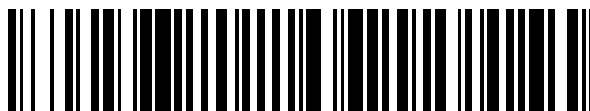


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 502 966**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 47/48 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

A61K 38/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.01.2007** **E 10189277 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **23.04.2014** **EP 2264060**

54 Título: **Composiciones y métodos para inhibir la adhesión viral**

30 Prioridad:

26.01.2006 US 762796 P

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

06.10.2014

73 Titular/es:

**RECOPHARMA AB (100.0%)
Novum, Halsovagen 7
14157 Huddinge, SE**

72 Inventor/es:

HOLGERSSON, JAN

74 Agente/Representante:

SUGRAÑES MOLINÉ, Pedro

ES 2 502 966 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

Composiciones y métodos para inhibir la adhesión viral

5 Campo de la invención

La invención se refiere generalmente a composiciones y a métodos para tratar o prevenir la infección viral y más particularmente a composiciones que incluyen polipéptidos de fusión que comprenden epítomos de hidratos de carbono que median en la adhesión viral.

10 Antecedentes de la invención

La unión a superficies celulares específicas por parte de las partículas virales es necesaria para la entrada, replicación e infección virales. Los virus usan como receptores moléculas de la superficie celular implicadas en funciones celulares normales. Tales receptores son normalmente glicoproteínas, y la unión viral puede realizarse a la parte tanto de polipéptido como de glicano de tales glicoproteínas. Los receptores virales no sólo son importantes para la unión, sino que han mostrado que desencadenan interacciones posteriores con receptores secundarios necesarios para la entrada y la replicación. El documento WO-A2-03089450 proporciona compuestos para su uso en la disminución de la adhesión bacteriana pero no proporciona una descripción que permita su reproducción para virus.

Sumario de la invención

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los epítomos de hidratos de carbono que median en la unión viral pueden expresarse específicamente con alta densidad y por diferentes cadenas de sacáridos centrales en estructuras principales de proteínas de tipo mucina. Los polipéptidos se denominan en el presente documento polipéptidos de fusión LAV. Estas proteínas recombinantes, altamente glicosiladas que portan abundantes glicanos unidos a N o unidos a O tapados con determinantes de hidratos de carbono con actividad de unión a virus conocida pueden actuar como señuelos, y como tales impiden específica y estéricamente la infección por virus en por ejemplo, el ojo, las vías respiratorias o el tracto gastrointestinal. Las proteínas de fusión tienen toxicidad baja y bajo riesgo de inducir resistencia viral a los fármacos.

En un aspecto, la invención proporciona un polipéptido de fusión para su uso en la disminución de la adhesión viral en una célula que incluye un primer polipéptido que porta uno o más de los siguientes epítomos de hidratos de carbono Sia α 3Gal β 4GlcNAc β , Sia α 3Gal β 3GlcNAc β , unido operativamente a un segundo polipéptido. El primer polipéptido es multivalente para estos epítomos. El primer polipéptido es un polipéptido de mucina tal como PSGL-1 o una parte del mismo. Preferiblemente, el polipéptido de mucina es una parte extracelular de PSGL-1. Alternativamente, el primer polipéptido es una alfa-glicoproteína tal como alfa 1-glicoproteína ácida (es decir, orosomucoide o AGP) o parte de la misma.

El segundo polipéptido comprende al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. Por ejemplo, el segundo polipéptido comprende una región de un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina. Alternativamente, el segundo polipéptido comprende la región FC de una cadena pesada de inmunoglobulina.

En otro aspecto, la invención proporciona compuestos para su uso en un método de inhibición (por ejemplo, disminución) de la unión viral a una célula. La unión se inhibe poniendo en contacto el virus con el polipéptido de fusión AV. La invención también presenta métodos de prevención o alivio de un síntoma de una infección viral o un trastorno asociado con una infección viral en un sujeto mediante la identificación de un sujeto que padece o que corre el riesgo de desarrollar una infección viral y la administración al sujeto de un polipéptido de fusión AV. El virus es por ejemplo, un calicivirus o virus influenza.

El sujeto es un mamífero tal como un ser humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo. El sujeto padece o corre el riesgo de desarrollar una infección viral o un trastorno asociado con una infección viral. Un sujeto que padece o que corre el riesgo de desarrollar una infección viral o un trastorno asociado con una infección microbiana se identifica mediante métodos conocidos en la técnica.

En la invención también se incluyen composiciones farmacéuticas que incluyen los polipéptidos de fusión AV.

A menos que se defina otra cosa, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado tal como entiende comúnmente un experto habitual en la técnica a la que pertenece esta invención. Aunque pueden usarse métodos y materiales similares o equivalentes a los descritos en el presente documento en la práctica o las pruebas de la presente invención, a continuación se describen métodos y materiales adecuados. Todas las publicaciones, solicitudes de patente, patentes y otras referencias mencionadas en el presente documento se incorporan como referencia en su totalidad. En caso de conflicto, prevalecerá la presente memoria descriptiva, incluyendo las definiciones. Además, los materiales, métodos y ejemplos son sólo ilustrativos y no se pretende que sean limitativos.

Otras características y ventajas de la invención resultarán evidentes a partir de la siguiente descripción detallada, y de las reivindicaciones.

Descripción detallada de la invención

La invención se basa en parte en el descubrimiento de que los epítomos de hidratos de carbono que median en la unión viral pueden expresarse específicamente con alta densidad en glicoproteínas, por ejemplo, en estructuras principales de proteínas de tipo mucina y alfa-glicoproteína. Esta densidad mayor de epítomos de hidratos de carbono da como resultado un aumento de la valencia y la afinidad en comparación con oligosacáridos monovalentes y de tipo natural, por ejemplo glicoproteínas nativas expresadas de manera no recombinante.

La tabla I enumera ejemplos de virus que se unen a células huésped mediante unión a glicanos de la superficie celular.

TABLA 1

Clasificación de virus usando glicoeptópos como receptores

Familia de virus (subfamilia/género)	Tipo de virus	Receptor	Comentario
Adenoviridae	Adeno 37	Ácido siálico unido en (α 2-3)	(18)
Arenoviridae	Adenovirus 2, 5 Virus de Lassa	Heparán sulfato Glicanos dihidroglicanos	(141) (77)
Caliciviridae Norovirus	Norwalk y otros	Glicoeptópos de grupo histológico-sanguíneo en individuos positivos secretores	Patrones de unión compleja dependiente de cepa. Para más detalles véase el texto
Coronaviridae	Coronavirus OC43	Ácido 9-O-acetil-siálico	(40)
Flaviviridae Hepatovirus Flavivirus	Virus de la hepatitis C Virus del dengue Virus de la encefalitis japonesa, virus del Nilo occidental	Heparán sulfato Heparán sulfato Heparán sulfato	(118) (118) Contribuye a neuroinvasividad (142)
Herpesviridae	Virus del herpes simple tipos 1 y 2	Heparán sulfato (condroitín sulfato)	Para más detalles véase el texto.
α -herpesvirus β -herpesvirus	Virus de la varicela-zóster Citomegalovirus, herpesvirus humano tipos 6 y 7	Heparán sulfato Heparán sulfato	(90) (69, 143, 144)
γ -herpesvirus Ortomyxoviridae	Herpesvirus humano tipo 8 Virus de la gripe A	Heparán sulfato Ácido siálico unido en (α 2-3): virus aviar Ácido siálico unido en (α 2-6): virus humano	(91) Para más detalles véase el texto
	Virus de la gripe B	Ácido siálico unido en (α 2-6) Ácido siálico unido en (α 2-3)	(145)
	Virus de la gripe C	Ácido 9-O-acetilsíálico	(39)
Papillomaviridae Papillomavirus	Virus del papiloma humano tipos 11, 16, 33	Heparán sulfato	(146,147)
Paramyxoviridae Respirovirus	Paramyxovirus1-3	Ácido siálico	Patrones de unión dependiente del tipo frente a ácido siálico.

