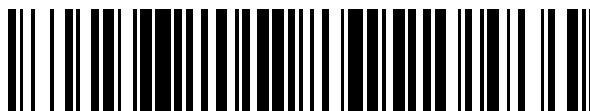


19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 548 030**

51 Int. Cl.:

**C07K 19/00** (2006.01)

**A61K 47/48** (2006.01)

**C07K 14/315** (2006.01)

**C07K 16/00** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.05.2010 E 10783845 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **08.07.2015 EP 2437767**

54 Título: **Moléculas con semividas prolongadas y usos de las mismas**

30 Prioridad:

**01.06.2009 US 182858 P**

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

**13.10.2015**

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)  
One MedImmune Way  
Gaithersburg, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**LUBMAN, OLGA;  
DALL'ACQUA, WILLIAM y  
WU, HERREN**

74 Agente/Representante:

**ISERN JARA, Jorge**

ES 2 548 030 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

Moléculas con semividas prolongadas y usos de las mismas

## 5 Campo de la invención

La presente invención proporciona un medio de incremento de la semivida de un agente bioactivo de interés. Específicamente, el agente bioactivo está asociado con una molécula que combina un dominio de unión a albúmina y un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn. La ventaja de incrementar la semivida de un agente bioactivo de interés es que se requieren cantidades más pequeñas y/o dosificación menos frecuente en el uso terapéutico, profiláctico o de diagnóstico de dichos agentes bioactivos.

Antecedentes de la invención

15 El uso de inmunoglobulinas como agentes terapéuticos se ha incrementado drásticamente en los últimos años y se ha expandido a diferentes áreas de tratamientos médicos. Dichos usos incluyen el tratamiento de agammaglobulinemia e hipogammaglobulinemia, como agentes inmunosupresores para tratar enfermedades autoinmunitarias y enfermedades de injerto contra huésped (GVH), el tratamiento de tumores linfoides, e inmunoterapias pasivas para el tratamiento de diversas enfermedades sistémicas e infecciosas. Además, las inmunoglobulinas son útiles como herramientas de diagnóstico *in vivo*, por ejemplo, en procedimientos de imaginología de diagnóstico.

Un problema crítico en estas terapias es la persistencia de inmunoglobulinas en la circulación. La velocidad de aclaramiento de inmunoglobulina afecta directamente a la cantidad y frecuencia de administración de dosis de la inmunoglobulina. La administración de dosis y frecuencia de administración de dosis incrementadas pueden causar efectos adversos en el paciente y también un incremento de los costes médicos.

Se cree que el aclaramiento de IgG está controlado por partes del dominio constante de IgG. El dominio constante de IgG controla el metabolismo de IgG incluyendo la velocidad de degradación de IgG en el suero a través de interacciones con FcRn. De hecho, la afinidad de unión incrementada por FcRn incrementaba la semivida en suero de la molécula (Kim *et al.*, Eur. J. Immunol., 24: 2429-2434, 1994; Popov *et al.*, Mol. Immunol., 33: 493-502, 1996; Ghetie *et al.*, Eur. J. Immunol., 26: 690-696, 1996; Junghans *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 93: 5512-5516, 1996; Israel *et al.*, Immunol., 89: 573-578, 1996).

Diversos experimentos de mutagénesis específica de sitio en la región Fc de IgG de ratón han conducido a la identificación de ciertos residuos de aminoácidos críticos implicados en la interacción entre IgG y FcRn (Kim *et al.*, Eur. J. Immunol., 24: 2429-2434, 1994; Medesan *et al.*, Eur. J. Immunol., 26: 2533, 1996; Medesan *et al.*, J. Immunol., 158: 2211-2217, 1997). Estos estudios y estudios de comparación de secuencias descubrieron que isoleucina en la posición 253, histidina en la posición 310 e histidina en la posición 435 (de acuerdo con la numeración de la UE, Kabat, que se refiere a la numeración del índice de la UE del anticuerpo Kabat IgG1 humano tal como se describe en el documento de Kabat *et al.*, en: Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991), están altamente conservadas en IgG humanas y de roedor, sugiriendo su importancia en la unión IgG-FcRn. Adicionalmente, diversas publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo un polipéptido de unión a FcRn en las moléculas (WO 97/43316; Patente de Estados Unidos N° 5.869.046; Patente de Estados Unidos N° 5.747.035; WO 96/32478; WO 91/14438 ) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn están preservadas pero afinidades por otros receptores de Fc se han reducido enormemente (WO 99/43713) o fusionando con dominios de unión a FcRn de anticuerpos (WO 00/09560; Patente de Estados Unidos N° 4.703.039).

Stork *et al.*, (Protein Engineering, Design and Selection, 20(11): 579-576, 2007) desvela el uso de un dominio de unión al antígeno de Proteína G de *Streptococcus* que está fusionada a un diacuerpo monocatenario biespecífico para mejorar las propiedades farmacocinéticas del mismo.

El documento WO2009040562 desvela la fusión de un anticuerpo de dominio único anti-albúmina del suero humano a un dominio Fab para mejorar la semivida del mismo.

En vista de la importancia farmacéutica de incrementar la semivida *in vivo* de un agente bioactivo, existe una necesidad de desarrollar una molécula con la que el agente bioactivo pueda asociarse para otorgar una semivida *in vivo* incrementada en el agente bioactivo de interés.

## 60 Sumario de la invención

La presente invención se refiere a extender las propiedades farmacológicas (incluyendo incrementar la semivida) de un agente bioactivo de interés. Esto se consigue asociando el agente bioactivo, por ejemplo, enlazando genéticamente, fusionando químicamente o conjugando el agente bioactivo, a una molécula que puede unirse tanto a albúmina de suero humano como al receptor FcRn.

En un aspecto, la invención incluye una molécula que comprende un dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G de *Streptococcus* fusionado a un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn, en la que la molécula que comprende el ABD fusionado al fragmento Fc de IgG de unión a FcRn tiene una semivida más larga que una molécula que comprende el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn sin un ABD o que comprende el ABD sin el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn.

El fragmento Fc de Ig de unión a FcRn puede ser un fragmento de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4. En una realización, el fragmento Fc incluye un dominio CH2 y un dominio CH3. En otra realización, el fragmento Fc incluye una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.

El dominio ABD es de proteína G de Streptococci. En otra realización, el ABD tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1, o una variante de la misma. En otro ejemplo, el dominio ABD tiene una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 2, o una variante de la misma.

En otras realizaciones, la molécula de la presente invención puede incluir, además, un agente bioactivo de interés. En una realización, el agente bioactivo es un polipéptido, tal como un anticuerpo.

En otro aspecto, la invención incluye, además, composiciones que incluyen las moléculas de la presente invención. Las composiciones pueden incluir un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.

En otro aspecto, la invención incluye una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención. En otros aspectos más, la invención incluye, además, una célula huésped que tiene una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención.

En otro aspecto, la invención incluye un método de producción de una molécula de la presente invención. En una realización, el método incluye cultivar una línea celular transfectada con un ácido nucleico que codifica una molécula de la presente invención y purificar el polipéptido codificado por éste.

En otro aspecto, la invención incluye un método de incremento de la semivida de un agente bioactivo de interés que comprende fusionar el agente bioactivo a una molécula que tiene un ABD-fragmento Fc de IgG de unión a FcRn. La invención incluye, además, administrar la molécula a un mamífero tal como un primate, por ejemplo, un ser humano.

#### Breve descripción de los dibujos

La figura 1 muestra un esquema de cómo la fusión ABD-Fc de la presente invención se une a sitios de unión tanto de Fc como de albúmina en células que expresan FcRn y cómo se cree que ambos sitios son usados para reciclar la molécula.

La figura 2 muestra un esquema de las diversas construcciones de fusión ABD-Fc.

La figura 3 es un gráfico lineal que muestra los resultados del estudio farmacocinético de las variantes de ABD-Fc.

#### Terminología

El término "ABD-Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una molécula que tiene un dominio de unión a albúmina de proteína G de Streptococci (ABD) asociado con un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn (Fc). El término ABD-Fc no es indicativo de ninguna preferencia particular de cómo debe ensamblarse la molécula. Por ejemplo, el dominio ABD puede estar en el extremo 5' (es decir: amino terminal) de la molécula o puede estar en el extremo 3' (es decir: carboxilo terminal) de la molécula. Además, el ABD puede estar directa o indirectamente (por ejemplo, mediante un enlazador) asociado con el Fc.

La expresión "ABD-Fc-agente bioactivo" se refiere a un agente bioactivo que está asociado con el "ABD-Fc" (mencionado anteriormente) y no es indicativo de ninguna preferencia particular de cómo debe ensamblarse la molécula. Por ejemplo, el agente bioactivo puede estar en el extremo 5' (es decir, amino terminal) de la molécula de ABD-Fc o puede estar en el extremo 3' (es decir, carboxilo terminal) de la molécula de ABD-Fc.

La expresión "región Fc de IgG", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la parte de una molécula de IgG que se correlaciona con un fragmento cristizable obtenido mediante digestión con papaína de una molécula de IgG. La región Fc consta de la mitad C-terminal de las dos cadenas pesadas de una molécula de IgG que están enlazadas mediante puentes disulfuro. Ésta no tiene actividad de unión al antígeno pero contiene la fracción carbohidrato y los sitios de unión para receptores del complemento y de Fc, incluyendo el receptor FcRn (véase a continuación). El fragmento Fc contiene todo el segundo dominio constante CH2 (residuos 231-340 de IgG1 humana, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat) y el tercer dominio constante CH3 (residuos 341-447). Las secuencias se presentan en el presente documento (véase, por ejemplo, SEC ID N° 8-11) y también se desvelan en el documento US 20070122403. La presente invención también abarca regiones Fc de IgG de

diferentes alotipos humanos. Por ejemplo, el alotipo no A de IgG1 humana y el alotipo A que tienen diferencias en la secuencia de aminoácidos en las posiciones 356 y 358; alotipos de IgG adicionales se proporcionan por ejemplo en los números de entrada al Genbank AL928742, AJ390254, AJ390276, AJ390247, J390242, AJ390262, J390272, AJ390241, AJ390237, X16110, AJ390254 y AJ390275.

La expresión "región bisagra-Fc de IgG" o "fragmento bisagra-Fc", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una región de una molécula de IgG que consta de la región Fc (residuos 231-447) y una región bisagra (residuos 216-230) que se extiende desde el extremo N de la región Fc. Un ejemplo de la secuencia de aminoácidos de la región bisagra-Fc de IgG1 se presenta en el presente documento como la SEC ID N° 8, y se desvela en el documento US 20070122403.

La expresión "dominio constante" se refiere a la parte de una molécula de inmunoglobulina que tiene una secuencia de aminoácidos más conservada con respecto a la otra parte de la inmunoglobulina, el dominio variable, que contiene el sitio de unión al antígeno. El dominio constante contiene los dominios CH1, CH2 y CH3 de la cadena pesada y el dominio CHL de la cadena ligera.

La expresión "receptor FcRn" o "FcRn", tal como se usa en el presente documento, se refiere a un receptor de Fc ("n" indica neonatal) que se sabe que está implicado en la transferencia de IgG maternas a un feto a través de la placenta humana o de primate, o el saco vitelino (conejos) y a un neonato desde el calostro a través del intestino delgado. También es conocido que FcRn está implicado en el mantenimiento de niveles constantes de IgG en suero uniéndose a las moléculas de IgG y reciclandolas en el suero. La unión de FcRn a moléculas de IgG es estrictamente dependiente del pH con unión óptima a pH 6,0. FcRn comprende un heterodímero de dos polipéptidos, cuyos pesos moleculares son aproximadamente 50 kD y 15 kD, respectivamente. Los dominios extracelulares del polipéptido de 50 kD están relacionados con las cadenas  $\alpha$  de clase I del complejo principal de histocompatibilidad (MHC) y el polipéptido de 15 kD demostró ser la  $\beta$ 2-microglobulina no polimórfica ( $\beta$ 2-microglobulina). Además de la placenta y el intestino neonatal, FcRn también se expresa en diversos tejidos entre especies así como diversos tipos de líneas celulares endoteliales. También se expresa en el endotelio vascular adulto humano, la vasculatura muscular y sinusoides hepáticos y se ha sugerido que las células endoteliales pueden ser las más responsables del mantenimiento de los niveles de IgG en suero en seres humanos y ratones. Las secuencias de aminoácidos de FcRn humano y FcRn murino se conocen en la técnica (por ejemplo, tal como se desvela en el documento US 20070122403)). También se incluyen homólogos de estas secuencias que tienen actividad FcRn.

La expresión "semivida *in vivo*", tal como se usa en el presente documento, se refiere a una semivida biológica de un tipo particular de molécula o sus fragmentos que contiene un sitio de unión a FcRn en la circulación de un animal dado y está presentada por un tiempo requerido para que la mitad de la cantidad administrada en el animal sea aclarada de la circulación y/u otros tejidos en el animal. Cuando una curva de aclaramiento de una IgG dada se construye en función del tiempo, la curva es habitualmente bifásica con una rápida fase alfa que representa un equilibrado de las moléculas de IgG inyectadas entre el espacio intra- y extravascular y que está, en parte, determinado por el tamaño de las moléculas, y una fase beta más larga que representa el catabolismo de las moléculas de IgG en el espacio intravascular. La expresión "semivida *in vivo*" corresponde prácticamente a la semivida de las moléculas de IgG en la fase beta.

Una molécula "aislada" o "purificada" de la presente invención está sustancialmente libre de material celular u otras proteínas contaminantes de la fuente de células o tejido de la que se deriva la proteína, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. La frase "sustancialmente libre de material celular" incluye preparaciones de ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo que está separado de componentes celulares de las células a partir de las que se ha aislado o producido de forma recombinante. Por lo tanto, un ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo que está sustancialmente libre de material celular incluye preparaciones de ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo que tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 % o 5 % (en peso seco) de proteína contaminante. Cuando el ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo se produce de forma recombinante, también está de forma preferente sustancialmente libre de medio de cultivo, es decir, el medio de cultivo representa menos de aproximadamente el 20 %, 10 % o 5 % de el volumen de la preparación de proteínas. Cuando el ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo se produce mediante síntesis química, está de forma preferente sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos, es decir, está separado de precursores químicos u otros productos químicos que están implicados en la síntesis de la proteína. Por consiguiente, dichas preparaciones del ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo tienen menos de aproximadamente el 30 %, 20 %, 10 %, 5 % (en peso seco) de precursores o compuestos químicos diferentes de ABD-Fc o ABD-Fc-agente bioactivo.

