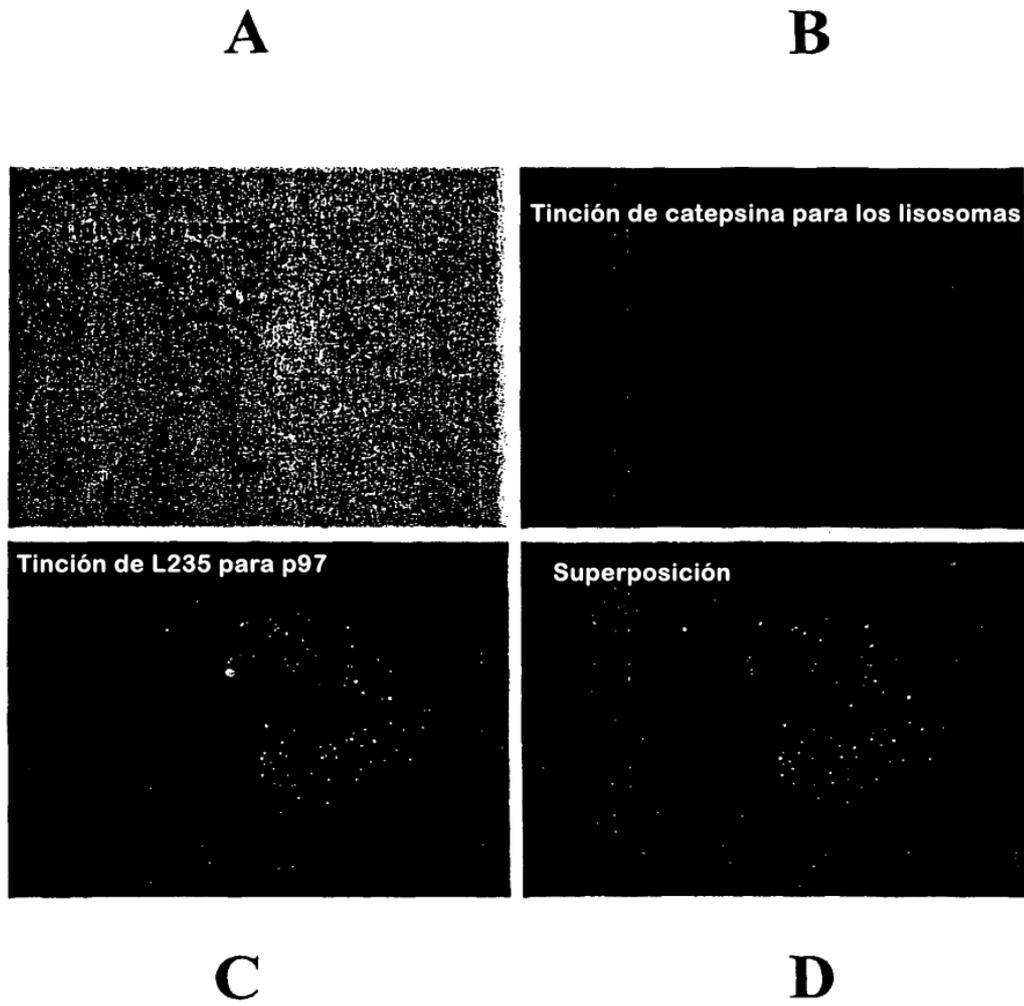
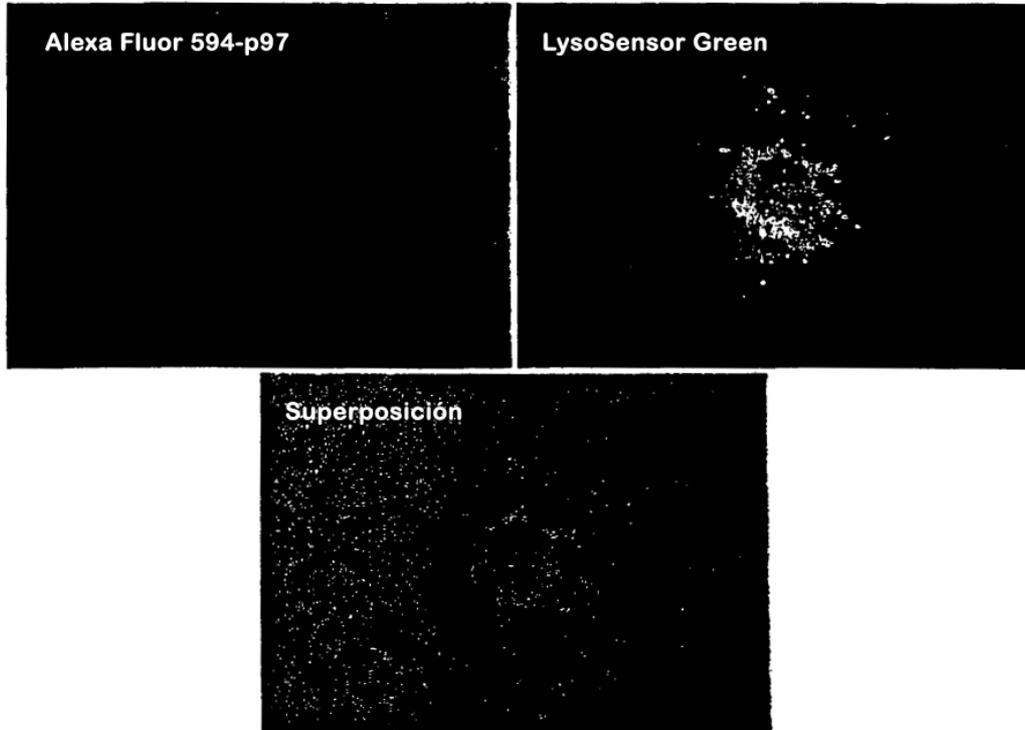


FIGURA 1

A

B



C

FIGURA 2



FIGURA 3