Pneumovirus	Virus sincitial respiratorio	Heparán sulfato (condroitín sulfato)	Véase el texto (106,107,109)
Metapneumov.	Metapneumovirus humano	Heparán sulfato	Apoyado por estudios de inhibición (112)
Parvoviridae Erythrovirus	B19	Globosil/grupo histológico- sanguíneo, sustancia P Ácido siálico;	Para más detalles véase el texto.
Dependovirus	Virus adenoasociados (AAV) tipos 4 y5	Ácido siálico;	Ácido siálico; Para diferentes patrones de unión, véase el texto
Picornavirus Enterovirus	AAV tipo 2 Enterovirus70	Glicosaminoglicano Ácido siálico	(148) Para más detalles véase el texto
Rhinovirus Polyomaviridae Polyomavirus	Rhinovirus 87 Virus JC y BK	Ácido siálico Ácido siálico	(25,26) Para más detalles véase el texto
Poxviridae Ortopoxvirus	Virus vaccinia	Heparán sulfato, condroitín sulfato	(149, 150)
Reoviridae Ortorcovirus Rotavirus Retroviridae Lentivirus	Reovirus 3 Rotavirus VIH-1	Ácido siálico Ácido siálico Sulfátido; galactosilceramida, heparán sulfato (condroitín sulfato)	(151-153) (151-156) Sulfátido, galactosilceramida: receptor para transcitosi a través de la mucosa (3). Glicosaminoglicano: que contribuye a la invasión cerebral (126, 157). El VIH también puede unirse a fucosa en células dendríticas (158)

Adaptada de Olofsson, S. *et al.* Annals of Medicine 2005, 37: 154-172, incorporado al presente documento como referencia en su totalidad.

- 5 Los epítomos de hidratos de carbono, $\text{Sia}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta$, $\text{Sia}\alpha 3\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta$, son ligandos para moléculas de la superficie celular. Muchos virus usan un receptor de ácido siálico para unirse a e infectar células.

10 La invención proporciona proteínas de fusión de glicoproteína-inmunoglobulina (denominadas en el presente documento "proteína de fusión AV o péptidos de fusión AV") que contienen múltiples epítomos $\text{Sia}\alpha 3\text{Gal}\beta 4\text{GlcNAc}\beta$, $\text{Sia}\alpha 3\text{Gal}\beta 3\text{GlcNAc}\beta$, que son útiles en el bloqueo (es decir, la inhibición) de la interacción por adhesión entre un virus y una célula. Los epítomos son terminales, es decir, están en el extremo terminal del glicano. La proteína de fusión AV inhibe el 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 98% o 100% de la adhesión del virus a una célula. Por ejemplo, las proteínas de fusión AV son útiles en la inhibición de la adhesión del virus influenza, virus oculotrópico o virus de tipo Norwalk a células.

15 El péptido de fusión AV es más eficaz en una base molar de hidratos de carbono en la inhibición de la adhesión viral en comparación con los sacáridos libres. El péptido de fusión AV inhibe 2, 4, 10, 20, 50, 80, 100 o un número de veces mayor de viriones en comparación con una cantidad equivalente de sacáridos libres.

20 Polipéptidos de fusión

25 En diversos aspectos, la invención proporciona proteínas de fusión que incluyen un primer polipéptido que contiene al menos una parte de una glicoproteína, por ejemplo, un polipéptido de mucina o un polipéptido de alfa-globulina, unido operativamente a un segundo polipéptido. Tal como se usa en el presente documento, una "proteína de fusión" o "proteína quimérica" incluye al menos una parte de un polipéptido de glicoproteína unida operativamente a un polipéptido distinto de mucina.

Un “polipéptido de mucina” se refiere a un polipéptido que tiene un dominio de mucina. El polipéptido de mucina tiene uno, dos, tres, cinco, diez, veinte o más dominios de mucina. El polipéptido de mucina es cualquier glicoproteína caracterizada por una secuencia de aminoácidos sustituida con O-glicanos. Por ejemplo, en un polipéptido de mucina cada segundo o tercer aminoácido es una serina o treonina. El polipéptido de mucina es una proteína secretada. Alternativamente, el polipéptido de mucina es una proteína de la superficie celular.

Los dominios de mucina son ricos en los aminoácidos treonina, serina y prolina, donde los oligosacáridos se unen mediante N-acetilgalactosamina a los hidroxi-aminoácidos (O-glicanos). Un dominio de mucina comprende o consiste alternativamente en un sitio de glicosilación unido a O. Un dominio de mucina tiene 1, 2, 3, 5, 10, 20, 50, 100 o más sitios de glicosilación unidos a O. Alternativamente, el dominio de mucina comprende o consiste alternativamente en un sitio de glicosilación unido a N. Un polipéptido de mucina debe el 50%, 60%, 80%, 90%, 95% o 100% de su masa debida a glicanos. El polipéptido de mucina es cualquier polipéptido codificado por un gen MUC (es decir, MUC1, MUC2, MUC3, etc.). Alternativamente, un polipéptido de mucina es ligando de la glicoproteína P-selectina 1 (PSGL-1), CD34, CD43, CD45, CD96, GlyCAM-1, MAdCAM o glicoforinas de glóbulos rojos. Preferiblemente, la mucina es PSGL-1.

Un “polipéptido de alfa-globulina” se refiere a una glicoproteína sérica. Las alfa-globulinas incluyen por ejemplo, enzimas producidas por los pulmones y el hígado, y haptoglobina, que se une a hemoglobina. Una alfa-globulina es una alfa₁ o una alfa₂ globulina. Alfa₁ globulina es predominantemente alfa₁-antitripsina, una enzima producida por los pulmones y el hígado. Alfa₂ globulina, que incluye haptoglobina sérica, es una proteína que se une a hemoglobina para impedir su excreción por los riñones. Otras alfa-globulinas se producen como resultado de inflamación, daño tisular, enfermedades autoinmunitarias o determinados cánceres. Preferiblemente, la alfa-globulina es alfa-1-glicoproteína ácida (es decir, orosomucoide).

Un “polipéptido distinto de mucina” se refiere a un polipéptido del que al menos, menos del 40% de su masa se debe a glicanos.

Dentro de una proteína de fusión AV de la invención, el polipéptido de mucina corresponde a toda o una parte de una proteína mucina. Una proteína de fusión AV comprende al menos una parte de una proteína mucina. “Al menos una parte” quiere decir que el polipéptido de mucina contiene al menos un dominio de mucina (por ejemplo, un sitio de glicosilación unido a O). La proteína mucina comprende la parte extracelular del polipéptido. Por ejemplo, el polipéptido de mucina comprende la parte extracelular de PSGL-1.

El polipéptido de alfa-globulina puede corresponder a todo o una parte de un polipéptido de alfa-globulina. Una proteína de fusión AV comprende al menos una parte de un polipéptido de alfa-globulina. “Al menos una parte” quiere decir que el polipéptido de alfa-globulina contiene al menos un sitio de glicosilación unido a N.