Una molécula de ácido nucleico "aislada" es una que está separada de otras moléculas de ácido nucleico que están presentes en la fuente natural de la molécula de ácido nucleico. Además, una molécula de ácido nucleico "aislada", tal como una molécula de ADNc, puede estar sustancialmente libre de otro material celular, o medio de cultivo cuando se produce mediante técnicas recombinantes, o sustancialmente libre de precursores químicos u otros productos químicos cuando se sintetiza químicamente. Una molécula de ácido nucleico "aislada" no incluye moléculas de ADNc dentro de una biblioteca de ADNc. En una realización preferida de la invención, se aíslan o purifican moléculas de ácido nucleico que codifican anticuerpos. En otra realización preferida de la invención, se aíslan o purifican moléculas de ácido nucleico que codifican ABD-Fc o ABD-Fc-agentes bioactivos.

La expresión “célula huésped”, tal como se usa en el presente documento, se refiere a la célula sujeto particular transfectada con una molécula de ácido nucleico o infectada con fagémido o bacteriófago y la descendencia o potencial descendencia de dicha célula. La descendencia de dicha célula puede no ser idéntica a la célula parental transfectada con la molécula de ácido nucleico debido a mutaciones o influencias ambientales que pueden producirse en generaciones sucesivas o integración de la molécula de ácido nucleico en el genoma de la célula huésped.

Los nombres de aminoácidos mencionados en el presente documento están abreviados con símbolos de tres letras o de una letra.

Para determinar la identidad porcentual de dos secuencias de aminoácidos o de dos secuencias de ácido nucleico, las secuencias están alineadas para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en la secuencia de una primera secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico para alineamiento óptimo con una segunda secuencia de aminoácidos o de ácido nucleico). Los residuos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes se comparan a continuación. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición. La identidad porcentual entre las dos secuencias está en función del número de posiciones idénticas compartidas por la secuencias (es decir, % de identidad = número de posiciones solapantes idénticas/número total de posiciones x 100 %). En una realización, las dos secuencias tienen la misma longitud.

La determinación de la identidad porcentual entre dos secuencias también puede conseguirse usando un algoritmo matemático. Un ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de dos secuencias es el algoritmo de Karlin y Altschul, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87: 2264-2268, modificado como en el documento Karlin y Altschul, 1993, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90: 5873-5877. Dicho algoritmo está incorporado en los programas NBLAST y XBLAST de Altschul *et al.*, 1990, J. Mol. Biol. 215: 403. Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos en BLAST con los parámetros del programa de nucleótidos NBLAST ajustados, por ejemplo, para el valor = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a una molécula de ácido nucleico de la presente invención. Pueden realizarse búsquedas de proteínas en BLAST con los parámetros del programa XBLAST ajustados, por ejemplo, a puntuación -50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a una molécula de proteína de la presente invención. Para obtener alineamientos con huecos para fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST tal como se describe en el documento Altschul *et al.*, 1997, Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402. Como alternativa, puede usarse PSI-BLAST para realizar una búsqueda iterada que detecta relaciones distantes entre moléculas (Id.). Cuando se utilizan los programas BLAST, Gapped BLAST y PSI-Blast, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, de XBLAST y NBLAST) (véase, por ejemplo, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). Otro ejemplo preferido no limitante de un algoritmo matemático utilizado para la comparación de secuencias es el algoritmo de Myers y Miller, 1988, CABIOS 4: 11-17. Dicho algoritmo está incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0) que es parte del paquete de software de alineamiento de secuencias GCG. Cuando se utiliza el programa ALIGN para comparar secuencias de aminoácidos, pueden usarse una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

La identidad porcentual entre dos secuencias puede determinarse usando técnicas similares a las descritas anteriormente, con o sin permitir huecos. En el cálculo de la identidad porcentual, típicamente sólo se cuentan coincidencias exactas.

Una “sustitución de aminoácidos conservativa” es una en la que el residuo de aminoácido es sustituido por un residuo de aminoácido que tiene una cadena lateral similar. Las familias de residuos de aminoácidos que tienen cadenas laterales similares han sido definidas en la técnica. Estas familias incluyen aminoácidos con cadenas laterales básicas (por ejemplo, lisina, arginina, histidina), cadenas laterales ácidas (por ejemplo, ácido aspártico, ácido glutámico), cadenas laterales polares no cargadas (por ejemplo, glicina, asparagina, glutamina, serina, treonina, tirosina, cisteína), cadenas laterales no polares (por ejemplo, alanina, valina, leucina, isoleucina, prolina, fenilalanina, metionina, triptófano), cadenas laterales ramificadas en beta (por ejemplo, treonina, valina, isoleucina) y cadenas laterales aromáticas (por ejemplo, tirosina, fenilalanina, triptófano, histidina).

#### Descripción detallada

La invención se basa, en parte, en asociar un agente bioactivo de interés con una molécula que combina la larga semivida de un anticuerpo y albúmina en uno para mejorar las propiedades farmacocinéticas de ese agente bioactivo. Específicamente, esta molécula que mejora la farmacocinética de la invención incluye un dominio de unión a albúmina de proteína G de Streptococci (ABD) y un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn y se denomina en lo sucesivo como la “molécula de ABD-Fc”. La figura 1 muestra un esquema de cómo la molécula de ABD-Fc de la presente invención puede unirse a albúmina y seguidamente se acoplan con sitios de unión tanto a Fc como a albúmina en FcRn. Se cree que la semivida mejorada de la molécula de ABD-Fc se consigue, dado que ambos sitios en FcRn se usan en el reciclado.

*Dominio de unión a albúmina (ABD)*

El ABD se deriva de *Streptococcus*. Los dominios ABD se describen en el documento Johansson *et al.* (The Journal of Biological Chemistry, 277: 8114-8120, 2002).

Típicamente, el dominio ABD de la presente invención es pequeño, por ejemplo, aproximadamente 70, 60, 50, 49, 48, 47, 46, 45, 44, 43, 42, 41, 40, 39, 38, 37, 36, 35, 34, 33, 32, 31, 30, 28, 27 ó 26 aminoácidos de longitud y puede unirse a albúmina, tal como albúmina de suero humano. Por ejemplo, el dominio ABD puede unirse a albúmina a una afinidad de 1 mM a 1 nM. Por consiguiente, el dominio ABD de la presente invención derivado de una proteína capaz de unirse a albúmina de suero humano (por ejemplo, proteína G estreptocócica) comprenderá al menos esa parte suficiente para unirse a albúmina de suero humano (por ejemplo, SEC ID N° 1), pero no comprenderá toda la secuencia de aminoácidos de la proteína. El dominio puede incluir, además, un haz de triple hélice tal como un haz de triple hélice levógiro. En ciertas realizaciones, el dominio ABD comprende la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2. En otras realizaciones, el dominio ABD consta de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.

La divulgación también incluye variantes de dominios ABD conocidos. Las variantes de ABD pueden contener al menos una alteración de aminoácidos, tal como una sustitución de aminoácidos conservativa en comparación con la secuencia de aminoácidos del ABD de tipo silvestre o puede incluir deleciones de aminoácidos del dominio. Las variantes de ABD pueden tener al menos el 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 % o 65 % de identidad de secuencia con el ABD de tipo silvestre.

Las variantes de ABD típicamente tienen la misma actividad o sustancialmente la misma actividad que los ABD de tipo silvestre. Por ejemplo, la actividad puede ser la capacidad del dominio para unirse a albúmina, por ejemplo, la variante puede unirse a albúmina con una afinidad (KD) de al menos 1 mM. Las variantes de ABD también incluyen fragmentos de ABD que conservan la capacidad de unirse a albúmina. El fragmento puede ser un dominio ABD que carece, por ejemplo, de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15 o más aminoácidos.

Los ejemplos de ABD de la presente invención incluyen:

G148-GA3: LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEC ID N° 1)

ALB8-GA: LKNAKEDIAELKKAGITSDFYFNAINKAKTVEEVNALKNEILKA (SEC ID N° 2)

Se apreciará que variantes de G148-GA3 y ALB8-GA pueden tener al menos el 99 %, 98 %, 97 %, 96 %, 95 %, 94 %, 93 %, 92 %, 91 %, 90 %, 85 %, 80 %, 75 %, 70 % o 65 % de identidad de secuencia con la SEC ID N°1 o la SEC ID N°2 y conservan la capacidad de unirse a albúmina de suero humano.

Las variantes de G148-GA3 y ALB8-GA también pueden incluir ABD que tienen sustituciones, deleciones o inserciones de aminoácidos de uno o más aminoácidos. En un ejemplo, el ABD tiene 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 20 o más sustituciones de aminoácidos conservativas.

En un ejemplo, la divulgación incluye una variante de G148-GA3. La variante de G148-GA3 debe tener sustancialmente la misma actividad que G148-GA3 y unirse a albúmina de suero humano con aproximadamente la misma afinidad. Además, la G148-GA3 debe mostrar una conformación de haz de triple hélice levógiro. Residuos críticos para la unión a albúmina están presentes en la hélice 2 e incluyen los residuos S 18, Y20 y Y21 y residuos críticos para la formación del haz de triple hélice levógiro incluyen L12, V33, I137 e I40. (Los residuos críticos están en negrita y subrayados a continuación.) Los residuos críticos pueden ser menos tolerantes a sustituciones de aminoácidos no conservativas, por consiguiente, mantenerlos es generalmente preferido. Sin embargo, pueden utilizarse sustituciones conservativas en residuos críticos.

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEILAALP (SEC ID N° 1)

De este modo, una variante de G148-GA3 debe conservar los aminoácidos críticos y puede incluir una o más sustituciones de aminoácidos de otra forma a lo largo de la longitud de la SEC ID N° 1 o ser un fragmento de la SEC ID N°1.

Variantes del dominio ABD pueden ensayarse para su capacidad de unirse a albúmina de suero humano (por ejemplo tal como se perfila en el ejemplo 2). Las variantes pueden ensayarse, además, para determinar si pueden unirse al FcRn (por ejemplo, tal como se perfila en el ejemplo 3)

La invención incluye, además, las secuencias de ácido nucleico que codifican los ABD de la invención. Debido a la inherente degeneración del código genético, otras secuencias de ADN que codifican sustancialmente la misma o una secuencia de aminoácidos de funcionalidad equivalente, pueden usarse para clonar y expresar el dominio ABD.

*Fragmento Fc de IgG de unión a FcRn*

- 5 El ABD incluye además una región constante de una molécula de Ig o una región de la misma que puede unirse al FcRn. En un ejemplo, el ABD puede estar fusionado a las regiones de cadena pesada constantes de un anticuerpo IgG. Por ejemplo, el dominio ABD puede estar enlazado a los dominios CH2 y CH3 de una molécula de Ig humana o los dominios bisagra, CH2 y CH3 de la molécula de IgG humana. En otros ejemplos, el ABD está enlazado a una o más de las siguientes secuencias: HQLNSDGK (SEC ID N° 12); HQNISDGK (SEC ID N° 13); VISSLGQ (SEC ID N° 14); PKNSSMISNTP (SEC ID N° 15) para facilitar la unión al FcRn (véase, por ejemplo el documento US 5.869.046). Puede usarse cualquier isoforma de una molécula de Ig para generar moléculas de acuerdo con la presente invención, tales como las isoformas IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4, u otras clases de Ig, como IgM o IgA.
- 10 Puede apreciarse bien que el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn también podría ser diferente de las moléculas de tipo silvestre descritas anteriormente y seguir transportando la propiedad de poseer una región que se une al FcRn, de modo que la semivida de un agente bioactivo se prolongue. El fragmento Fc de IgG de unión a FcRn puede generarse mediante otros medios. Por ejemplo, el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn puede ser uno que fue identificado usando estudios de mutagénesis de la región Fc de IgG o identificado después del cribado para
- 15 unión con FcRn usando bibliotecas de péptidos o polipéptidos. Por ejemplo, el documento US20080181887 desvela una región Fc de una IgG que puede tener una semivida prolongada cuando tiene una o más modificaciones de aminoácidos en una o más de las posiciones 251-256, 285-290, 308-314, 385-389 y 428-436, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de Kabat. En un ejemplo específico, la región Fc comprende una o más de las siguientes sustituciones: M252Y, S254T, T256E, M428T, de acuerdo con el sistema de numeración de la UE de
- 20 Kabat, que prolongan la semivida. Además un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn de la invención incluye variantes de la región Fc que tienen la función efectora alterada (por ejemplo, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC); y citotoxicidad dependiente del complemento (CDC)). Por ejemplo los documentos US 6.737.056 y US20060024298 desvelan modificaciones de aminoácidos que pueden realizarse en la región Fc que alterarán la función efectora. En un ejemplo específico, la región Fc comprende una o más de las siguientes sustituciones: S228P, L234F, L235E, L235F, 235Y, P331, en las que la numeración es de acuerdo con la
- 25 numeración de la UE de Kabat, que reducen las funciones efectoras. Como alternativa, pueden prepararse enlazadores a FcRn usando presentación en fagos (Ghetie *et al.* 1997 Nat. Biotechnol. 15(7): 637-40.; Dall'Acqua *et al.* 2002 J. Immunol; 169(9): 5171-80; WO 2007/098420).
- 30 *ABD-fragmento Fc de IgG de unión a FcRn*
- El ABD y el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn pueden prepararse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el ABD puede asociarse con el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn mediante fusión genética o conjugación química. En una realización, el dominio ABD está fusionado o conjugado directamente al fragmento
- 35 Fc de IgG de unión a FcRn. En otra realización, el dominio ABD está indirectamente fusionado o conjugado al fragmento Fc de IgG de unión a FcRn, por ejemplo mediante una secuencia peptídica enlazadora. El ABD-Fc de la invención puede ser una proteína formada mediante la fusión de un dominio de unión a albúmina a un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn y no es indicativo de ninguna preferencia particular de cómo debe ensamblarse la molécula. Por consiguiente, el ABD y el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn pueden estar asociados en cualquier orden, por
- 40 ejemplo, el dominio ABD puede estar en el extremo 5' (es decir, amino terminal) de la molécula o puede estar en el extremo 3' (es decir, carboxilo terminal) de la molécula.
- En una realización, el ABD y el FcRn están genéticamente fusionados. En este ejemplo, el ABD y el FcRn pueden estar fusionados de forma recombinante, es decir, en los que una construcción génica que codifica el ABD y el
- 45 fragmento Fc de IgG de unión a FcRn se introducen en un sistema de expresión de una manera que permite el correcto ensamblaje de la molécula en el momento de la expresión a partir de él. De esta manera, el dominio ABD puede expresarse de modo que se una a albúmina y la región Fc se expresa de modo que se una a FcRn. En un ejemplo, el dominio ABD está enlazado a la región Fc con sus dominios bisagra, CH2 y CH3 de una IgG1/2/3/4.
- 50 Otro ejemplo de un ABD-Fc de la invención es el dominio ABD G148-GA3 fusionado a IgG2aFc. La secuencia de ácido nucleico que codifica la G148-GA3-IgG2aFc y secuencias de aminoácidos se muestran a continuación (G148-GA3 se muestra subrayado).

gctctgctgaagctaaagtctggctaaccggaactgacaaatatgggtatccgactattacaagaacctgatcaacaatgcca  
aactgttgaaggtgtaaaagcactgattgatgaaattctggctgactgcctGGCGCcGagcccagagggcccacaatcaagcc  
ctgtccctcatgcaaatgccagcacctaacctcttgggtggaccatccgtcttcatcttccctcaaagatcaaggatgtactcatgatct  
ccctgagccccatagtcacatgtgtggtggggatgtgagcgaggatgaccagatgtccagatcagctggtttgtgaacaacgtgga  
agtacacacagctcagacacaaacctatagagaggattacaacagtactctccgggtggtcagtgccctccccatccagcaccagga  
ctggatgagtggaaggagtcaaatgcaaggtaacaacaagacctcccagcgcctcagagagaacctctcaaaacccaag  
ggtcagtaagagctccacaggtatatgtcttgcctccaccagaagaagagatgactaagaacaggtcactctgacctgcatggtcac  
agacttcatgcctgaagacatttacgtggagtggaccaacaacgggaaaacagagctaaactacaagaacctgaaccagtctgga  
ctctgatggttcttacttcatgtacagcaagctgagagtggaaaagaagaactgggtgaaagaatagctactctgttcagtgtcca  
cgaggtctgcacaatcaccacagcactaagagcttctcccggactccgggtaaa ( SEC ID N° 3)

LAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLINNAKTVEGVKALIDEI  
LAALPGAEPARGPTIKPCPPCKCPAPNLLGGPSVFIFPPKIKDV  
LMISLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQISWVFNNEVHTAQTQT  
HREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSGKEFKCKVNNKDLPAPI  
ERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFM  
PEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSKLRVEK  
KNWVERNYSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK ( SEC ID N° 4)

5 En ciertos aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD G148-GA3 (SEC ID N° 1), fusionado a  
una IgG1Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. En otros  
aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD ALB8-GA (SEC ID N° 2), fusionado a una IgG1Fc  
humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. Los dominios bisagra, CH2 y  
10 CH3 de IgG1 humana se muestran a continuación (SEC ID N° 8), la bisagra se muestra con un único subrayado, el  
CH2 se muestra con un doble subrayado, y el CH3 se muestra con un subrayado discontinuo.

EPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLNQKEYKCKVSNKA  
LPAPIEKTISKAKGQPREPOQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG  
QPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTOKSL  
SLSPGK ( SEC ID N° 8)

15 En ciertos aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD G148-GA3 (SEC ID N° 1), fusionado a  
una IgG2Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. En otros  
aspectos un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD ALB8-GA (SEC ID N° 2), fusionado a una IgG2Fc  
humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. Los dominios bisagra, CH2 y  
CH3 de IgG2 humana se muestran a continuación (SEC ID N° 9), la bisagra se muestra con un único subrayado, el  
20 CH2 se muestra con un doble subrayado, y el CH3 se muestra con un subrayado discontinuo.



ERKCCVECPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVOFNW  
YVDGVEVHNAKTKPREEOFNSTFRVVSVLTVVHODWLNKGKEYKCKVSNKGLPAPIE  
KTISKTKGQPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDISVEWESNGOPENNY  
KTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVFSCSYMHEALHNHYTOKSLSLSPGK  
 (. SEC.ID.Nº...9)

5 En ciertos aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD G148-GA3 (SEC ID Nº 1), fusionado a una IgG3Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. En otros aspectos un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD ALB8-GA (SEC ID Nº 2), fusionado a una IgG3Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. Los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG3 humana se muestran a continuación (SEC ID Nº 10), la bisagra se muestra con un único subrayado, el CH2 se muestra con un doble subrayado y el CH3 se muestra con un subrayado discontinuo.

10 ELKTPLGDTTHTCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPRCPEPKSCDTPPPCPR  
CPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSHEDPEVOFKWYVDGVEVH  
NAKTKPREEOYNSTFRVVSVLTVLHODWLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKTKG  
QPREPOVYTLPPSREEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESSGOPENNYNTTPPML  
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNIFSCSYMHEALHNRFOTOKSLSLSPGK (. SEC.ID.  
 .Nº...10)

15 En ciertos aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD G148-GA3 (SEC ID Nº 1), fusionado a una IgG4Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. En otros aspectos, un ABD-Fc de la invención comprende el dominio ABD ALB8-GA (SEC ID Nº 2), fusionado a una IgG4Fc humana que comprende los dominios CH2 y CH3 y opcionalmente el dominio bisagra. Los dominios bisagra, CH2 y CH3 de IgG4 humana se muestran a continuación (SEC ID Nº 11), la bisagra se muestra con un único subrayado, el CH2 se muestra con un doble subrayado y el CH3 se muestra con un subrayado discontinuo.

20 ESKYGPPCPCSPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPVTCVVVDVSOEDPEVOFN  
WYVDGVEVHNAKTKPREEOFNSTYRVVSVLTVLHODWLNKGKEYKCKVSNKGLPSS  
IEKTISKAKGQPREPOVYTLPPSQEEMTKNOVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGOPEN  
NYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSYMHEALHNHYTOKSLSLSLG  
K (. SEC.ID.Nº...11)

*Agente bioactivo*

25 La presente invención abarca asociar el ABD-Fc a un agente bioactivo tal como un agente de diagnóstico o terapéutico o cualquier otra molécula para la que se desea incrementar la semivida *in vivo*. Aunque sin desear quedar ligados por la teoría, se cree que la molécula de ABD-Fc puede incrementar la semivida de una molécula a la que está asociada, dado que se degrada a una velocidad más lenta que si el agente bioactivo estuviera asociado con solamente albúmina o Fc en solitario. Se cree que esto se produce dado que tanto la albúmina, que se une al dominio ABD, como el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn pueden unirse a células que expresan el receptor FcRn. Se cree que la capacidad tanto de ABD como de Fc de la molécula de ABD-Fc para unirse a células que expresan el receptor FcRn incrementa la posibilidad de rescate del ABD-Fc-molécula bioactiva de degradación lisosomal y reciclarla de vuelta a la superficie celular otorgando de este modo a la molécula una semivida sorprendentemente (sinérgicamente) prolongada en comparación con asociar la molécula con solamente albúmina o Fc. En un ejemplo, la semivida del agente bioactivo se prolonga en un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 % o más en comparación con si el agente bioactivo estuviera asociado con solamente albúmina o Fc. En ciertas realizaciones, la semivida del agente bioactivo se prolonga en al menos un 10 % en comparación con si el agente bioactivo estuviera asociado con solamente albúmina o Fc. En otras realizaciones, la semivida del agente bioactivo se prolonga en al menos un 20 % en comparación con si el agente bioactivo estuviera asociado con solamente albúmina o Fc. En otras realizaciones más, la semivida del agente bioactivo se prolonga en al menos un 30 % en comparación con si el agente bioactivo estuviera asociado con solamente albúmina o Fc.

El agente bioactivo y el ABD-Fc pueden prepararse mediante cualquier medio conocido en la técnica. Por ejemplo, el agente bioactivo puede asociarse con el ABD-Fc mediante fusión genética o conjugación química. En una realización, el dominio ABD está fusionado o conjugado directamente al fragmento Fc de IgG de unión a FcRn. En otra realización, el agente bioactivo está fusionado o conjugado indirectamente al ABD-Fc, por ejemplo mediante una secuencia peptídica enlazadora. El ABD-Fc-agente bioactivo de la invención puede ser una proteína formada mediante la fusión de un agente bioactivo a un ABD-Fc y no es indicativo de ninguna preferencia particular de cómo debe ensamblarse la molécula. Por consiguiente, el ABD-FcR puede estar asociado en cualquier orden, por ejemplo, el dominio ABD puede estar en el extremo 5' (es decir, amino terminal) de la molécula de ABD-Fc o puede estar en el extremo 3' (es decir, carboxilo terminal) de la molécula de ABD-Fc. Está provisto, además, que el agente bioactivo pueda estar asociado entre el ABD y el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn, en el que el ABD o el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn está en el extremo 5' (es decir, amino terminal) del agente bioactivo. En una realización preferida, las proteínas de fusión de la invención incluyen un agente bioactivo fusionado de forma recombinante o conjugado químicamente al ABD-Fc.

Un agente bioactivo puede ser cualquier polipéptido o fármaco sintético conocido por un experto en la materia. En un ejemplo, un agente bioactivo es un polipéptido que consta de al menos 5, preferentemente al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 residuos de aminoácidos. Los ejemplos de polipéptidos bioactivos incluyen, aunque sin limitarse a, diversos tipos de anticuerpos, dominios de unión al antígeno (por ejemplo, scFv, Fv, Fab, F(ab)<sub>2</sub>, anticuerpos de dominio, y similares), citoquinas (por ejemplo, IL-1 (tal como anakinra), IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-10, IL-12, IL-13, IL-15, IFN-gamma, IFN-alfa e IFN-beta), moléculas de adhesión celular (por ejemplo, cadherinas, tales como cadherina-11, CTLA4, CD2 y CD28); ligandos (por ejemplo, TNF tales como TNF-alfa, TNF-beta); factores anti-angiogénicos tales como endostatina; receptores, anticuerpos y factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF y su receptor, EGF y su receptor, NGF y su receptor, y KGF, tal como palifermina, y su receptor). Otros ejemplos de agentes bioactivos incluyen eritropoyetina recombinante tal como Epoetina alfa, factor estimulador de colonias de granulocitos humano recombinante (G-CSF) o filgrastima, alteplasa, darbepoetina alfa, domasa alfa, entanercept, somatotropina, somatrem o tenecteplasa.

Un agente bioactivo también puede ser una fracción terapéutica tal como una citotoxina (por ejemplo, un agente citostático o citocida), un agente terapéutico o un elemento radiactivo (por ejemplo, alfa-emisores, gamma-emisores, etc.). Los ejemplos de agentes citostáticos o citocidas incluyen, aunque sin limitarse a, paclitaxol, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorrubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puromicina y análogos u homólogos de los mismos. Los agentes terapéuticos incluyen, aunque sin limitarse a, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil descabazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalán, carmustina (BSNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfano, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cisdiclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclina (por ejemplo, daunorrubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC), y agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina).

La presente invención también abarca fusionar el ABD-Fc a un agente bioactivo que es un agente de diagnóstico. El ABD-Fc-molécula de diagnóstico de la invención puede usarse con fines de diagnóstico para, por ejemplo, monitorizar el desarrollo o la evolución de una enfermedad, trastorno o infección como parte de un procedimiento de ensayo clínico para, por ejemplo, determinar la eficacia de un régimen de tratamiento dado. La detección puede facilitarse acoplando la molécula mejoradora farmacológica a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen diversas enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes, materiales radiactivos, metales emisores de positrones e iones metálicos paramagnéticos no radiactivos. La sustancia detectable puede acoplarse o conjugarse directamente al anticuerpo o indirectamente, a través de un intermedio (tal como, por ejemplo, un enlazador conocido en la técnica) usando técnicas conocidas en la técnica. Véase, por ejemplo, la Patente de Estados Unidos N° 4.741.900 para iones metálicos que pueden estar conjugados a anticuerpos para uso como diagnóstico de acuerdo con la presente invención. Los ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, O-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; los ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; los ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamin fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; los ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina, y aecuorina; y los ejemplos de materiales radiactivos adecuados incluyen <sup>125</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>111</sup>In o <sup>99m</sup>Tc.

Las técnicas para conjugar la molécula de ABD-Fc de la invención a un agente bioactivo son bien conocidas; véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), 1985, págs. 243-56, Alan R. Liss, Inc.); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery* (2ª Ed.), Robinson *et al.* (eds.), 1987, págs. 623-53, Marcel Dekker, Inc.); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal*

Antibodies '84: Biological And Clinical Applications, Pinchera *et al.* (eds.), 1985, págs. 475-506); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), 1985, págs. 303-16, Academic Press; y Thorpe *et al.*, *Immunol. Recombinant expression vector*, 62: 119-58, 1982.

5

#### *Métodos de producción de ABD-Fc-agentes bioactivos de la invención*

Pueden producirse ABD-Fc-agentes bioactivos de la invención mediante técnicas de ADN recombinante convencionales o mediante técnicas de síntesis de proteínas, por ejemplo, mediante el uso de un sintetizador de péptidos. Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico que codifica un ABD-Fc-agente bioactivo puede sintetizarse mediante técnicas convencionales que incluyen sintetizadores de ADN automatizados. Como alternativa, puede llevarse a cabo amplificación por PCR de fragmentos génicos usando cebadores ancla que dan origen a salientes complementarios entre dos fragmentos consecutivos que posteriormente pueden hibridarse y reamplificarse para generar una secuencia génica quimérica (véase, por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology*, Ausubel *et al.*, eds., John Wiley & Sons, 1992). Además, un ácido nucleico que codifica un agente bioactivo puede clonarse en un vector de expresión que contiene el dominio ABD-Fc o un fragmento del mismo, de modo que el agente está enlazado en marco al dominio constante o fragmento del mismo.

10

15

Métodos para fusionar o conjugar polipéptidos a las regiones constantes de anticuerpos son conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos N° 5.336.603, 5.622.929, 5.359.046, 5.349.053, 5.447.851, 5.723.125, 5.783.181, 5.908.626, 5.844.095 y 5.112.946; los documentos EP 307,434; EP 367,166; EP 394,827; las publicaciones PCT WO 91/06570, WO 96/04388, WO 96/22024, WO 97/34631 y WO 99/04813; Ashkenazi *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88: 10535-10539, 1991; Trauneker *et al.*, *Nature*, 331: 84-86, 1988; Zheng *et al.*, *J. Immunol.*, 154: 5590-5600, 1995; y Vil *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 89: 11337-11341, 1992.

20

25

La secuencia de nucleótidos que codifica un agente bioactivo puede obtenerse a partir de cualquier información disponible para los expertos en la materia (por ejemplo, del Genbank, la bibliografía, o mediante clonación rutinaria), y la secuencia de nucleótidos que codifica un dominio constante o un fragmento del mismo con afinidad incrementada por el FcRn puede determinarse mediante análisis de la secuencia de mutantes producidos usando técnicas descritas en el presente documento, o puede obtenerse del Genbank o la bibliografía. La secuencia de nucleótidos que codifica un ABD-Fc-agente bioactivo puede insertarse en un vector de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia codificante de proteínas insertada. Pueden utilizarse diversos sistemas huésped-vector en la presente invención para expresar la secuencia codificante de proteínas. Estos incluyen, aunque sin limitarse a, sistemas de células de mamífero infectadas con virus (por ejemplo, virus vaccinia, adenovirus, etc.); sistemas de células de insecto infectadas con virus (por ejemplo, baculovirus); microorganismos tales como levaduras que contienen vectores de levadura; o bacterias transformadas con bacteriófagos, ADN, ADN plasmídico, o ADN cosmídico. Los elementos de expresión de vectores varían en sus potencias y especificidades. Dependiendo del sistema de huésped-vector utilizado, puede usarse uno cualquiera de una serie de elementos de transcripción y traducción adecuados.