El primer polipéptido se glicosila mediante una o más glicosiltransferasas. El primer polipéptido se glicosila mediante 2, 3, 5 o más glicosiltransferasas. La glicosilación es secuencial o consecutiva. Alternativamente, la glicosilación es simultánea o al azar, es decir, en ningún orden particular. El primer polipéptido se glicosila mediante cualquier enzima que puede añadir determinantes de ácido siálico unidos a N o unidos a O a una estructura principal de proteína. Por ejemplo, el primer polipéptido se glicosila mediante una o más de las siguientes: una 2 β6-N-acetilglucosaminiltransferasa central, una 3 β3-N-acetilglucosaminiltransferasa central, una β4-galactosiltransferasa, una β3-galactosiltransferasa, una α3-sialiltransferasa, una α6-sialiltransferasa, una α2-fucosiltransferasa, una α3/4-fucosiltransferasa y/o una α3-N-acetilgalactosaminiltransferasa. El primer polipéptido se glicosila mucho más que la glicoproteína nativa (es decir, de tipo natural). Por ejemplo, el primer polipéptido tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 ó 10 veces o más glicanos que una glicoproteína nativa. El primer polipéptido debe más del 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90% o 95% de su masa a hidrato de carbono.

Dentro de la proteína de fusión, el término “unido operativamente” pretende indicar que los polipéptidos primero y segundo están unidos químicamente (lo más normalmente mediante un enlace covalente tal como un enlace peptídico) de manera que permite la glicosilación unida a O y/o unida a N del primer polipéptido. Cuando se usa para referirse a ácidos nucleicos que codifican para un polipéptido de fusión, el término unido operativamente significa que un ácido nucleico que codifica para la mucina o el polipéptido de alfa-globulina y el polipéptido distinto de mucina están fusionados en marco entre sí. El polipéptido distinto de mucina puede fusionarse al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del polipéptido de mucina o alfa-globulina.

La proteína de fusión AV se une a uno o más restos adicionales. Por ejemplo, la proteína de fusión AV puede unirse adicionalmente a una proteína de fusión GST en la que las secuencias de la proteína de fusión AV se fusionan al extremo C-terminal de las secuencias de GST (es decir, glutatión S-transferasa). Tales proteínas de fusión pueden facilitar la purificación de la proteína de fusión AV. Alternativamente, la proteína de fusión AV puede unirse adicionalmente a un soporte sólido. Los expertos en la técnica conocen diversos soportes sólidos. Tales composiciones pueden facilitar la eliminación de anticuerpos anti-grupo sanguíneo. Por ejemplo, la proteína de fusión AV se une a una partícula compuesta, por ejemplo, por compuestos de metal, sílice, látex, material polimérico; una placa de microtitulación; nitrocelulosa, o nailon o una combinación de los mismos. Las proteínas de fusión AV unidas a un soporte sólido se usan como un absorbente para eliminar microbios o toxinas bacterianas de una

muestra biológica, tal como tejido gástrico, sangre o plasma.

La proteína de fusión incluye una secuencia señal heteróloga (es decir, una secuencia de polipéptido que no está presente en un polipéptido codificado por un ácido nucleico de mucina o globulina) en su extremo N-terminal. Por ejemplo, la secuencia señal de mucina o alfa-glicoproteína nativa puede eliminarse y sustituirse por una secuencia señal de otra proteína. En determinadas células huésped (por ejemplo, células huésped de mamífero), la expresión y/o secreción de polipéptidos puede aumentarse a través del uso de una secuencia señal heteróloga.

Una proteína de fusión o quimérica de la invención puede producirse mediante técnicas de ADN recombinante habituales. Por ejemplo, fragmentos de ADN que codifican para las diferentes secuencias de polipéptido se ligan entre sí en marco según técnicas convencionales, por ejemplo, empleando extremos terminales romos o en bisel para ligamiento, digestión por enzimas de restricción para proporcionar extremos terminales apropiados, relleno de extremos cohesivos según sea apropiado, tratamiento con fosfatasa alcalina para evitar unión indeseable y ligamiento enzimático. El gen de fusión se sintetiza mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Alternativamente, se lleva a cabo amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores de anclaje que dan lugar a proyecciones complementarias entre dos fragmentos génicos consecutivos que posteriormente pueden aparearse y volver a amplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al.* (eds.) CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, John Wiley & Sons, 1992). Además, están disponibles comercialmente muchos vectores de expresión que codifican para un resto de fusión (por ejemplo, una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina). Puede clonarse un ácido nucleico que codifica para una mucina o una alfa-globulina en un vector de expresión de este tipo de manera que el resto de fusión se une en marco a la proteína de inmunoglobulina.

Los polipéptidos de fusión AV pueden existir como oligómeros, tales como dímeros, trímeros o pentámeros. Preferiblemente, el polipéptido de fusión AV es un dímero.

El primer polipéptido, y/o ácidos nucleicos que codifican para el primer polipéptido, se construye usando secuencias que codifican para mucina o alfa-globulina conocidas en la técnica. Las fuentes adecuadas para polipéptidos de mucina y ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de mucina incluyen los n.ºs de registro de GenBank NP663625 y NM145650, CAD10625 y AJ417815, XP140694 y XM140694, XP006867 y XM006867 y NP00331777 y NM009151 respectivamente, y se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad. Las fuentes adecuadas para polipéptidos de alfa-globulina y ácidos nucleicos que codifican para polipéptidos de alfa-globulina incluyen los n.ºs de registro de GenBank AAH26238 y BC026238; NP000598; y BC012725, AAH12725 y BC012725, y NP44570 y NM053288 respectivamente, y se incorporan al presente documento como referencia en su totalidad.

El resto de polipéptido de mucina se proporciona como un polipéptido de mucina variante que tiene una mutación en la secuencia de mucina que se produce de manera natural (de tipo natural) que da como resultado un aumento del contenido en hidratos de carbono (con respecto a la secuencia no mutada). Por ejemplo, el polipéptido de mucina variante comprendía sitios de glicosilación unidos a O adicionales en comparación con la mucina de tipo natural. Alternativamente, el polipéptido de mucina variante comprende mutaciones de la secuencia de aminoácidos que dan como resultado un aumento del número de residuos de serina, treonina o prolina en comparación con un polipéptido de mucina de tipo natural. Este aumento del contenido en hidratos de carbono puede evaluarse determinando la razón de proteína con respecto a hidrato de carbono de la mucina mediante métodos conocidos por los expertos en la técnica.

De manera similar, el resto de polipéptido de alfa-globulina se proporciona como un polipéptido de alfa-globulina variante que tiene una mutación en la secuencia de alfa-globulina que se produce de manera natural (de tipo natural) que da como resultado un aumento del contenido en hidratos de carbono (con respecto a la secuencia no mutada). Por ejemplo, el polipéptido de alfa-globulina variante comprendía sitios de glicosilación unidos a N adicionales en comparación con la alfa-globulina de tipo natural.

Alternativamente, el resto de polipéptido de mucina o de alfa-globulina se proporciona como un polipéptido de mucina o de alfa-globulina variante que tiene mutaciones en la secuencia de mucina o alfa-globulina que se producen de manera natural (de tipo natural) que dan como resultado una secuencia de mucina o alfa-globulina más resistente a proteólisis (con respecto a la secuencia no mutada).

El primer polipéptido incluye PSGL-1 de longitud completa. Alternativamente, el primer polipéptido comprende polipéptido de PSGL-1 menor de longitud completa tal como la parte extracelular de PSGL-1. Por ejemplo el primer polipéptido tiene menos de 400 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos de o igual a 300, 250, 150, 100, 50 ó 25 aminoácidos de longitud.