30

35

40

La expresión de un ABD-Fc-agente bioactivo puede estar controlada mediante cualquier elemento promotor o potenciador conocido en la técnica. Los promotores que pueden usarse para controlar la expresión del gen que codifica la proteína de fusión incluyen, aunque sin limitarse a, la región promotora temprana de SV40 (Bernoist y Chambon, *Nature*, 290: 304-310, 1981), el promotor contenido en la repetición terminal larga en 3' del virus del sarcoma de Rous (Yamamoto, *et al.*, *Cell*, 22: 787-797, 1980), el promotor de timidina quinasa del herpes (Wagner *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 78: 1441-1445, 1981), las secuencias reguladoras del gen de metalotioneína (Brinster *et al.*, *Nature*, 296: 39-42, 1982), el promotor de tetraciclina (Tet) (Gossen *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 89: 5547-5551, 1995); vectores de expresión procariotas tales como el promotor de beta-lactamasa (Villa-Kamaroff, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 75: 3727-3731, 1978), o el promotor tac (DeBoer, *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 80: 21-25, 1983; véase también "Useful proteins from recombinant bacteria" en *Scientific American*, 242: 74-94, 1980); vectores de expresión vegetales que comprenden la región promotora de nopalina sintetasa (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature*, 303: 209-213, 1983) o el promotor del ARN 35S del virus del mosaico de la coliflor (Gardner, *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 9: 2871, 1981), y el promotor de la enzima fotosintética ribulosa bifosfato carboxilasa (Herrera-Estrella *et al.*, *Nature*, 310: 115-120, 1984); elementos promotores de levadura u otros hongos tales como el promotor Gal 4, el promotor de ADC (alcohol deshidrogenasa), promotor de PGK (fosfoglicerol quinasa), promotor de fosfatasa alcalina, y las siguientes regiones de control transcripcional animales, que muestran especificidad tisular y han sido utilizados en animales transgénicos: región de control del gen de elastasa I que es activa en células acinares pancreáticas (Swift *et al.*, *Cell* 38: 639-646, 1984; Ornitz *et al.*, 50:399-409, Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol., 1986; MacDonald, *Hepatology* 7: 425-515, 1987); la región de control del gen de insulina que es activa en células beta pancreáticas (Hanahan, *Nature* 315: 115-122, 1985), la región de control del gen de inmunoglobulina que es activa en células linfoides (Grosschedl *et al.*, *Cell*, 38: 647-658, 1984; Adames *et al.*, *Nature* 318: 533-538, 1985; Alexander *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 7: 1436-1444, 1987), la región de control del virus del tumor mamario de ratón que es activa en células testiculares, de mama, linfoides y mastocitos (Leder *et al.*, *Cell*, 45: 485-495, 1986), la región de control del gen de albúmina que es activa en el hígado (Pinkert *et al.*, *Genes y Devel.*, 1: 268-276, 1987), la región de control del gen de alfa-fetoproteína que es activa en el hígado (Krumlauf *et al.*, *Mol. Cell. Biol.*, 5: 1639-1648, 1985; Hammer *et al.*, *Science*, 235: 53-58, 1987; una región de control del gen de 1-

45

50

55

60

65

antitripsina que es activa en el hígado (Kelsey *et al.*, Genes and Devel., 1: 161-171, 1987), la región de control del gen de beta-globina que es activa en células mieloides (Mogram *et al.*, Nature, 315: 338-340, 1985; Kollias *et al.*, Cell, 46: 89-94, 1986; la región de control del gen de proteína básica de mielina que es activa en células oligodendrocitos en el cerebro (Readhead *et al.*, Cell, 48: 703-712, 1987); la región de control del gen de la cadena ligera-2 de miosina que es activa en músculo esquelético (Sani, Nature, 314: 283-286, 1985); enolasa específica neuronal (NSE) que es activa en células neuronales (Morelli *et al.*, Gen. Virol., 80: 571-83, 1999); la región de control del gen del factor neurotrófico derivado del cerebro BDNF) que es activa en células neuronales (Tabuchi *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Comprising., 253: 818-823, 1998); el promotor de la proteína ácido fibrilar glial (GFAP) que es activa en astrocitos (Gomes *et al.*, Braz. J. Med. Biol. Res., 32(5): 619-631, 1999; Morelli *et al.*, Gen. Virol., 80: 571-83, 1999) y la región de control del gen de la hormona de liberación gonadotrópica que es activa en el hipotálamo (Mason *et al.*, Science, 234: 1372-1378, 1986).

En una realización específica, la expresión de un ABD-Fc-agente bioactivo está regulada por un promotor constitutivo. En otra realización, la expresión de un ABD-Fc-agente bioactivo está regulada por un promotor inducible. De acuerdo con estas realizaciones, el promotor puede ser un promotor específico de tejido.

En células huésped de mamífero, pueden utilizarse una serie de sistemas de expresión de base viral. En casos donde se usa un adenovirus como vector de expresión, la secuencia codificante de ABD-Fc-agente bioactivo puede estar ligada a un complejo de control de la transcripción/traducción de adenovirus, por ejemplo, la secuencia promotora tardía y líder tripartita. Este gen quimérico puede insertarse a continuación en el genoma del adenovirus mediante recombinación *in vitro* o *in vivo*. La inserción en una región no esencial del genoma viral (por ejemplo, la región E1 o E3) dará como resultado un virus recombinante que es viable y capaz de expresar la molécula de anticuerpo en huéspedes infectados (por ejemplo, véase Logan & Shenk, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 81: 355-359, 1984). Las señales de inicio específicas también pueden requerirse para la traducción eficiente de secuencias codificantes de ABD-Fc-agente bioactivo insertadas. Estas señales incluyen el codón de inicio ATG y secuencias adyacentes. Además, el codón de inicio debe estar en fase con el marco de lectura de la secuencia codificante deseada para garantizar la traducción de todo el inserto. Estas señales de control de la traducción exógenas y codones de inicio pueden ser de diversos orígenes, tanto naturales como sintéticos. La eficiencia de la expresión puede potenciarse mediante la inclusión de elementos potenciadores de la transcripción apropiados, terminadores de la transcripción, etc. (véase Bitter *et al.*, Methods in Enzymol., 153: 516-544, 1987).

Vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica un ABD-Fc-agente bioactivo pueden identificarse mediante tres enfoques generales: (a) hibridación de ácido nucleico, (b) presencia o ausencia de funciones génicas de "marcador", y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica un ABD-Fc-agente bioactivo en un vector de expresión puede detectarse mediante hibridación de ácido nucleico usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas a un gen insertado que codifica la proteína de fusión. En el segundo enfoque, el sistema de vector recombinante/huésped puede identificarse y seleccionarse en base a la presencia o ausencia de ciertas funciones génicas "marcadoras" (por ejemplo actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de oclusión en baculovirus, etc.) causadas por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica un ABD-Fc-agente bioactivo en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica la proteína de fusión se inserta dentro de la secuencia génica marcadora del vector, recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de proteína de fusión pueden identificarse mediante la ausencia de la función génica marcadora. En el tercer enfoque, vectores de expresión recombinantes pueden identificarse ensayando el producto génico (es decir, la proteína de fusión) expresado por el recombinante. Dichos ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína de fusión en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, unión con anticuerpo antiagente bioactivo.

Además, puede seleccionarse una cepa de células huésped que module la expresión de las secuencias insertadas, o modifique y procese el producto génico de la forma específica deseada. La expresión a partir de ciertos promotores puede conseguirse en presencia de ciertos inductores; por lo tanto, la expresión de la proteína de fusión manipulada genéticamente puede estar controlada. Además, diferentes células huésped tienen mecanismos característicos y específicos para el procesamiento y modificación traduccional y postraduccional (por ejemplo, glucosilación, fosforilación de proteínas). Pueden seleccionarse líneas celulares o sistemas huésped apropiados para garantizar la modificación y el procesamiento deseados de la proteína extraña expresada. Por ejemplo, la expresión en un sistema bacteriano producirá un producto no glucosilado y la expresión en levadura producirá un producto glucosilado. Pueden usarse células huésped eucariotas que poseen la maquinaria celular para el apropiado procesamiento del transcrito primario, glucosilación, y fosforilación del producto génico. Dichas células huésped de mamífero incluyen, aunque sin limitarse a, CHO, VERY, BHK, HeLa, COS, MDCK, 293, 3T3, W138, y en particular, líneas celulares neuronales tales como, por ejemplo, neuroblastomas humanos SK-N-AS, SK-N-FJ, SK-N-DZ (Sugimoto *et al.*, J. Natl. Cancer Inst., 73: 51-57, 1984), neuroblastoma humano SK-N-SH (Biochim. Biophys. Acta, 704: 450-460, 1982), meduloblastoma cerebelar humano Daoy (He *et al.*, Cancer Res., 52: 1144-1148, 1992) células de glioblastoma DBTRG-05MG (Kruse *et al.*, 1992, In Vitro Cell. Dev. Biol., 28A: 609-614, 1992), neuroblastoma humano IMR-32 (Cancer Res., 30: 2110-2118, 1970), astrocitoma humano 1321N1 (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 74: 4816, 1997), astrocitoma humano MOG-G-CCM (Br. J. Cancer, 49: 269, 1984), glioblastoma-astrocitoma humano U87MG (Acta Pathol. Microbiol. Scand., 74: 465-486, 1968), glioblastoma humano A172 (Olopade *et al.*,

Cancer Res., 52: 2523-2529 1992), células de glioma de rata C6 (Benda *et al.*, Science, 161: 370-371, 1968), neuroblastoma de ratón Neuro-2a (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 65: 129-136, 1970), neuroblastoma de ratón NB41A3 (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 48: 1184-1190, 1962), plexo coroideo de oveja SCP (Bolin *et al.*, J. Virol. Methods, 48: 211-221, 1994), astrocito normal de gato G355-5, PG-4 (Haapala *et al.*, J. Virol., 53: 827-833, 1985), cerebro de hurón Mpf (Trowbridge *et al.*, In Vitro, 18: 952-960, 1982), y líneas celulares normales tales como, por ejemplo, corteza cerebral normal de rata CTX TNA2 (Radany *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 89: 6467-6471, 1992) tales como, por ejemplo, CRL7030 y Hs578Bst. Además, diferentes sistemas de expresión de vector/huésped pueden efectuar reacciones de procesamiento a diferentes grados.

Para la producción a largo plazo, de alto rendimiento de proteínas recombinantes, se prefiere la expresión estable. Por ejemplo, pueden genomanipularse líneas celulares que expresan de forma estable la proteína de fusión. En lugar de usar vectores de expresión que contienen orígenes de replicación virales, las células huésped pueden transformarse con ADN controlados mediante elementos de control de la expresión apropiados (por ejemplo, promotor, potenciador, secuencias, terminadores de la transcripción, sitios de poliadenilación, etc.), y un marcador seleccionable. Después de la introducción del ADN extraño, se puede permitir a las células genomanipuladas crecer durante 1-2 días en un medio enriquecido, y a continuación se cambian a un medio selectivo. El marcador seleccionable en el plásmido recombinante otorga resistencia a la selección y permite que las células integren de forma estable el plásmido en sus cromosomas y crezcan hasta formar focos que, a su vez, pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. Este método puede usarse ventajosamente para genomanipular líneas celulares que expresan la proteína génica de una vía o expresada de forma diferencial. Dichas líneas celulares genomanipuladas pueden ser particularmente útiles en el cribado y la evaluación de compuestos que afectan a la actividad endógena de la proteína génica de vía o expresada de forma diferencial.

Pueden usarse una serie de sistemas de selección, incluyendo aunque sin limitarse a, genes de timidina quinasa del virus del herpes simplex (Wigler, *et al.*, Cell, 11: 223, 1997), hipoxantina-guanina fosforribosiltransferasa (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 48: 2026, 1962), y adenina fosforribosiltransferasa (Lowy, *et al.*, 1980, Cell, 22: 817,1980) pueden emplearse en células tk-, hgprt- o aprt-, respectivamente. Además, puede usarse resistencia a antimetabolitos como la base de selección para los genes dhfr, que otorga resistencia a metotrexato (Wigler, *et al.*, Natl. Acad. Sci. EE. UU., 77: 3567,1980; O'Hare, *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 78: 1527, 1981); gpt, que otorga resistencia a ácido micofenólico (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 78: 2072, 1981); neo, que otorga resistencia al aminoglucósido G-418 (Colberre-Garapin, *et al.*, J. Mol. Biol., 150:1, 1981); e hygro, que otorga resistencia a higromicina (Santerre, *et al.*, Gene, 30:147, 1984).

Una vez que un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se ha producido mediante expresión recombinante, puede purificarse mediante cualquier método conocido en la técnica para purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, de intercambio iónico, afinidad, particularmente por afinidad por el antígeno específico después de la Proteína A, y cromatografía en columna de exclusión molecular), centrifugado, solubilidad diferencial, o mediante cualquier otra técnica convencional para la publicación de proteínas.

#### 40 *Usos profilácticos y terapéuticos del ABD-Fc-agente bioactivo*

La presente divulgación proporciona terapias que implican administrar el ABD-Fc-agente bioactivo a un animal, preferentemente un mamífero, y de la forma más preferente un ser humano, para prevenir, tratar o mejorar síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección. En un ejemplo, el agente bioactivo es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. El ABD-Fc-agente bioactivo puede proporcionarse en composiciones farmacéuticamente aceptables tal como es conocido en la técnica o tal como se describe en el presente documento. El ABD-Fc-agente bioactivo de la presente invención puede funcionar como antagonistas de una enfermedad, trastorno o infección y puede administrarse a un animal, preferentemente un mamífero y de la forma más preferente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o infección. Por ejemplo, el agente bioactivo puede ser un anticuerpo que puede alterar o prevenir la interacción entre un antígeno viral y su receptor de la célula huésped y puede administrarse a un animal, preferentemente un mamífero y de la forma más preferente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una infección vírica. Los anticuerpos también pueden reconocer y unirse a antígenos de superficie que se encuentran en la superficie de células y tejidos enfermos, tales como, por ejemplo, células cancerosas y/o tumores o tejidos inflamados y activar una respuesta inmunitaria para tratar, prevenir o mejorar las enfermedades causadas por dichas células cancerosas y/o tumores o dichos tejidos inflamados.

En un ejemplo, la molécula de ABD-Fc de la invención incluye, además, un anticuerpo que también puede usarse para prevenir, inhibir o reducir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas. En una realización específica, un anticuerpo inhibe o reduce el crecimiento o la metástasis de células cancerosas en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %, al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos 10 % con respecto al crecimiento o la metástasis en ausencia de dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos inhibe o reduce el crecimiento o la metástasis de cáncer en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 45 %,

al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % con respecto al crecimiento o la metástasis en ausencia de dichos anticuerpos. Los ejemplos de cánceres incluyen, aunque sin limitarse a, leucemia (por ejemplo, leucemia aguda tal como leucemia linfocítica aguda y leucemia mielocítica aguda), neoplasias, tumores (por ejemplo, fibrosarcoma, mixosarcoma, liposarcoma, condrosarcoma, sarcoma osteógeno, cordoma, angiosarcoma, endoteliosarcoma, linfangiosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, sinovioma, mesotelioma, tumor de Ewing, leiomiomasarcoma, rhabdomiomasarcoma, carcinoma de colon, cáncer pancreático, cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de próstata, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células basales, adenocarcinoma, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar, adenocarcinomas papilares, cistadenocarcinoma, carcinoma medular, carcinoma broncogénico, carcinoma de células renales, hepatoma, carcinoma del conducto biliar, coriocarcinoma, seminoma, carcinoma embrionario, tumor de Wilms, cáncer de cuello del útero, tumor testicular, carcinoma de pulmón, carcinoma de pulmón microcítico, carcinoma de vejiga, carcinoma epitelial, glioma, astrocitoma, meduloblastoma, craneofaringioma, ependimoma, pinealoma, hemangioblastoma, neuroma acústico, oligodendroglioma, meningioma, melanoma, neuroblastoma, y retinoblastoma), enfermedad de las cadenas pesadas, metástasis, o cualquier enfermedad o trastorno caracterizado por crecimiento celular incontrolado.

En otro ejemplo, la molécula de ABD-Fc de la invención incluye, además, un anticuerpo que también puede usarse para reducir la inflamación experimentada por animales, particularmente mamíferos, con trastornos inflamatorios. En una realización específica, un anticuerpo reduce la inflamación en un animal en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % con respecto a la inflamación en un animal al que no se le administró dicho anticuerpo. En otra realización, una combinación de anticuerpos reducen la inflamación en un animal en al menos el 99 %, al menos el 95 %, al menos el 90 %, al menos el 85 %, al menos el 80 %, al menos el 75 %, al menos el 70 %, al menos el 60 %, al menos el 50 %, al menos el 45 %, al menos el 40 %, al menos el 35 %, al menos el 30 %, al menos el 25 %, al menos el 20 % o al menos el 10 % con respecto a la inflamación en un animal al que no se le administraron dichos anticuerpos. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, aunque sin limitarse a, artritis reumatoide, espondiloartropatías, enfermedad intestinal inflamatoria, asma, alergia atópica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis quística, lupus eritematoso sistémico activo (SLE), lupus, sepsis y psoriasis. Los ejemplos de síntomas inflamatorios incluyen, aunque sin limitarse a, hiperplasia de células epiteliales, exceso actividad de células T, células B, eosinófilos, macrófagos, monocitos, neutrófilos, o mastocitos, sobreproducción de mucina, e hipersensibilidad bronquial. En ciertas realizaciones, el anticuerpo usado para el tratamiento de inflamación (o cáncer) es un anticuerpo anti-alfavbeta3 modificado, preferentemente un anticuerpo Vitaxin.RTM. (véase, las publicaciones PCT WO 98/33919 y WO 00/78815, ambas de Huse *et al*).

En otro ejemplo más, la molécula de ABD-Fc de la invención incluye, además, un anticuerpo que puede usarse para prevenir el rechazo de trasplantes. También pueden usarse anticuerpos para prevenir la formación de coágulos. Además, anticuerpos que funcionan como agonistas de la respuesta inmunitaria también pueden administrarse a un animal, preferentemente un mamífero, y de la forma más preferente un ser humano, para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con la enfermedad, trastorno o infección.

En otro ejemplo más, la molécula de ABD-Fc de la invención incluye, además, anticuerpos que se unen inmuno específicamente a uno o más antígenos y pueden usarse de forma local o de forma sistémica en el cuerpo como un producto terapéutico. El ABD-Fc-polipéptidos de esta invención también puede utilizarse ventajosamente en combinación con anticuerpos monoclonales o quiméricos, o con linfoquinas o factores de crecimiento hematopoyéticos (tales como, por ejemplo, IL-2, IL-3 e IL-7) que, por ejemplo, sirven para incrementar el número o la actividad de células efectoras que interactúan con los anticuerpos. Las moléculas de ABD-Fc de la invención de esta invención también pueden utilizarse ventajosamente en combinación con uno o más fármacos utilizados para tratar una enfermedad, trastorno o infección tales como, por ejemplo agentes anticáncer, agentes antiinflamatorios o agentes antivirales. Los ejemplos de agentes anticáncer incluyen, aunque sin limitarse a, isplatino, ifosfamida, paclitaxel, taxanos, inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo CPT-11, topotecano, 9-AC y GG-211), gemcitabina, vinorelbina, oxaliplatino, 5-fluorouracilo (5-FU), leucovorina, vinorelbina, temodal y taxol. Los ejemplos de agentes antivirales incluyen, aunque sin limitarse a, citoquinas (por ejemplo, IFN-alfa, IFN-beta., IFN-gamma), inhibidores de transcriptasa inversa (por ejemplo, AZT, 3TC, D4T, ddC, ddl, d4T, 3TC, adefovir, efavirenz, delavirdina, nevirapina, abacavir, y otros didesoxinucleósidos o didesoxifluoronucleósidos), inhibidores del recubrimiento (*capping*) de ARNm viral, tales como ribavirina, inhibidores de proteasas tales como inhibidores de proteasa del VIH (por ejemplo, amprenavir, indinavir, nelfinavir, ritonavir y saquinavir), anfotericina B, castanospermina como inhibidor del procesamiento de glucoproteínas, inhibidores de neuraminidasa tales como inhibidores de neuraminidasa del virus de la gripe (por ejemplo, zanamivir y oseltamivir), inhibidores de topoisomerasa I (por ejemplo, camptotecinas y análogos de las mismas), amantadina y rimantadina. Los ejemplos de agentes antiinflamatorios incluyen, aunque sin limitarse a, farmacéuticamente aceptables antiinflamatorios no esteroideos tales como inhibidores de COX-2 (por ejemplo, meloxicam, celecoxib, rofecoxib, flosulido, y SC-58635, y MK-966), ibuprofeno e indometacina, y esteroides (por ejemplo, deflazacort, dexametasona y metilprednisolona).

En realizaciones preferidas, una molécula de ABD-Fc de la invención prolonga las semividas in vivo de moléculas bioactivas tales como las usadas en inmunoterapia pasiva (para terapia o profilaxis). Debido a la semivida

prolongada, puede conseguirse inmunoterapia o profilaxis pasiva usando dosis más bajas y/o administración menos frecuente del producto terapéutico, dando como resultado menos efectos secundarios, mejor cumplimiento terapéutico del paciente, terapia/profilaxis menos costosa, etc. En una realización preferida, el producto terapéutico/profiláctico es una molécula de ABD-Fc de la invención que incluye, además, un anticuerpo que se une a VRS, por ejemplo, SYNAGIS (palivizumab) o motavizumab (ambos de MedImmune, Inc., MD) u otros anticuerpos anti-VRS. Dichos anticuerpos anti-VRS, y métodos de administración se desvelan en las Patentes de Estados Unidos Nº 6.855.493 y 6.818.216, respectivamente, tituladas "Methods of Administering/Dosing Anti-VRS Antibodies for Prophylaxis and Treatment", de Young *et al.* También están incluidos los anticuerpos anti-VRS descritos en la sección 5.1, *supra*.

#### Administración de ABD - Fc - agentes bioactivos de la invención

La divulgación proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección administrando a un sujeto una cantidad efectiva de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, o composición farmacéutica que comprende ABD-Fc-agente bioactivo de la invención. La divulgación también proporciona métodos de tratamiento, profilaxis y mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección administrando a un sujeto una cantidad efectiva de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, o una composición farmacéutica que comprende un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención. En un aspecto preferido, ABD-Fc-agente bioactivo está sustancialmente purificado (es decir, sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). En una realización específica, el sujeto es un animal, preferentemente un mamífero tal como un no primate (por ejemplo, vacas, cerdos, caballos, gatos, perros, ratas etc.) y un primate (por ejemplo, mono tal como un mono cynomolgous y un ser humano). En una realización preferida, el sujeto es un ser humano.

Diversos sistemas de administración son conocidos y pueden usarse para administrar un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar el anticuerpo o la proteína de fusión, endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, el documento Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987), construcción de un ácido nucleico como parte de un vector retroviral u otro vector, etc. Los métodos de administración incluyen, aunque sin limitarse a, administración parenteral (por ejemplo, intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa y subcutánea), epidural, y mucosal (por ejemplo, intranasal, véase por ejemplo, el documento WO 03/086443, y vías orales). En una realización específica, ABD-Fc-agente bioactivo de la invención son administrados por vía intramuscular, por vía intravenosa o por vía subcutánea. Las composiciones pueden administrarse mediante cualquier vía conveniente, sistémica o local, por ejemplo mediante infusión o inyección en embolada, o por absorción a través de los revestimientos epitelial o mucocutáneo (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.) y pueden administrarse junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, también puede emplearse la administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizador. Véase, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nº 6.019.968; 5.985.320; 5.985.309; 5.934.272; 5.874.064; 5.855.913; 5.290.540; y 4.880.078; y las publicaciones PCT Nº WO 92/19244; WO 97/32572; WO 97/44013; WO 98/31346; WO 99/66903, WO 04/058156, WO 03/087339, WO 03/087335 y WO 03/087327. Dicha administración pulmonar o intranasal u otra mucosal puede emplearse para administrar el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención de forma sistémica. En una realización preferida, el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se administra usando la tecnología de administración pulmonar de fármacos Alkermes AIR (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

La invención también proporciona que el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se envase en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad del ABD-Fc-agente bioactivo de la invención. En una realización, la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se suministra como un polvo liofilizado esterilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente y puede reconstituirse, por ejemplo, con agua o solución salina a la concentración apropiada para administración a un sujeto. Preferentemente, la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se suministra como un polvo liofilizado estéril seco en un recipiente sellado herméticamente a una dosis unitaria de al menos 5 mg, más preferentemente al menos 10 mg, al menos 15 mg, al menos 25 mg, al menos 35 mg, al menos 45 mg, al menos 50 mg o al menos 75 mg. La molécula de ABD-Fc-agente bioactivo liofilizada de la invención debe almacenarse a entre 2 y 8°C en su recipiente original y la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención debe administrarse en el plazo de 12 horas, preferentemente en el plazo de 6 horas, el plazo de 5 horas, el plazo de 3 horas o el plazo de 1 hora después de haber sido reconstituido. En una realización alternativa, la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se suministra en forma líquida en un recipiente sellado herméticamente que indica la cantidad y concentración de la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención. Preferentemente, la molécula de ABD-Fc-agente bioactivo de la invención se suministra en un recipiente sellado herméticamente al menos 1 mg/ml, más preferentemente al menos 2,5 mg/ml, al menos 5 mg/ml, al menos 8 mg/ml, al menos 10 mg/ml, al menos 15 mg/kg o al menos 25 mg/ml.

En una realización específica, puede ser deseable administrar las composiciones farmacéuticas de la invención de forma local a la zona que necesita tratamiento; esto puede conseguirse, por ejemplo, y no a modo de limitación, por infusión local, por inyección o por medio de un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o

gelatinoso, incluyendo membranas, tales como membranas silásticas, o fibras. Preferentemente, cuando se administra un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, hay que tener cuidado de usar materiales a los que el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención no se absorba.

- 5 En otra realización, la composición puede administrarse en una vesícula, en particular un liposoma (véase los documentos Langer, *Science*, 249: 1527-1533, 1990; Treat *et al.*, en *Liposomes in the Therapy of Infectious Disease and Cancer*, Lopez-Berestein and Fidler (eds.), Liss, Nueva York, págs. 353-365 (1989); Lopez-Berestein, *ibid.*, págs. 3 17-327; véase en general *ibid.*).
- 10 En otra realización más, la composición puede administrarse en un sistema de liberación controlada o liberación prolongada. Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación prolongada que comprenden uno o más anticuerpos, o una o más proteínas de fusión. Véase, por ejemplo la Patente de Estados Unidos Nº 4.526.938; la publicación PCT WO 91/05548; la publicación PCT WO 96/20698; los documentos Ning *et al.*, "Intratamoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology*, 39: 179-189, 1996; Song *et al.*, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology*, 50: 372-397, 1995; Cleek *et al.*, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Intl. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.*, 24: 853-854, 1997; y Lam *et al.*, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery", *Proc. Intl. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.*, 24: 759-760, 1997. En una realización, puede usarse una bomba en un sistema de liberación controlada (véase los documentos Langer, *supra*; Sefton, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.*, 14: 20; Buchwald *et al.*, *Surgery*, 88: 507, 1980; y Saudek *et al.*, *N. Engl. J. Med.*, 321: 574, 1989). En otra realización, pueden usarse materiales poliméricos para conseguir liberación controlada de anticuerpos o proteínas de fusión (véase, por ejemplo, los documentos *Medical Applications of Controlled Release*, Langer and Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen and Ball (eds.), Wiley, N.Y. (1984); Ranger y Peppas, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.*, 23: 61, 1983; véase también los documentos Levy *et al.*, *Science*, 228: 190, 1985; During *et al.*, *Ann. Neurol.*, 25: 351, 1989; Howard *et al.*, *J. Neurosurg.*, 7 1: 105, 1989); la Patente de Estados Unidos Nº 5.679.377; la Patente de Estados Unidos Nº 5.916.597; la Patente de Estados Unidos Nº 5.912.015; la Patente de Estados Unidos Nº 5.989.463; la Patente de Estados Unidos Nº 5.128.326; la publicación PCT Nº WO 99/15154; y la publicación PCT Nº WO 99/20253). En otra realización más, un sistema de liberación controlada puede colocarse en las inmediaciones de la diana terapéutica (por ejemplo, los pulmones), requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, en *Medical Applications of Controlled Release*, *supra*, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).
- 35 Otros sistemas de liberación controlada se analizan en la revisión de Langer, *Science*, 249: 1527-1533, 1990).

En una realización específica donde la composición de la invención es un ácido nucleico que codifica una molécula de ABD-Fc de la invención que incluye un agente bioactivo, el ácido nucleico puede administrarse in vivo para promover la expresión de su molécula de ABD-Fc-agente bioactivo codificada de la invención, construyéndolo como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolo de modo que se vuelva intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.980.286), o mediante inyección directa, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o administrándolo enlazado a un péptido similar a homeosecuencia que es conocido que entra en el núcleo (véase por ejemplo, Joliot *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 88: 1864-1868, 1991), etc. Como alternativa, un ácido nucleico puede introducirse de forma intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para expresión mediante recombinación homóloga.