El primer polipéptido incluye alfa-globulina ácida de longitud completa. Alternativamente, el primer polipéptido comprende polipéptidos de alfa-globulina ácida menores de longitud completa. Por ejemplo el primer polipéptido tiene menos de 200 aminoácidos de longitud, por ejemplo, menos de o igual a 150, 100, 50 ó 25 aminoácidos de longitud.

El segundo polipéptido es preferiblemente soluble. En algunas realizaciones, el segundo polipéptido incluye una secuencia que facilita la asociación del polipéptido de fusión AV con un segundo polipéptido de mucina o de alfa-globulina. El segundo polipéptido incluye al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina. "Al menos una región" pretende incluir cualquier parte de una molécula de inmunoglobulina, tal como la cadena ligera, cadena pesada, región FC, región Fab, región Fv o cualquier fragmento de las mismas. En la técnica se conocen polipéptidos de fusión inmunoglobulina y se describen en, por ejemplo, las patentes estadounidenses n.ºs 5,516,964; 5,225,538; 5,428,130; 5,514,582; 5,714,147; y 5,455,165.

El segundo polipéptido comprende un polipéptido de inmunoglobulina de longitud completa. Alternativamente, el segundo polipéptido comprende polipéptido de inmunoglobulina menor de longitud completa, por ejemplo, una cadena pesada, cadena ligera, Fab, Fab2, Fv o Fc. Preferiblemente, el segundo polipéptido incluye la cadena pesada de un polipéptido de inmunoglobulina. Más preferiblemente, el segundo polipéptido incluye la región Fc de un polipéptido de inmunoglobulina.

El segundo polipéptido tiene menos función efectora que la función efectora de una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo natural. Alternativamente, el segundo polipéptido tiene una función efectora similar o mayor que una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina de tipo natural. Una función efectora de Fc incluye por ejemplo, unión a receptores de Fc, fijación del complemento y actividad de reducción de células T. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6,136,310). En la técnica se conocen métodos de evaluación de la actividad de reducción de células T, función efectora de Fc y estabilidad de anticuerpos. En una realización, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por el receptor de Fc. Alternativamente, el segundo polipéptido tiene baja o ninguna afinidad por la proteína C1q del complemento.

Los polipéptidos en cuestión pueden producirse usando vectores, preferiblemente vectores de expresión, que contienen un ácido nucleico que codifica para polipéptidos de mucina. El vector contiene un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de mucina o de alfa-globulina unido operativamente a un ácido nucleico que codifica para un polipéptido de inmunoglobulina, o derivados, fragmentos, análogos u homólogos del mismo. Adicionalmente, el vector comprende un ácido nucleico que codifica para una glicosiltransferasa tal como una α 2-fucosiltransferasa. Tal como se usa en el presente documento, el término "vector" se refiere a una molécula de ácido nucleico que puede transportar otro ácido nucleico al que se ha unido. Un tipo de vector es un "plásmido", que se refiere a un bucle de ADN bicatenario circular en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales. Otro tipo de vector es un vector viral, en el que pueden ligarse segmentos de ADN adicionales en el genoma viral. Determinados vectores pueden realizar una replicación autónoma en una célula huésped en la que se han introducido (por ejemplo, vectores bacterianos que tiene un origen de replicación bacteriano y vectores de mamífero episómicos). Otros vectores (por ejemplo, vectores de mamífero no episómicos) se integran en el genoma de una célula huésped tras la introducción en la célula huésped, y de ese modo se replican junto con el genoma del huésped. Además, determinados vectores pueden dirigir la expresión de genes a los que se unen operativamente. Tales vectores se denominan en el presente documento "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad en técnicas de ADN recombinante están a menudo en forma de plásmidos. En la presente memoria descriptiva, "plásmido" y "vector" pueden usarse de manera intercambiable ya que el plásmido es la forma más comúnmente usada de vector. Sin embargo, se pretende que la invención incluya otras formas de vectores de expresión, tales como vectores virales (por ejemplo, retrovirus, adenovirus y virus adenoasociados con replicación defectuosa), que cumplen funciones equivalentes.

Los vectores de expresión recombinante de la invención comprenden un ácido nucleico de la invención en una forma adecuada para la expresión del ácido nucleico en una célula huésped, lo que significa que los vectores de expresión recombinante incluyen una o más secuencias reguladoras, seleccionadas basándose en las células huésped que van a usarse para la expresión, que se unen operativamente a la secuencia de ácido nucleico que va a expresarse. Dentro de un vector de expresión recombinante, "operativamente unido" pretende significar que la secuencia de nucleótidos de interés se une a la(s) secuencia(s) reguladora(s) de una manera que permite la expresión de la secuencia de nucleótidos (por ejemplo, en un sistema de transcripción/traducción *in vitro* o en una célula huésped cuando el vector se introduce en la célula huésped).

El término "secuencia reguladora" pretende incluir promotores, potenciadores y otros elementos de control de la expresión (por ejemplo, señales de poliadenilación). Tales secuencias reguladoras se describen, por ejemplo, en Goeddel, GENE EXPRESION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990). Las secuencias reguladoras incluyen aquellas que dirigen la expresión constitutiva de una secuencia de nucleótidos en muchos tipos de células huésped y aquellas que dirigen la expresión de la secuencia de nucleótidos sólo en determinadas células huésped (por ejemplo, secuencias reguladoras específicas de tejido). Los expertos en la técnica apreciarán que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped que va a transformarse, el nivel de expresión de proteína deseado, etc. Los vectores de expresión de la invención pueden introducirse en células huésped para producir de ese modo proteínas o péptidos, incluyendo proteínas o péptidos de fusión, codificados por ácidos nucleicos descritos en el presente documento (por ejemplo, polipéptidos de fusión LAV, formas mutantes de polipéptidos de fusión AV, etc.).

Los vectores de expresión recombinante de la invención pueden diseñarse para la expresión de polipéptidos de

fusión AV en células procariotas o eucariotas. Por ejemplo, pueden expresarse polipéptidos de fusión AV en células bacterianas tales como *Escherichia coli*, células de insecto (usando vectores de expresión de baculovirus) células de levadura o células de mamífero. Células huésped adecuadas se comentan adicionalmente en Goeddel, GENE EXPRESION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990).
 5 Alternativamente, el vector de expresión recombinante puede transcribirse y traducirse *in vitro*, por ejemplo usando secuencias reguladoras del promotor T7 y polimerasa T7.

La expresión de proteínas en procariotas se lleva a cabo lo más a menudo en *Escherichia coli* con vectores que contienen promotores constitutivos o inducibles que dirigen la expresión de proteínas o bien de fusión o bien no de fusión. Los vectores de fusión añaden varios aminoácidos a una proteína codificada por los mismos, habitualmente al extremo amino terminal de la proteína recombinante. Tales vectores de fusión cumplen normalmente tres fines: (i) aumentar la expresión de proteína recombinante; (ii) aumentar la solubilidad de la proteína recombinante; y (iii) ayudar en la purificación de la proteína recombinante actuando como ligando en la purificación por afinidad. A menudo, en vectores de expresión de fusión, se introduce un sitio de escisión proteolítica en la unión del resto de fusión y la proteína recombinante para permitir la separación de la proteína recombinante del resto de fusión de forma posterior a la purificación de la proteína de fusión. Tales enzimas, y sus secuencias de reconocimiento relacionadas, incluyen Factor Xa, trombina y enterocinasa. Los vectores de expresión de fusión típicos incluyen pGEX (Pharmacia Biotech Inc; Smith y Johnson, 1988. Gene 67: 31-40), pMAL (New England Biolabs, Beverly, Mass.) y pRIT5 (Pharmacia, Piscataway, N.J.) que fusionan glutatión S-transferasa (GST), proteína de unión a maltosa E, o proteína A, respectivamente, a la proteína recombinante diana.

Los ejemplos de vectores de expresión de *E. coli* no de fusión inducibles adecuados incluyen pTrc (Amrann *et al.*, (1988) Gene 69:301-315) y pET 11d (Studier *et al.*, GENE EXPRESION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 60-89).

Una estrategia para maximizar la expresión de proteína recombinante en *E. coli* es expresar la proteína en una bacteria huésped con una capacidad alterada para escindir proteolíticamente la proteína recombinante. Véase, por ejemplo, Gottesman, GENE EXPRESION TECHNOLOGY: METHODS IN ENZYMOLOGY 185, Academic Press, San Diego, Calif. (1990) 119-128. Otra estrategia es alterar la secuencia de ácido nucleico del ácido nucleico que va a insertarse en un vector de expresión de modo que los codones individuales para cada aminoácido son aquellos utilizados preferentemente en *E. coli* (véase, por ejemplo, Wada, *et al.*, 1992. Nucl. Acids Res. 20: 2111-2118). Tal alteración de secuencias de ácido nucleico de la invención puede llevarse a cabo mediante técnicas de síntesis de ADN habituales.

El vector de expresión de polipéptido de fusión AV es un vector de expresión de levadura. Los ejemplos de vectores para la expresión en la levadura *Saccharomyces cerevisiae* incluyen pYepSec1 (Baldari, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 229-234), pMFa (Kurjan y Herskowitz, 1982. Cell 30: 933-943), pJRY88 (Schultz *et al.*, 1987. Gene 54: 113-123), pYES2 (Invitrogen Corporation, San Diego, Calif.) y picZ (Invitrogen Corp, San Diego, Calif.).

Alternativamente, puede expresarse el polipéptido de fusión AV en células de insecto usando vectores de expresión de baculovirus. Los vectores de baculovirus disponibles para la expresión de proteínas en células de insecto cultivadas (por ejemplo, células SF9) incluyen la serie pAc (Smith, *et al.*, 1983. Mol. Cell. Biol. 3: 2156-2165) y la serie pVL (Lucklow y Summers, 1989. Virology 170: 31-39).

Un ácido nucleico de la invención se expresa en células de mamífero usando un vector de expresión de mamífero. Los ejemplos de vectores de expresión de mamífero incluyen pCDM8 (Seed, 1987. Nature 329: 840) y pMT2PC (Kaufman, *et al.*, 1987. EMBO J. 6: 187-195). Cuando se usa en células de mamífero, las funciones de control del vector de expresión a menudo están proporcionadas por elementos reguladores virales. Por ejemplo, los promotores comúnmente usados se derivan de polioma, adenovirus 2, citomegalovirus y virus de simio 40. Para otros sistemas de expresión adecuados para células tanto procariotas como eucariotas véanse, por ejemplo, los capítulos 16 y 17 de Sambrook, *et al.*, MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989.

Otro aspecto de la invención está relacionado con células huésped en las que se ha introducido un vector de expresión recombinante de la invención. Los términos "célula huésped" y "célula huésped recombinante" se usan de manera intercambiable en el presente documento. Se entiende que tales términos no sólo se refieren a la célula objeto particular sino también a toda la progenie o posible progenie de tal célula. Debido a que pueden producirse determinadas modificaciones en generaciones subsiguientes debido o bien a mutación o bien a influencias ambientales, tal progenie puede no ser, de hecho, idéntica a la célula original, pero todavía se incluye dentro alcance del término tal como se usa en el presente documento.

Una célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, pueden expresarse polipéptidos de fusión AV en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levadura o células de mamífero (tales como de ser humano, células de ovario de hámster chino (CHO) o células COS). Los expertos en la técnica conocen otras células huésped adecuadas.

Puede introducirse ADN vector en células procariotas o eucariotas mediante técnicas de transformación o transfección convencionales. Tal como se usan en el presente documento, se pretende que los términos “transformación” y “transfección” se refieran a una variedad de técnicas reconocidas en la técnica para introducir ácido nucleico foráneo (por ejemplo, ADN) en una célula huésped, incluyendo precipitación conjunta con fosfato de calcio o cloruro de calcio, transfección mediada por DEAE-dextrano, lipofección o electroporación. Pueden encontrarse métodos adecuados para transformar o transfectar células huésped en Sambrook, *et al.* (MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL. 2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989) y otros manuales de laboratorio.

Para la transfección estable de células de mamífero, se conoce que, dependiendo del vector de expresión y la técnica de transfección usados, sólo una pequeña fracción de células puede integrar el ADN foráneo en su genoma. Con el fin de identificar y seleccionar estos integrantes, generalmente se introduce un gen que codifica para un marcador seleccionable (por ejemplo, resistencia a antibióticos) en las células huésped junto con el gen de interés. Diversos marcadores seleccionables incluyen aquellos que confieren resistencia a fármacos, tales como G418, higromicina y metotrexato. Puede introducirse un ácido nucleico que codifica para un marcador seleccionable en una célula huésped en el mismo vector que el que codifica para los polipéptidos de fusión o puede introducirse en un vector separado. Las células transfectadas de manera estable con el ácido nucleico introducido pueden identificarse mediante selección de fármaco (por ejemplo, las células que tienen incorporado el gen de marcador seleccionable sobrevivirán, mientras que las otras células morirán).

Una célula huésped de la invención, tal como una célula huésped procariota o eucariota en cultivo, puede usarse para producir (es decir, expresar) polipéptidos de fusión AV. Por consiguiente, la invención proporciona además métodos para producir polipéptidos de fusión AV usando las células huésped de la invención. En una realización, el método comprende cultivar la célula huésped de la invención (en la que se ha introducido un vector de expresión recombinante que codifica para polipéptidos de fusión AV) en un medio adecuado de manera que se produzcan los polipéptidos de fusión AV. En otra realización, el método comprende además aislar el polipéptido AV del medio o la célula huésped.

Los polipéptidos de fusión AV pueden aislarse y purificarse según condiciones convencionales, tales como extracción, precipitación, cromatografía, cromatografía por afinidad, electroforesis o similares. Por ejemplo, las proteínas de fusión de inmunoglobulinas pueden purificarse haciendo pasar una disolución a través de una columna que contiene proteína A o proteína G inmovilizada que se une selectivamente a la parte Fc de la proteína de fusión. Véase, por ejemplo, Reis, K. J., *et al.*, J. Immunol. 132:3098-3102 (1984); solicitud de PCT, publicación n.º WO87/00329. El polipéptido de fusión puede eluirse mediante tratamiento con una sal caotrópica o mediante elución con ácido acético acuoso (1 M).

Alternativamente, pueden sintetizarse químicamente polipéptidos de fusión AV según la invención usando métodos conocidos en la técnica. La síntesis química de polipéptidos se describe en, por ejemplo. Una variedad de métodos de síntesis de proteínas son comunes en la técnica, incluyendo síntesis usando un sintetizador de péptidos. Véase, por ejemplo, Peptide Chemistry, A Practical Textbook, Bodansky, Ed. Springer-Verlag, 1988; Merrifield, Science 232: 241-247 (1986); Barany, *et al.*, Intl. J. Peptide Protein Res. 30: 705-739 (1987); Kent, Ann. Rev. Biochem. 57:957-989 (1988) y Kaiser, *et al.*, Science 243: 187-198 (1989). Los polipéptidos se purifican de modo que están sustancialmente libres de precursores químicos u otros productos químicos usando técnicas de purificación de péptidos convencionales. La expresión “sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones de péptido en las que el péptido se separa a partir de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis del péptido. En una realización, la expresión “sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos” incluye preparaciones de péptido que tienen menos de aproximadamente el 30% (en peso seco) de precursores químicos o productos químicos no peptídicos, más preferiblemente menos de aproximadamente el 20% de precursores químicos o productos químicos no peptídicos, todavía más preferiblemente menos de aproximadamente el 10% de precursores químicos o productos químicos no peptídicos, y lo más preferiblemente menos de aproximadamente el 5% de precursores químicos o productos químicos no peptídicos.