La presente invención también proporciona composiciones farmacéuticas. Dichas composiciones comprenden una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En una realización específica, la expresión "farmacéuticamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno Federal o de un estado o enumerado en la Farmacopea estadounidense u otra farmacopea reconocida a nivel general para uso en animales, y más particularmente en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante (por ejemplo, completo e incompleto de Freund, geles minerales tales como hidróxido de aluminio, sustancias tensioactivas tales como lisolecitina, polioles pluriónicos, polianiones, péptidos, emulsiones en aceite, hemocianina de lapa californiana, dinitrofenol, y adyuvantes potencialmente útiles para seres humanos tales como BCG (*Bacilo Calmette-Guerin*) y *Corynebacterium parvum*), excipiente, o vehículo con el que se administra el producto terapéutico. Dichos vehículos farmacéuticos pueden ser líquidos estériles, tales como agua y aceites, incluyendo los de origen petrolero, animal, vegetal o sintético, tales como aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral, aceite de sésamo y similares. El agua es un vehículo preferido cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. También pueden emplearse soluciones salinas y soluciones de dextrosa acuosa y glicerol como vehículos líquidos, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen al menos, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, tiza, gel de sílice, estearato sódico, monoestearato de glicerol, talco, cloruro sódico, leche desnatada seca, glicerol, propilenglicol, agua, etanol y similares. La composición, si se desea, también puede contener cantidades secundarias de agentes humectantes o emulsionantes, o agentes tamponantes de pH. Estas



composiciones pueden asumir la forma de soluciones, suspensiones, emulsión, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, formulaciones de liberación prolongada y similares. La formulación oral puede incluir vehículos convencionales tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Los ejemplos de vehículos farmacéuticos adecuados se describen en el documento "Remington's Pharmaceutical Sciences" de E. W. Martin. Dichas composiciones contendrán una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de la molécula de ABD-Fc de la invención que incluye, además, un agente bioactivo, preferentemente en forma purificada, junto con una cantidad adecuada de vehículo para proporcionar la forma para administración apropiada al paciente. La formulación debe adecuarse a la vía de administración.

En una realización preferida, la composición se formula de acuerdo con procedimientos rutinarios como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a seres humanos. Típicamente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Donde sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en la zona de la inyección.

Generalmente, los ingredientes de composiciones de la invención se suministran por separado o mezclados entre sí en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, como polvo liofilizado seco o concentrado libre de agua en un recipiente sellado herméticamente tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de agente activo. Donde la composición debe administrarse por infusión, ésta puede dispensarse con un frasco de infusión que contiene agua o solución salina de calidad farmacéutica estéril. Donde la composición se administra por inyección, puede proporcionarse una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina, de modo que los ingredientes pueden mezclarse antes de la administración. Donde la composición se administra mediante una vía pulmonar (es decir, por inhalación) o intranasal, un polvo liofilizado que se reconstituirá posteriormente, o una formulación líquida estable puede cargarse en viales o una jeringa o un atomizador.

Las composiciones de la invención pueden formularse como formas neutras o con sales. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las formadas con aniones tales como las derivadas de ácidos clorhídrico, fosfórico, acético, oxálico, tartárico, etc., y las formadas con cationes tales como las derivadas de sodio, potasio, amonio, calcio, hidróxidos férricos, isopropilamina, trietilamina, 2-etilamino etanol, histidina, procaína, etc.

La cantidad de la composición de la invención que será eficaz en el tratamiento, la prevención o la mejora de uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección puede determinarse mediante técnicas clínicas convencionales. La dosis precisa a emplear en la formulación dependerá de la vía de administración, la edad del sujeto, y la gravedad de la enfermedad, trastorno o infección, y debe decidirse de acuerdo con el criterio del facultativo y las circunstancias de cada paciente. Pueden extrapolarse dosis eficaces a partir de curvas de respuesta a la dosis derivadas de sistemas de ensayo in vitro o en modelo animal (por ejemplo, la rata algodонера o el mono Cynomolgus).

Para proteínas de fusión que incluyen el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, la dosis terapéutica o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto varía entre aproximadamente 0,001 y 50 mg/kg de peso corporal, preferentemente aproximadamente 0,01 y 25 mg/kg de peso corporal, más preferentemente aproximadamente 0,1 a 20 mg/kg de peso corporal, y aún más preferentemente aproximadamente 1 y 10 mg/kg, 2 y 9 mg/kg, 3 y 8 mg/kg, 4 y 7 mg/kg, o 5 y 6 mg/kg de peso corporal o 0,3 y 3 mg/kg de peso corporal o 3 y 15 mg/kg de peso corporal. Para anticuerpos, la dosis terapéutica o profilácticamente eficaz administrada a un sujeto es típicamente de 0,1 mg/kg a 200 mg/kg del peso corporal del sujeto. Preferentemente, la dosis administrada a un sujeto está entre 0,1 mg/kg y 20 mg/kg del peso corporal del sujeto o 0,3 y 3 mg/kg de peso corporal o 3 y 15 mg/kg de peso corporal y más preferentemente la dosis administrada a un sujeto está entre 1 mg/kg y 10 mg/kg del peso corporal del sujeto. La dosis dependerá, sin embargo, de la medida en que la semivida in vivo de la molécula ha sido incrementada. Generalmente, los anticuerpos humanos y las proteínas de fusión humanas tienen semividas más largas dentro del cuerpo humano que los anticuerpos de proteínas de fusión de otras especies debido a la respuesta inmunitaria a los polipéptidos extraños. Por lo tanto, dosis más bajas de anticuerpos humanos o proteínas de fusión humanas y la administración menos frecuente a menudo es posible. Además, la dosis y frecuencia de administración de anticuerpos, proteínas de fusión, o moléculas conjugadas pueden reducirse también mejorando la captación y la penetración en tejidos (por ejemplo, en el pulmón) de los anticuerpos o proteínas de fusión mediante modificaciones tales como, por ejemplo, lipidación.

El tratamiento de un sujeto con una cantidad terapéutica o profilácticamente eficaz de un ABD-Fc-agente bioactivo de la invención puede incluir un único tratamiento o, preferentemente, puede incluir una serie de tratamientos. En un ejemplo preferido, un sujeto es tratado con la proteína de fusión en el intervalo de entre aproximadamente 0,1 y 30 mg/kg de peso corporal, una vez a la semana durante entre aproximadamente 1 y 10 semanas, preferentemente entre 2 y 8 semanas, más preferentemente entre aproximadamente 3 y 7 semanas, y aún más preferentemente durante aproximadamente 4, 5 ó 6 semanas. En otras realizaciones, la composición farmacéutica de la invención es administrada una vez al día, dos veces al día, o tres veces al día. En otras realizaciones, la composición farmacéutica es administrada una vez a la semana, dos veces a la semana, una vez cada dos semanas, una vez al mes, una vez cada seis semanas, una vez cada dos meses, dos veces al año o una vez al año. Se apreciará

también que la dosis eficaz de la proteína de fusión usada para el tratamiento, ya sea terapéutica o profilácticamente puede incrementarse o reducirse en el transcurso de un tratamiento particular.

#### Terapia génica

5 En una realización específica, ácidos nucleicos que comprenden secuencias que codifican el ABD-Fc-agente bioactivo de la invención, se administran para tratar, prevenir o mejorar uno o más síntomas asociados con una enfermedad, trastorno o infección, a modo de terapia génica. Terapia génica se refiere a terapia realizada mediante la administración a un sujeto de un ácido nucleico expresado o expresable. En esta realización de la divulgación, los  
10 ácidos nucleicos producen su ABD-Fc-agente bioactivo codificado que media en un efecto terapéutico o profiláctico.

Cualquiera de los métodos para terapia génica disponibles en la técnica puede usarse de acuerdo con la presente invención. A continuación se describen métodos ejemplares.

15 Para revisiones generales de los métodos de terapia génica, véase los documentos Goldspiel *et al.*, Clinical Pharmacy; Wu y Wu, Biotherapy, 3: 87-95, 1991; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol., 32: 573-596, 1993; Mulligan, Science, 260: 926-932, 1993; y Morgan and Anderson, Ann. Rev. biochem. 62: 191-217, 1993; TIBTECH 11(5): 155-215, 1993. Métodos conocidos habitualmente en la técnica de tecnología de ADN recombinante que pueden usarse se describen en los documentos Ausubel *et al.* (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John  
20 Wiley & Sons, NY (1993); y Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990).

En un aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un agente ABD-Fc junto con un agente bioactivo tal como un anticuerpo terapéutico, siendo dichos ácidos nucleicos parte de  
25 un vector de expresión que expresa el anticuerpo en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente promotores heterólogos, unidos de forma operativa a la región codificante del anticuerpo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo y, opcionalmente, específicos de tejido. En otra realización particular, se usan moléculas de ácido nucleico en las que las secuencias codificantes de ABD-Fc-Anticuerpo y cualesquiera otras secuencias deseadas están flanqueadas por regiones que promueven la recombinación  
30 homóloga en un sitio deseado en el genoma, permitiendo de este modo la expresión intracromosómica de los ácidos nucleicos que codifican el anticuerpo (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 86: 8932-8935, 1989; y Zijlstra *et al.*, Nature, 342: 435-438, 1989).

En otro aspecto preferido, una composición de la invención comprende ácidos nucleicos que codifican un ABD-Fc-agente bioactivo, siendo dichos ácidos nucleicos una parte de un vector de expresión que expresa el ABD-Fc-agente bioactivo en un huésped adecuado. En particular, dichos ácidos nucleicos tienen promotores, preferentemente  
35 promotores heterólogos, unidos de forma operativa a la región codificante de un ABD-Fc-agente bioactivo, siendo dicho promotor inducible o constitutivo, y opcionalmente, específico de tejido.

40 La administración de los ácidos nucleicos al interior del sujeto puede ser directa, en cuyo caso el sujeto es directamente expuesto al ácido nucleico o a vectores que portan ácido nucleico, o indirecta, en cuyo caso, las células son transformadas en primer lugar con los ácidos nucleicos *in vitro*, a continuación trasplantadas al sujeto. Estos dos enfoques son conocidos, respectivamente, como terapia génica *in vivo* o *ex vivo*.

45 En una realización específica, las secuencias de ácido nucleico son administradas directamente *in vivo*, donde es expresada para producir el producto codificado. Esto puede conseguirse mediante cualquiera de numerosos métodos conocidos en la técnica, por ejemplo, construyéndolas como parte de un vector de expresión de ácido nucleico apropiado y administrándolas de modo que se vuelvan intracelulares, por ejemplo, por infección usando un vector retroviral defectuoso o atenuado u otros virales (véase la Patente de Estados Unidos Nº 4.980.286), o por  
50 inyección directa de ADN desnudo, o mediante el uso de bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores o agentes de transfección de la superficie celular, encapsulación en liposomas, micropartículas o microcápsulas, o administrándolas enlazadas a un péptido que es conocido que entra en el núcleo, administrándolas enlazadas a un ligando sometido a endocitosis mediada por receptores (véase, por ejemplo, Wu y Wu, J. Biol. Chem., 262: 4429-4432, 1987) (que puede usarse para dirigirse a tipos de células que expresan específicamente los receptores), etc. En otra realización, pueden formarse complejos de ácido nucleico-ligando en los que el ligando comprende un péptido viral fusógeno para alterar endosomas, permitiendo al ácido nucleico evitar la degradación lisosomal. En otra realización más, el ácido nucleico puede estar dirigido *in vivo* para captación y expresión específica de células, dirigiéndose a un receptor específico (véase, por ejemplo, las publicaciones PCT WO 92/06180; WO 92/22635; WO 92/20316; WO 93/14188; WO 93/20221). Como alternativa, el ácido nucleico puede introducirse por vía intracelular e incorporarse dentro del ADN de la célula huésped para expresión, mediante recombinación homóloga (Koller y Smithies, Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU., 86: 8932-8935, 1989; y Zijlstra *et al.*, Nature, 342: 435-438, 1989).  
60

En una realización específica, se usan vectores virales que contienen secuencias de ácido nucleico que codifican ABD-Fc-agente bioactivo. Por ejemplo, puede usarse un vector retroviral (véase Miller *et al.*, Meth. Enzymol., 217: 581-599, 1993). Estos vectores retrovirales contienen los componentes necesarios para el correcto  
65

empaquetamiento del genoma viral y la integración en el ADN de la célula huésped. Las secuencias de ácido nucleico que codifican ABD-Fc-agente bioactivo que incluyen un agente bioactivo a usar en terapia génica son clonadas en uno o más vectores, lo que facilita la administración de la secuencia de nucleótidos a un sujeto. Más detalles sobre los vectores retrovirales pueden encontrarse en el documento Boesen *et al.*, *Biotherapy*, 6: 291-302, 1994, que describe el uso de un vector retroviral para administrar el gen *mdr 1* a células madre hematopoyéticas para hacer a las células madre más resistentes a la quimioterapia. Otras referencias que ilustran el uso de vectores retrovirales en terapia génica son: Clowes *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 93: 644-651, 1994; Klein *et al.*, *Blood* 83: 1467-1473, 1994; Salmons y Gunzberg, *Human Gene Therapy*, 4: 129-141, 1993; y Grossman y Wilson, *Curr. Opin. in Genetics and Devel.*, 3: 110-114, 1993.

Los adenovirus son otros vectores virales que pueden usarse en terapia génica. Los adenovirus son vehículos especialmente atractivos para administrar genes a epitelios respiratorios. Los adenovirus infectan de forma natural los epitelios respiratorios donde causan una enfermedad leve. Otras dianas para sistemas de administración basados en adenovirus son el hígado, el sistema nervioso central, células endoteliales y músculo. Los adenovirus tienen la ventaja de ser capaces de infectar células que no se dividen. Kozarsky y Wilson, *Current Opinion in Genetics and Development*, 3: 499-503, 1993, presentan una revisión de terapia génica basada en adenovirus. Bout *et al.*, *Human Gene Therapy*, 5: 3-10, 1994, demostraron el uso de vectores de adenovirus para transferir genes a los epitelios respiratorios de monos Rhesus. Otros ejemplos del uso de adenovirus en terapia génica pueden encontrarse en los documentos Rosenfeld *et al.*, *Science*, 252: 431-434, 1991; Rosenfeld *et al.*, *Cell*, 68: 143-155, 1992; Mastrangeli *et al.*, *J. Clin. Invest.*, 91: 225-234, 1993; publicación PCT WO 94/12649; y Wang *et al.*, *Gene Therapy*, 2: 775-783, 1995. En una realización preferida, se usan vectores de adenovirus.