La síntesis química de polipéptidos facilita la incorporación de aminoácidos modificados o no naturales, incluyendo D-aminoácidos y otras moléculas orgánicas pequeñas. El reemplazo de uno o más L-aminoácidos en un péptido por las isoformas de D-aminoácido correspondientes puede usarse para aumentar la resistencia de péptidos a hidrólisis enzimática, y para potenciar una o más propiedades de péptidos biológicamente activos, es decir, unión a receptor, potencia funcional o duración de la acción. Véase, por ejemplo, Doherty, *et al.*, 1993. J. Med. Chem. 36: 2585-2594; Kirby, *et al.*, 1993. J. Med. Chem. 36:3802-3808; Morita, *et al.*, 1994. FEBS Lett. 353: 84-88; Wang, *et al.*, 1993. Int. J. Pept. Protein Res. 42: 392-399; Fauchere y Thiunieu, 1992. Adv. Drug Res. 23: 127-159.

La introducción de reticulaciones covalentes en una secuencia peptídica puede limitar conformacional y topográficamente la estructura principal del polipéptido. Esta estrategia puede usarse para desarrollar análogos peptídicos de los polipéptidos de fusión con aumento de la potencia, selectividad y estabilidad. Debido a que la entropía conformacional de un péptido cíclico es más baja que la de su equivalente lineal, la adopción de una conformación específica puede producirse con una disminución menor de la entropía para un análogo cíclico que

para un análogo acíclico, haciendo de ese modo que la energía libre para la unión sea más favorable. La macrociclización se logra a menudo formando un enlace amida entre los extremos C-terminal y N-terminal del péptido, entre una cadena lateral y el extremo C-terminal o N-terminal [por ejemplo, con $K_3Fe(CN)_6$ a pH 8,5] (Samson *et al.*, *Endocrinology*, 137: 5182-5185 (1996)), o entre dos cadenas laterales de aminoácido. Véase, por ejemplo, DeGrado, *Adv Protein Chem*, 39: 51-124 (1988). También se introducen puentes de disulfuro en secuencias lineales para reducir su flexibilidad. Véase, por ejemplo, Rose, *et al.*, *Adv Protein Chem*, 37: 1-109 (1985); Mosberg *et al.*, *Biochem Biophys Res Commun*, 106: 505-512 (1982). Además, se ha usado el reemplazo de residuos de cisteína por penicilamina (Pen, 3-mercapto-(D)valina) para aumentar la selectividad de algunas interacciones con receptores opiodes. Lipkowski y Carr, *Peptides: Synthesis, Structures, and Applications*, Gutte, ed., Academic Press págs. 287-320(1995).

Métodos de disminución de la unión viral

La unión viral a una célula se inhibe (por ejemplo se disminuye) poniendo en contacto un virus con el péptido de fusión AV de la invención. El virus es por ejemplo, un virus influenza A aviar.

La inhibición de la unión se caracteriza por una disminución de la entrada y replicación virales. Los virus se ponen en contacto directamente con el péptido AV. Alternativamente, el péptido AV se administra a un sujeto de manera sistémica. Los péptidos AV se administran en una cantidad suficiente para disminuir (por ejemplo, inhibir) la unión viral. La unión se mide usando ensayos de adhesión habituales conocidos en la técnica, por ejemplo midiendo la unión viral a células usando radiactividad, o mediante otros medios, virus marcados, detectando virus unidos usando anticuerpos anti-virales, o midiendo productos virales producidos tras la replicación viral.

Los métodos son útiles para aliviar los síntomas de una variedad de infecciones virales o una enfermedad asociada con una infección viral. La infección viral es por ejemplo, infección por virus influenza o calicivirus. Las enfermedades asociadas con infección viral incluyen por ejemplo, neumonía y gastroenteritis.

Los métodos descritos en el presente documento conducen a una reducción de la gravedad o al alivio de uno o más síntomas de una infección viral o trastorno tal como aquellos descritos en el presente documento. La infección viral o los trastornos asociados con una infección viral se diagnostican y/o monitorizan, normalmente por un médico usando metodologías habituales.

El sujeto es por ejemplo, cualquier mamífero, por ejemplo, un ser humano, primate, ratón, rata, perro, gato, vaca, caballo, cerdo. El tratamiento se administra antes de la infección microbiana o el diagnóstico del trastorno. Alternativamente, el tratamiento se administra después de que un sujeto tenga una infección.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar la infección microbiana o el trastorno asociado con una infección viral particular. El alivio de uno o más síntomas de la infección viral o el trastorno indica que el compuesto confiere un beneficio clínico.

Virus a modo de ejemplo

Virus influenza: los virus influenza A son altamente, pero no completamente, específicos de especie y receptor. Los virus influenza A aviares que usan ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ como receptor no infectan fácilmente al ser humano y los virus influenza A humanos que usan ácido siálico unido en $\alpha 2,6$ no afectan fácilmente a las aves acuáticas. Las vías respiratorias humanas tienen abundancia de ácido siálico unido en $\alpha 2,6$, y se han presentado pruebas recientes de que las células no ciliadas de la tráquea son la diana principal para el virus influenza humano. Al contrario que las células no ciliadas de la tráquea, sus células ciliadas contienen ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ y pueden soportar la replicación de algunas variantes de influenza aviar. Los virus influenza también pueden presentar especificidad de órgano. Por ejemplo, durante el brote en los Países Bajos de H7N7 en 2003, la manifestación principal de la infección en seres humanos fue ocular en lugar de respiratoria. Se sugirió que el virus se transmitía desde los casos primarios hasta más del 50% de sus contactos domésticos. Por tanto, tanto los ojos como las vías respiratorias pueden servir como entrada a la colonización en seres humanos para los virus influenza A aviares.

Virus oculotrópicos: Adenoviridae es una gran familia con aproximadamente 50 genotipos que provocan síntomas principalmente respiratorios o gastrointestinales. Ad8, Ad19 y Ad37 infectan los ojos, siendo la enfermedad más importante queratoconjuntivitis epidémica. Estos adenovirus presentan tropismo por el ojo uniéndose a ácido siálico unido en $\alpha 2,3$, que es el tipo más frecuente de unión de ácido siálico en células de la córnea y la conjuntiva. De manera interesante, las mucinas del fluido lacrimal portan glicanos que terminan con ácido siálico unido en $\alpha 2,6$, y por consiguiente son ineficaces en lo que se refiere a la unión y el bloqueo de la invasión por adenovirus oculotrópicos. De manera similar, enterovirus 70 (EV70) también usa ácido siálico unido en $\alpha 2,3$ como su receptor. Provoca una enfermedad ocular algo menos grave, pero incluso más contagiosa, conocida como conjuntivitis hemorrágica aguda.

Virus de Norwalk: Sólo algunos virus humanos usan glicopéptidos neutros como receptores y el parvovirus B19

humano y algunos miembros del género *Norovirus* son los ejemplos más conocidos. Los norovirus provocan brotes graves de diarrea y vómitos en la población general así como entre pacientes y miembros de la plantilla de hospitales y otras instituciones sanitarias. Los antígenos ABH de grupo histológico-sanguíneo probablemente son receptores de norovirus, y un gen FUT2 (secretor) funcional es un prerrequisito para que un individuo sea susceptible de infección por norovirus. También se ha mostrado que es necesario que el antígeno H de grupo sanguíneo se porte por cadenas de sacárido centrales específicas, concretamente de los tipos 1 (Gal β 1,3GlcNAc) y 3 (Gal β 1,3GalNAc), con el fin de actuar como receptores para muchos norovirus. Además, el genogrupo I (por ejemplo virus de tipo Norwalk) y el genogrupo II (por ejemplo virus de tipo Snow Mountain) de norovirus difieren en la preferencia por el receptor también con respecto a la capacidad para unirse a antígenos de grupo histológico-sanguíneo ABO. Hasta la fecha se han descrito tres patrones de unión: el virus de tipo Norwalk (genogrupo I) se une a A/O, la cepa MOH (genotipo II) se une a A/B y la cepa VA387 se une a A/B/O. Aproximadamente, el 20% de la población caucásica y africana son no secretores, es decir portan un gen FUT2 defectuoso, y son resistentes de manera natural a la mayoría de las cepas de norovirus. Además de estas especificidades de unión, recientemente se ha mostrado que algunas cepas de norovirus pueden aceptar sustituciones de monosacárido adicionales de los epítomos mencionados anteriormente de hidratos de carbono. Por ejemplo, aparte del grupo sanguíneo H y A, se unen estructuras relacionadas tales como A Lewis b y A Lewis y. Además, aunque parece que se prefieren las cadenas de sacáridos centrales 1 y 3, algunas cepas también pueden reconocer estructuras basadas en cadena de tipo 2, por ejemplo A2 y las A Lewis y mencionadas anteriormente.

Composiciones farmacéuticas que incluyen polipéptidos de fusión AV o ácidos nucleicos que los codifican

Las proteínas de fusión AV, o moléculas de ácido nucleico que codifican estas proteínas de fusión, (también denominadas en el presente documento "agentes terapéuticos" o "compuestos activos") de la invención, y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de las mismas, pueden incorporarse en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Tales composiciones comprenden normalmente la molécula de ácido nucleico, proteína o anticuerpo y un portador farmacéuticamente aceptable. Tal como se usa en el presente documento, "portador farmacéuticamente aceptable" pretende incluir todos y cada uno de disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y que retrasan la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia habitual en el campo, que se incorpora al presente documento como referencia. Los ejemplos preferidos de tales portadores o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de Ringer, disolución de dextrosa y albúmina sérica humana al 5%. También pueden usarse liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. En la técnica se conoce bien el uso de tales medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. También pueden incorporarse compuestos activos complementarios en las composiciones.

Los agentes activos dados a conocer en el presente documento también pueden formularse como liposomas. Los liposomas se preparan mediante métodos conocidos en la técnica, tal como se describe en Epstein *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 82: 3688 (1985); Hwang *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77: 4030 (1980); y las patentes estadounidenses n.ºs 4,485,045 y 4,544,545. Liposomas con tiempo de circulación potenciado se dan a conocer en la patente estadounidense n.º 5,013,556.

Pueden generarse liposomas particularmente útiles mediante el método de evaporación en fase inversa con una composición lipídica que comprende fosfatidilcolina, colesterol y fosfatidiletanolamina derivatizada con PEG (PEG-PE). Los liposomas se extruyen a través de filtros de tamaño de poro definido para proporcionar liposomas con el diámetro deseado.

Se formula una composición farmacéutica de la invención para que sea compatible con su vía de administración prevista. Los ejemplos de vías de administración incluyen administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las disoluciones o suspensiones usadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril tal como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metilparabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiaminatetraacético (EDTA); tampones tales como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. El pH puede ajustarse con ácidos o bases, tales como ácido clorhídrico o hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de múltiples dosis de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para su uso en inyectables incluyen disoluciones acuosas (cuando sean solubles en agua) o dispersiones estériles y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida hasta el grado en que puedan usarse con jeringa de manera fácil. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe

preservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares) y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. La prevención de la acción de microorganismos puede lograrse mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio, en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede producirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las disoluciones inyectables estériles pueden prepararse incorporando el compuesto activo (por ejemplo, una proteína de fusión AV) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de componentes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido por esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros componentes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de disoluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son secado a vacío y liofilización que proporcionan un polvo del principio activo más cualquier componente deseado adicional a partir de una disolución filtrada previamente en condiciones estériles de los mismos.

Las composiciones orales incluyen generalmente un diluyente inerte o un portador comestible. Pueden encerrarse en cápsulas de gelatina o comprimirse para dar lugar a comprimidos. Para los fines de administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y usarse en forma de comprimidos, trociscos o cápsulas. Las composiciones orales también pueden prepararse usando un portador líquido para su uso como colutorio, en las que el compuesto en el portador líquido se aplica por vía oral y se enjuaga y se expectora o se traga. Los agentes de unión y/o materiales adyuvantes farmacéuticamente compatibles, pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, pastillas, cápsulas, trociscos y similares pueden contener cualquiera de los siguientes componentes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente disgregante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de una pulverización en aerosol desde un envase o dispensador a presión que contiene un propelente adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, en la formulación se usan agentes penetrantes apropiados para la barrera en la que han de permear. Tales agentes penetrantes se conocen generalmente en la técnica, e incluyen, por ejemplo, para la administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa puede lograrse a través del uso de supositorios o pulverizaciones nasales. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas tal como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también pueden prepararse en forma de supositorio (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para la administración rectal.

Los compuestos activos se preparan con portadores que protegerán el compuesto frente a una eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, incluyendo implantes y sistemas de administración microencapsulados. Pueden usarse polímeros biodegradables, biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhidridos, poli(ácido glicólico), colágeno, poliortoésteres y poli(ácido láctico). Los métodos para la preparación de tales formulaciones resultarán evidentes para los expertos en la técnica. Los materiales también pueden obtenerse comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. También pueden usarse suspensiones liposómicas (incluyendo liposomas dirigidos a células infectadas con anticuerpos monoclonales frente a antígenos virales) como portadores farmacéuticamente aceptables. Estos pueden prepararse según métodos conocidos por los expertos en la técnica, por ejemplo, tal como se describe en la patente estadounidense n.º 4,522,811.

Las composiciones orales o parenterales se formulan en forma farmacéutica unitaria por su facilidad de administración y uniformidad de dosificación. La forma farmacéutica unitaria tal como se usa en el presente documento se refiere unidades físicamente diferenciadas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto que va a tratarse; conteniendo cada unidad una cantidad predeterminada del compuesto activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado en asociación con el portador farmacéutico requerido. Las especificaciones para las formas farmacéuticas unitarias de la invención están dictadas por y dependen directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que va a lograrse, y las limitaciones

inherentes en la técnica de composición de un compuesto activo de este tipo para el tratamiento de individuos.

Las moléculas de ácido nucleico de la invención pueden insertarse en vectores y usarse como vectores de terapia génica. Los vectores de terapia génica pueden administrarse a un sujeto mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, administración local (véase, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5,328,470) o mediante inyección estereotáctica (véase, por ejemplo, Chen, *et al.*, 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 3054-3057). La preparación farmacéutica del vector de terapia génica puede incluir el vector de terapia génica en un diluyente aceptable, o puede comprender una matriz de liberación lenta en la está incrustado el vehículo de administración del gene. Alternativamente, cuando el vector de administración de gen completo puede producirse intacto a partir de células recombinantes, por ejemplo, vectores retrovirales, la preparación farmacéutica puede incluir una o más células que producen el sistema de administración del gen.