El virus adenoasociado (VAA) también ha sido propuesto para uso en terapia génica (véase, por ejemplo, Walsh *et al.*, *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*, 204: 289-300, 1993, y la Patente de Estados Unidos N° 5.436.146).

Otro enfoque para la terapia génica implica transferir un gen a células en cultivo tisular mediante métodos tales como electroporación, lipofección, transfección mediada por fosfato cálcico o infección vírica. Habitualmente, el método de transferencia incluye la transferencia de un marcador seleccionable a las células. Las células se colocan a continuación en selección para aislar aquellas células que han asimilado y que expresan el gen transferido. Esas células son administradas a continuación a un sujeto.

En esta realización, el ácido nucleico se introduce en una célula antes de la administración in vivo de la célula recombinante resultante. Dicha introducción puede llevarse a cabo mediante cualquier método conocido en la técnica, incluyendo aunque sin limitarse a transfección, electroporación, microinyección, infección con un vector viral o bacteriófago que contiene las secuencias de ácido nucleico, fusión celular, transferencia génica mediada por cromosomas, transferencia génica mediada por microcélulas, fusión de esferoplastos, etc. En la técnica se conocen numerosas técnicas para la introducción de genes extraños en las células (véase, por ejemplo, los documentos Loeffler y Behr, *Meth. Enzymol.*, 217: 599-618, 1993; Cohen *et al.*, *Meth. Enzymol.*, 217: 618-644, 1993; y *Clin. Pharma. Ther.*, 29: 69-92, 1985) y pueden usarse de acuerdo con la presente divulgación, siempre que las funciones de desarrollo y fisiológicas necesarias de las células receptoras no resulten alteradas. La técnica debe permitir la transferencia estable de ácido nucleico a la célula, de modo que el ácido nucleico sea expresable por la célula y preferentemente heredable y expresable por su descendencia celular.

Las células recombinantes resultantes pueden administrarse a un sujeto mediante diversos métodos conocidos en la técnica. Células sanguíneas recombinantes (por ejemplo, células madre o progenitoras hematopoyéticas) son administradas preferentemente por vía intravenosa. La cantidad de células previstas para uso depende del efecto deseado, el estado del paciente, etc., y puede ser determinada por un experto en la materia.

Las células en las que puede introducirse un ácido nucleico para fines de terapia génica abarcan cualquier tipo celular disponible deseado, e incluyen, aunque sin limitarse a, células epiteliales, células endoteliales, queratinocitos, fibroblastos, células musculares, hepatocitos; células sanguíneas tales como linfocitos T, linfocitos B, monocitos, macrófagos, neutrófilos, eosinófilos, megacariocitos, granulocitos; diversas células madre o progenitoras, en particular células madre o progenitoras hematopoyéticas, por ejemplo, tal como las obtenidas de médula ósea, sangre del cordón umbilical, sangre periférica, hígado fetal, etc.

En una realización preferida, la célula usada para terapia génica es autóloga al sujeto.

En una realización en la que se usan células recombinantes en terapia génica, se introducen secuencias de ácido nucleico que codifican ABD-Fc-agente bioactivo en las células de modo que éstas sean expresables por las células o su descendencia, y las células recombinantes son administradas a continuación in vivo para efecto terapéutico. En una realización específica, se usan células madre o progenitoras. Cualesquiera células madre y/o progenitoras que pueden aislarse y mantenerse in vitro pueden usarse potencialmente de acuerdo con esta realización de la presente invención (véase por ejemplo, la publicación PCT WO 94/08598; los documentos Stemple y Anderson, *Cell*, 7 1: 973-985, 1992; Rheinwald, *Meth. Cell Bio.*, 21A: 229, 1980; y Pittelkow and Scott, *Mayo Clinic Proc.*, 61: 771, 1986).

En una realización específica, el ácido nucleico a introducir para fines de terapia génica comprende un promotor inducible unido de forma operativa a la región codificante, de modo que la expresión del ácido nucleico es controlable controlando la presencia o ausencia del inductor de la transcripción apropiado.

##### 5 *Caracterización y demostración de utilidad terapéutica o profiláctica*

El ABD-Fc-agente bioactivo de la presente invención puede caracterizarse de diversas maneras. En particular, puede caracterizarse la actividad del agente bioactivo. En una realización, el ABD-Fc incluye un agente bioactivo que es un anticuerpo o fragmento del mismo. La actividad del anticuerpo, o fragmento, puede ensayarse para su capacidad de unirse inmunespecíficamente a un antígeno. Dicho ensayo puede realizarse en solución (por ejemplo, Houghten, *Bio/Techniques*, 13: 412-421, 1992), en perlas (Lam, *Nature*, 354: 82-84, 1991, en chips (Fodor, *Nature*, 364: 555-556, 1993), en bacterias (Patente de Estados Unidos Nº 5.223.409), en esporas (Patentes de Estados Unidos Nº 5.571.698; 5.403.484; y 5.223.409), en plásmidos (Cull *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 89: 1865-1869, 1992) o en fagos (Scott y Smith, *Science*, 249: 386-390, 1990; Devlin, *Science*, 249: 404-406, 1990; Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 87: 6378-6382, 1990; y Felici, *J. Mol. Biol.*, 222: 301-310, 1991). Los anticuerpos que se ha identificado que se unen inmunespecíficamente a un antígeno o un fragmento del mismo pueden ensayarse a continuación para la especificidad de su afinidad por el antígeno.

La afinidad de unión de un anticuerpo de una molécula de ABD-Fc a un antígeno y la constante de disociación de una interacción anticuerpo-antígeno puede determinarse mediante ensayos de unión competitiva. Un ejemplo de un ensayo de unión competitiva es un radioinmunoensayo que comprende la incubación del antígeno marcado (por ejemplo, 3H o 125I) con el anticuerpo de interés en presencia de cantidades crecientes de antígeno no marcado, y la detección del anticuerpo unido al antígeno marcado. La afinidad del anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo por el antígeno y las constantes de disociación de la unión pueden determinarse a partir de los datos de saturación mediante análisis de Scatchard. La competencia con un segundo anticuerpo también puede determinarse usando radioinmunoensayos. En este caso, el antígeno se incubaba con un anticuerpo de la presente invención o un fragmento del mismo conjugado a un anticuerpo marcado (por ejemplo, 3H o 125I) en presencia de cantidades crecientes de un segundo anticuerpo no marcado.

En una realización preferida, se usa el análisis cinético BIAcore para determinar las constantes de asociación y de disociación de la unión de anticuerpos a un antígeno. El análisis cinético BIAcore comprende analizar la unión y la disociación de un antígeno a partir de chips con anticuerpos inmovilizados sobre su superficie (véase la sección de ejemplos *infra*).

El ABD-Fc que incluye un agente bioactivo tal como un anticuerpo también puede ensayarse para su capacidad para inhibir la unión de un antígeno a su receptor de la célula huésped usando técnicas conocidas por los expertos en la materia. Por ejemplo, células que expresan el receptor para un antígeno viral pueden ser contactadas con virus en presencia o ausencia de un anticuerpo y la capacidad del anticuerpo para inhibir la unión al antígeno viral puede medirse, por ejemplo, mediante citometría de flujo o un contador de centelleo. El antígeno o el anticuerpo puede estar marcado con un compuesto detectable tal como una marca a radiactiva (por ejemplo 32P, 35S y 125I) o una marca fluorescente (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, ficoeritrina, ficocianina, alofococianina, o-ftaldehído y fluorescamina) para permitir la detección de una interacción entre el antígeno y su receptor de la célula huésped. Como alternativa, la capacidad de anticuerpos para inhibir que un antígeno se una a su receptor puede determinarse en ensayos libres de células. Por ejemplo, virus o un antígeno viral (por ejemplo, glucoproteína F de VRS) puede contactarse en un ensayo libre de células con un anticuerpo y la capacidad del anticuerpo para inhibir que el virus o el antígeno viral se una a su receptor de la célula huésped puede determinarse. Preferentemente, el anticuerpo está inmovilizado sobre un soporte sólido y el antígeno está marcado con un compuesto detectable. Como alternativa, el antígeno está inmovilizado sobre un soporte sólido y el anticuerpo está marcado con un compuesto detectable. El antígeno puede estar parcial o completamente purificado (por ejemplo, parcial o completamente libre de otros polipéptidos) o ser parte de un lisado celular. Además, el antígeno puede ser un ABD-Fc-agente bioactivo que comprende el antígeno viral y un dominio tal como glutatiónina-5-transferasa. Como alternativa, un antígeno puede biotinizarse usando técnicas bien conocidas por los expertos en la materia (por ejemplo, kit de biotilación, Pierce Chemicals; Rockford, Ill.).

El ABD-Fc-agente bioactivo y composiciones de la invención se ensayan preferentemente *in vitro*, y a continuación *in vivo* para la actividad terapéutica o profiláctica deseada, antes de usarlo en seres humanos. Por ejemplo, ensayos *in vitro* que pueden usarse para determinar si la administración de un ABD-Fc-agente bioactivo específico o una composición de la presente invención es indicada, incluyen ensayos de cultivo celular *in vitro* en los que una muestra de tejido del sujeto se hace crecer en cultivo, y se expone a o se le administra de otro modo ABD-Fc-agente bioactivo, o composición de la presente invención, y se observa el efecto de dicho ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la presente invención sobre la muestra de tejido. En diversas realizaciones específicas, pueden llevarse a cabo ensayos *in vitro* con células o tipos celulares representativos implicados en una enfermedad o trastorno, para determinar si ABD-Fc-agente bioactivo, o composición de la presente invención tiene un efecto deseado sobre dichos tipos celulares. Preferentemente, el ABD-Fc-agente bioactivo, o composiciones de la invención también son ensayados en ensayos *in vitro* y sistemas con modelos animales antes de la administración a seres humanos.

El ABD-Fc-agente bioactivo, o composiciones de la presente invención para uso en terapia génica pueden ensayarse para su toxicidad en sistemas con modelos animales adecuados, incluyendo aunque sin limitarse a ratas, ratones, vacas, monos y conejos. Para ensayos in vivo para la toxicidad de ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición, puede usarse cualquier sistema con modelo animal conocido en la técnica.

5 La eficacia en el tratamiento o la prevención de infección vírica puede demostrarse detectando la capacidad de un ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención para inhibir la replicación del virus, para inhibir la transmisión o impedir que el virus se establezca en su huésped, o para prevenir, mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados con infección vírica. El tratamiento es considerado terapéutico si existe, por ejemplo, una  
10 reducción de la carga viral, una mejora de uno o más síntomas o una disminución de la mortalidad y/o morbilidad después de la administración de ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención. ABD-Fc-agente bioactivo, o composiciones de la invención también pueden ensayarse para su capacidad para inhibir la replicación viral o reducir la carga viral en ensayos in vitro e in vivo.

15 La eficacia en el tratamiento o la prevención de una infección bacteriana puede demostrarse detectando la capacidad de ABD-Fc-agente bioactivo o una composición de la invención para inhibir la replicación bacteriana, o para prevenir, mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados con infección bacteriana. El tratamiento es considerado terapéutico si existe, por ejemplo, una reducción de la cantidad de bacterias, mejora de uno o más síntomas o una disminución de la mortalidad y/o la morbilidad después de la administración de ABD-Fc-agente  
20 bioactivo o una composición de la invención.

La eficacia en el tratamiento del cáncer puede demostrarse detectando la capacidad de ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención para inhibir o reducir el crecimiento o la metástasis de células cancerosas o para mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados con el cáncer. El tratamiento es considerado terapéutico si existe,  
25 por ejemplo, una reducción del crecimiento o la metástasis de células cancerosas, la mejora de uno o más síntomas asociados con el cáncer, o una disminución de la mortalidad y/o la morbilidad después de la administración de ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención. ABD-Fc-agente bioactivo o composiciones de la invención pueden ensayarse para su capacidad para reducir la formación de tumores en ensayos in vitro, ex vivo e in vivo.

30 La eficacia en el tratamiento trastornos inflamatorios puede demostrarse detectando la capacidad de un ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención para reducir o inhibir la inflamación en un animal o para mejorar o aliviar uno o más síntomas asociados con un trastorno inflamatorio. El tratamiento es considerado terapéutico si existe, por ejemplo, una reducción de su inflamación o mejora de uno o más síntomas después de la administración de ABD-Fc-agente bioactivo, o una composición de la invención.

35 *Usos de diagnóstico*

El ABD-Fc-agente bioactivo de la invención puede usarse para fines de diagnóstico para detectar, diagnosticar o monitorizar enfermedades, trastornos o infecciones. La invención permite la detección o el diagnóstico de una  
40 enfermedad, trastorno o infección, que comprende: (a) ensayar la expresión de un antígeno en células o una muestra de tejido de un sujeto usando uno o más anticuerpos que se unen inmuno-específicamente al antígeno; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normales, con lo que un incremento en el nivel ensayado de antígeno en comparación con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección. La divulgación también permite la detección o el diagnóstico de  
45 una enfermedad, trastorno o infección, que comprende (a) ensayar la expresión de un antígeno en células o una muestra de tejido de un sujeto usando ABD-Fc que incluye un agente bioactivo de la invención que se une al antígeno; y (b) comparar el nivel del antígeno con un nivel de control, por ejemplo, niveles en muestras de tejido normales, con lo que un incremento de antígeno en comparación con el nivel de control del antígeno es indicativo de la enfermedad, trastorno o infección. Por consiguiente, el ABD-Fc incluye un agente bioactivo tal como un ligando,  
50 citoquina o factor de crecimiento y la región bisagra-Fc o fragmentos de la misma, en la que el ABD-Fc incluye un agente bioactivo, es capaz de unirse a un antígeno que está siendo detectado.

El ABD-Fc que incluye un agente bioactivo de la invención puede usarse para ensayar niveles de antígeno en una muestra biológica usando, por ejemplo, SDS-PAGE e inmunoensayos conocidos por los expertos en la materia.

55 Un aspecto de la divulgación es la detección y el diagnóstico de una enfermedad, trastorno o infección en un ser humano. En una realización, el diagnóstico comprende: a) administrar (por ejemplo, por vía parenteral, por vía subcutánea, o por vía intraperitoneal) a un sujeto una cantidad efectiva de un ABD-Fc marcado que incluye un agente bioactivo tal como un anticuerpo que se une inmuno-específicamente a un antígeno; b) esperar durante un  
60 intervalo de tiempo después de la administración para permitir que el anticuerpo marcado se concentre preferentemente en zonas en el sujeto donde el antígeno se expresa (y para molécula marcada no unida a ser aclarada a nivel de fondo); c) determinar el nivel de fondo; y d) detectar el anticuerpo marcado en el sujeto, de modo que la detección de anticuerpo marcado por encima del nivel de fondo indica que el sujeto tiene la enfermedad, trastorno o infección. De acuerdo con esta realización, el anticuerpo está marcado con una fracción de inmunología  
65 que es detectable usando un sistema de inmunología conocido por un experto en la materia. El nivel de fondo

puede determinarse mediante diversos métodos que incluyen, comparar la cantidad de molécula marcada detectada con un valor estándar determinado previamente para un sistema particular.