Pueden prepararse preparaciones de liberación sostenida, si se desea. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen el anticuerpo, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(metacrilato de 2-hidroxietilo), o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente estadounidense n.º 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y L-glutamato de γ -etilo, acetato de etilvinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli(ácido D-(-)-3-hidroxibutírico). Aunque polímeros tales como acetato de etilvinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos.

Las composiciones farmacéuticas pueden incluirse en un envase, paquete o dispensador junto con instrucciones para su administración.

La invención se ilustrará adicionalmente en los siguientes ejemplos no limitativos.

EJEMPLO 1: MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA GENÉTICA DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES QUE SECRETAN FUSIONES DE FC DE IgG DE LIGANDO DE GLICOPROTEÍNA P-SELECTINA-1 Y α_1 -GLICOPROTEÍNA ÁCIDA QUE PORTA GLICANOS SIA α 3GAL β 4GLCNAC β

Se transfectarán de forma estable los plásmidos de expresión PSGL-1/mIgG_{2b} o AGP/mIgG_{2b} solo en células COS o 293 que tienen actividad 2 α 6GlcNAc transferasa (T) central endógena, o junto con la 2 β 6GlcNAc-T1 central en células CHOK1. Todas estas líneas celulares tienen actividad β 1,4-galactosiltransferasa endógena que realizará la actividad de cadena de tipo 2 (Ga1 β 1,4GlcNAc) y α 2,3-sialiltransferasa que llevará a cabo la etapa de sialilación final durante la biosíntesis del epítipo deseado, Sia α 3Gal β 4GlcNAc β . Se seleccionan clones estables basándose en la resistencia a diferentes fármacos de selección, por ejemplo puomicina y zeocina.

EJEMPLO 2: MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA GENÉTICA DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES QUE SECRETAN FUSIONES DE FC DE IgG DE LIGANDO DE GLICOPROTEÍNA P-SELECTINA-1 Y α_1 -GLICOPROTEÍNA ÁCIDA QUE PORTA GLICANOS SIA α 6GAL β 4GLCNA β

Se transfectarán de manera estable líneas celulares preparadas tal como se describió anteriormente, con ADNc de α 2,6-sialiltransferasa (ST6GalT I o II) con el fin de desviar la sialilación hacia ácido siálico unido en α 2,6. Con el fin de reducir la α 2,3-sialilación, puede ser necesario regular por disminución la expresión de α 2,3-sialiltransferasa mediante el uso de ARNip que escinde ARNm de α 2,3-sialiltransferasa.

EJEMPLO 3: MODIFICACIÓN POR INGENIERÍA GENÉTICA DE LÍNEAS CELULARES ESTABLES QUE SECRETAN FUSIONES DE FC DE IgG DE LIGANDO DE GLICOPROTEÍNA P-SELECTINA-1 Y α_1 -GLICOPROTEÍNA ÁCIDA QUE PORTA GLICANOS FUC α 2GAL β 3GALNAC β -SER/THR O FUC α 2GAL β 3GLCNAC β -R

Se transfectarán de manera estable células CHO-K1 con los plásmidos de expresión PSGL-1/mIgG_{2b} o AGP/mIgG_{2b} y el gen FUT2 con el fin de obtener el determinante Fuc α 2Gal β 3GalNAc β -Ser/Thr en las proteínas de fusión, y con 3 β 3GlcNAc-T6, β 3Gal-TV y FUT2 centrales con el fin de obtener el determinante Fuc α 2Gal β 3GlcNAc β -R. Con el fin de reducir la α 2,3/6-sialilación puede ser necesario regular por disminución la expresión de α 2,3/6-sialiltransferasa mediante el uso de ARNip que escinde ARNm de α 2,3/6-sialiltransferasa.

EJEMPLO 4: INHIBICIÓN DE LA ADHESIÓN E INFECCIÓN VIRALES *IN VITRO*

Se usarán virus y células diana relevantes para evaluar la capacidad inhibidora de las proteínas de fusión descritas anteriormente con respecto a la prevención de la unión y replicación virales en células huésped susceptibles.

EJEMPLO 5: VÍAS DE ADMINISTRACIÓN

- 5 Se administrará de antemano PSGL-1/ o AGP/mIgG_{2b} recombinante que porta Sia α 3Gal β 4GlcNAc β localmente en el ojo con el fin de tratar o prevenir la conjuntivitis provocada por virus oculotrópicos tales como influenza aviar, adenovirus 37 y enterovirus 70. Las proteínas de fusión recombinantes sustituidas con Sia α 6Gal β 4GlcNAc β se inhalarán como polvo o aerosol con el fin de tratar o prevenir la infección por virus influenza A humano de las vías respiratorias. Se tratará o prevendrá la infección por norovirus mediante ingestión o inhalación oral de proteínas de fusión de IgG recombinantes de PSGL-1, o una proteína de tipo mucina similar, o AGP que porta epítomos H de grupo sanguíneo (Fuc α 2Gal β 1-R) basándose en el tipo 3 o tipo 1.

REIVINDICACIONES

1. Polipéptido de fusión para su uso en un método para disminuir la adhesión de un virus a una célula poniendo en contacto el virus con dicho polipéptido de fusión, en el que el polipéptido de fusión comprende un primer polipéptido unido operativamente a un segundo polipéptido en el que el primer polipéptido porta al menos un glicano seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) un glicano Sia α 3Gal β 4GlcNAc β ,
 - b) un glicano Sia α 3Gal β 3GlcNAc β ,y el segundo polipéptido comprende al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina, y en el que el primer polipéptido es un polipéptido de mucina que incluye una parte extracelular de un ligando de glicoproteína P-selectina-1 o en el que el primer polipéptido comprende al menos una región de un polipéptido de alfa-glicoproteína.
2. Polipéptido de fusión para su uso en la prevención de infección viral o alivio de un síntoma de una infección por virus en un sujeto que lo necesita, en el que el polipéptido de fusión comprende un primer polipéptido unido operativamente a un segundo polipéptido en el que el primer polipéptido porta al menos un glicano seleccionado del grupo que consiste en:
 - a) un glicano Sia α 3Gal β 4GlcNAc β ,
 - b) un glicano Sia α 3Gal β 3GlcNAc β ,y el segundo polipéptido comprende al menos una región de un polipéptido de inmunoglobulina, y en el que el primer polipéptido es un polipéptido de mucina que incluye una parte extracelular de un ligando de glicoproteína P-selectina-1 o en el que el primer polipéptido comprende al menos una región de un polipéptido de alfa-glicoproteína.
3. Polipéptido de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que dicho glicano es terminal.
4. Polipéptido de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho glicano es multivalente.
5. Polipéptido de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el segundo polipéptido comprende una región de un polipéptido de cadena pesada de inmunoglobulina.
6. Polipéptido de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones 1 ó 2, en el que dicho segundo polipéptido comprende una región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina.
7. Polipéptido de fusión para su uso según una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en el que el polipéptido previene la adhesión de un virus que provoca infección respiratoria.
8. Polipéptido de fusión para su uso según las reivindicaciones 1 ó 2, en el que el virus es un virus oculotrópico, un virus influenza humano, un virus influenza aviar, una recombinación de un virus influenza humano o aviar.
9. Polipéptido de fusión para su uso según la reivindicación 8, en el que el virus oculotrópico es un adenovirus 37, adenovirus 19a, adenovirus 8, un enterovirus 70 o un virus influenza aviar.