### Ejemplos

5 Los siguientes ejemplos, que incluyen los experimentos llevados a cabo y los resultados conseguidos se proporcionan para fines ilustrativos solamente y no deben interpretarse como limitantes de las enseñanzas en el presente documento.

10 Ejemplo 1: Generar construcciones de fusión ABD-Fc:

Se construyó un marco abierto de lectura que codifica 42 aminoácidos de proteína del dominio de unión a albúmina "ABD" (Johansson *et al.*, 2002, *supra*) usando varias reacciones en cadena de la polimerasa secuencial para ensamblar 8 nucleótidos solapantes. El ORF del ABD se insertó N terminal respecto a la región constante (Fc) de Igg2A murina en un vector de expresión de mamífero mediante sitios de NheI y Kas I. La construcción parental final ABD-Fc contenía 46 aminoácidos de ABD seguidos por los residuos 216 a 460 de Fc de Igg 2A murina que incluyen los dominios de región bisagra, CH2 y CH3 respectivamente. Después del dominio CH3 C terminal, se insertaron etiquetas c-Myc y His en tándem separadas por un enlazador (Gly4)Ser flexible para posteriores estudios farmacocinéticos. La integridad de la construcción de fusión se confirmó mediante secuenciación de ADN. Todos los mutantes de la construcción parental ABD-Fc se realizaron usando una estrategia de PCR solapantes y se insertaron en un vector de expresión de mamífero usando sitios de restricción de KasI/NheI o NheI/NotI. Se usó la siguiente nomenclatura para describir los mutantes de ABD-Fc:

25 ABD-Fc: fusión de ABD sin modificar y Fc sin modificar (unión a tanto HSA/MSA como FcRn)  
 ABD-TM-Fc: mutaciones "knockout" triples de residuos de ABD S18A; T20A y Y21A (unión reducida de ABD a HSA/MSA);  
 ABD-Fc (His 310): sustitución "knockout" en la región Fc de Igg2A H310A (unión reducida de Fc a FcRn); y  
 ABD-Fc-DM: una mutación triple combinada en ABD (S18A; Y20A y Y21A) y Fc (H310A). Unión reducida de tanto ABD a HSA/MSA como Fc a FcRn.

30 Véase la figura 2 para un esquema de las diferentes variantes. Las secuencias se muestran a continuación:

#### ABD-Fc

MPLLLLLLPLLWAGALALAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLI  
 NNAKTVEGVKALIDEILAALPGAEPARGPTIKPCPPCKCPAPN  
 LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS  
 WFNNEVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSG  
 KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM  
 TKKQVTLTCMVTFDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL  
 DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT  
 KSFSRTPGKGGGGSEQKLISEEDLGGGGSHHHHHHStop (SEC ID N° 5)

#### ABD-TM-Fc

MPLLLLLLPLLWAGALALAEAKVLANRELDKYGVADAYANL  
 INNAKTVEGVKALIDEILAALPGAEPARGPTIKPCPPCKCPAPN  
 LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS  
 WFNNEVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQHQDWMMSG  
 KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM  
 TKKQVTLTCMVTFDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL  
 DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT  
 KSFSRTPGKGGGGSEQKLISEEDLGGGGSHHHHHHStop (SEC ID N° 6)

35

**ABD-(His310TM)-Fc**

**MPLLLLLLPLLWAGALALAEAKVLANRELDKYGVSDYYKNLI  
 NNAKTVEGVKALIDEILAALPGAEPGPTIKPCPPCKCPAPN  
 LLGGPSVFIFPPKIKDVLMSLSPIVTCVVVDVSEDDPDVQIS  
 WFNVEVHTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPIQAQDWMSG  
 KEFKCKVNNKDLPAPIERTISKPKGSVRAPQVYVLPPEEEM  
 TKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEWTNNGKTELNYKNTEPVL  
 DSDGSYFMYSKLRVEKKNWVERNSYSCSVVHEGLHNHHTT  
 KSFSRTPG KGGGGSEQKLISEEDL GGGGSHHHHHHStop ( SEC ID Nº 7)**

Las construcciones finales se transfectaron transitoriamente en riñón embrionario humano (células HEK 293) usando Lipofectomina (Invitrogen, Inc, Carlsbad CA) y protocolos convencionales. Las proteínas de fusión de ABD-Fc se recogieron típicamente 72 y 144 horas después de la transfección y se purificaron del medio acondicionado directamente en la columna HiTrap Protein A de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). ABD-Fc (His 310) y ABD-Fc-DM no podían purificarse mediante la columna HiTrapA debido a sitios de unión a proteína A alterados. Por lo tanto, el medio acondicionado que contenía estas proteínas se intercambió por tampón en primer lugar en Hepes 50 mM pH 7,5; NaCl 150 mM; Imidazol 10 mM y se purificó mediante columna HiTrap NiNTA de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). Como última etapa de purificación, todas las proteínas se hicieron pasar a través de una columna de exclusión molecular S-200 (GE Healthcare). La pureza de la proteína estaba por encima del 98 % tal como se estudió mediante SDS PAGE en condiciones reductoras y no reductoras.

## Ejemplo 2: Ensayos de ABD-Fc para unión a HSA usando mediciones Biacore

La interacción entre diferentes variantes de ABD-Fc y MSA (albúmina de suero de ratón), HSA (albúmina de suero humano) y mFcRn se monitorizaron mediante detección por resonancia del plasmón superficial usando el instrumento BIAcore 3000. (GE Healthcare). En primer lugar, se acoplaron variantes de ABD-Fc a una matriz de dextrano del chip sensor CM5 usando un kit *Amine Coupling Kit* a una densidad superficial de 1000-2000 RU de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Albúmina humana y de ratón así como FcRn de ratón se hicieron circular en un ensayo-experimentos de unión a las concentraciones que variaban entre 0,1-10  $\mu$ M a un caudal de 5  $\mu$ l/min. Se llevaron a cabo experimentos de dilución y unión en PBS pH 7,5; NaCl 150 mM; Tween al 0,005 % para unión a albúmina y fosfato de Na 50 mM pH 6,0; NaCl 150 mM; Tween al 0,005 % para FcRn de ratón. Posteriormente, el formato de los experimentos de Biacore se invirtieron donde albúmina de ratón y humana así como FcRn de ratón se acoplaron a un chip CM5 usando el kit *Amine Coupling Kit* a densidades superficiales que variaban entre 500-1500 RU. Las variantes de ABD-Fc se hicieron circular a tres concentraciones diferentes 0,5; 1 and 10  $\mu$ M. El último formato tuvo más éxito debido a una señal más elevada y autoconsistencia.

Aunque las constantes de equilibrio de la unión (Kd) no se determinaron, tres concentraciones del inyectante (ABD-Fc o FcRn de ratón dependiendo del formato BIAcore (0,1  $\mu$ M; 1  $\mu$ M y 10  $\mu$ M) se ensayaron para establecer que la unión es específica. Tal como se predijo, ABD-Fc se une a HSA, MSA y FcRn de ratón. Cuando se introduce una mutación triple en ABD, ABD-TM-Fc, ya no puede unirse a la albúmina sino que conserva la unión a FcRn de ratón. La variante de ABD-Fc con la mutación en la región Fc (ABD-Fc (His 310) ya no puede unirse a FcRn pero conserva la capacidad de unirse a albúmina. El doble mutante (ABD-Fc-DM) con sitios de albúmina y FcRn mutados no interactúa con proteína alguna en estas condiciones experimentales.

## Ejemplo 3: Dispersión de luz estática multiangular

Se realizaron mediciones de dispersión de luz estática a 25°C usando un detector de dispersión de luz de tres ángulos (Wyatt Technologies, Santa Barbara, CA) y un detector de índice de refracción diferencial (Wyatt Optilab DSP; Wyatt Technologies) que funcionan en línea con un sistema de HPLC. Las muestras se dializaron durante una noche a 4°C contra tampón de migración (NaCl 150 mM, fosfato de Na 50 mM pH 6,0 y NaN<sub>3</sub> al 0,01 %). Las muestras se inyectaron en una columna de exclusión molecular G3000PWXL (TosoHaas, Montgomeryville, PA) equilibrada con tampón de migración a concentraciones de carga entre 1,0 y 3,5 mg/ml (proteína aproximadamente 80 a 200  $\mu$ M). La adquisición y el análisis de datos se realizaron usando el software ASTRA 5.0 (Wyatt Technologies).

Para determinar la estequiometría de la interacción ABD-Fc/albúmina, ABD-Fc/mFcRn y ABD-Fc/albúmina/mFcRn, se usó dispersión de luz estática multiangular (MASLS). Esta técnica, cuando se acoplaba con cromatografía de exclusión molecular proporciona el peso molecular promediado en peso en cada punto del perfil de elución cromatográfica (Wyatt, 1993). A una proporción molar de 4:1, mFcRn y ABD-Fc se eluyen juntos al peso molecular de 164 kD y 259 kD que corresponden al complejo 1:1 y 2:1, respectivamente. Este resultado es coherente con la noción de que FcRn puede unirse a la región Fc del anticuerpo con estequiometría 2:1. Estos datos también sugieren que la fusión del polipéptido ABD al Fc no interfiere en la formación del complejo 2:1, no obstante el complejo 1:1 también está presente. A 2:1 se observó que la proporción molar de albúmina de suero humano con

respecto a ABD mostraba un complejo 1:1 más débil (con peso molecular aparente de ~145 kD) que se disocia parcialmente en la columna de filtración en gel. Este resultado confirma la interacción entre la albúmina y ABD en solución mientras que la rápida disociación en la columna de filtración en gel sugiere que la afinidad de ABD-Fc por HSA es más débil que aquella por FcRn de ratón. Cuando la formación del complejo trimolecular (ABD-Fc/HSA/mFcRn) se ensayó usando MASLS, se observó un desplazamiento en el peso molecular correspondiente a la formación de la especie de peso molecular más elevado. Sin embargo, no se pudieron determinar definitivamente estequiometrías de solución respectivas.

Ejemplo 4: Farmacocinética

Se llevaron a cabo análisis en ratones CD-1. A cada animal (3/grupo) se le inyectó una única dosis de cada una de las cuatro variantes de ABD-Fc descritas anteriormente a 10 mg/kg mediante la vía intraperitoneal. A cohortes de 3 ratones cada una para cada dosis se les extrajo sangre por separado a las 2 horas, 24 horas y 72 horas, el día 5, día 7 y día 10, respectivamente. El suero obtenido de las extracciones se usó para la determinación de los niveles de ABD-Fc en suero usando un ensayo ELISA anti-ABD-Fc. En resumen, pocillos individuales de una inmunoplateca Maxisorp de 96 pocillos (Nunc) se revistieron con 50 ng de un anticuerpo de cabra anti-His (BD Biosciences, San Jose, CA). Las placas se bloquearon con leche en polvo desnatada al 5 % (p/v) (Biorad), se incubaron con muestras o estándares (0,1-20 ng/ml), a continuación con un conjugado HRP de un anticuerpo policlonal de cabra anti-Fc de ratón (Pierce). La actividad peroxidasa se detectó con 3,3',5,5'-tetrametilbenzidina (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, MD), y la reacción se interrumpió con H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 0,18 M. La absorbancia a 450 nm se midió con un lector de microplacas cinético V<sub>max</sub> que ejecutaba el software SoftMaxPro 3.1.1 (Molecular Devices, Sunnyvale, CA).

Para correlacionar la unión *in vitro* con la prolongación de la semivida, se ensayaron las cuatro construcciones ABD-Fc descritas anteriormente en estudios farmacocinéticos. Las cuatro proteínas se inyectaron en diferentes ratones CD-1 y su concentración en suero (µg/ml) se determinó mediante ELISA. La construcción ABD-Fc de tipo silvestre se detecta a mayores concentraciones en el suero durante un periodo de 10 días que cualquiera de las variantes ABD-Fc mutantes. El mutante ABD-TM-Fc tiene una velocidad de aclaramiento similar a ABD-Fc (His310) mientras que la presencia del doble mutante ABD-DM no podía detectarse después de 24 horas posinyección. Véase la figura 3. Estos datos muestran que la fusión de ABD al Fc causa un efecto sinérgico positivo sobre la semivida. Esto también muestra que combinar tanto una albúmina del suero como el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn entre sí en una molécula da como resultado un efecto sinérgico positivo cuando se compara con una albúmina de suero o fragmento Fc de IgG de unión a FcRn en solitario.

LISTA DE SECUENCIAS

<110> MedImmune, LLC

<120> MOLÉCULAS CON SEMIVIDAS PROLONGADAS Y USOS DE LAS MISMAS

<130> MED0035.PCT

<150> US 61/182.858

<151> 01-06-2009

<160> 15

<170> PatentIn versión 3.5

<210> 1

<211> 46

<212> PRT

<213> Streptococcus sp. G148

<400> 1

```

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1                5                10                15

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20                25                30

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro
35                40                45
    
```



ES 2 548 030 T3

5 <210> 2  
 <211> 45  
 <212> PRT  
 <213> Peptostreptococcus magnus

<400> 2

Leu Lys Asn Ala Lys Glu Asp Ala Ile Ala Glu Leu Lys Lys Ala Gly  
 1 5 10 15

Ile Thr Ser Asp Phe Tyr Phe Asn Ala Ile Asn Lys Ala Lys Thr Val  
 20 25 30

Glu Glu Val Asn Ala Leu Lys Asn Glu Ile Leu Lys Ala  
 35 40 45

10 <210> 3  
 <211> 846  
 <212> ADN  
 <213> Secuencia artificial

15 <220>  
 <223> ADN recombinante

20 <400> 3

gctctggctg aagctaaagt cctggctaac cgcgaaactgg acaaatatgg tgtatccgac 60  
 tattacaaga acctgatcaa caatgccaaa actggtgaag gtgtaaaagc actgattgat 120  
 gaaattctgg ctgcactgcc tggcgccgag cccagagggc ccacaatcaa gccctgtcct 180  
 ccatgcaaat gcccagcacc taacctcttg ggtggaccat ccgtcttcat ctccctcca 240  
 aagatcaagg atgtactcat gatctccctg agcccatag tcacatgtgt ggtggtggat 300  
 gtgagcgagg atgaccaga tgtccagatc agctggtttg tgaacaacgt ggaagtacac 360  
 acagctcaga cacaaacca tagagaggat tacaacagta ctctccgggt ggtcagtgcc 420  
 ctccccatcc agcaccagga ctggatgagt ggcaaggagt tcaaatgcaa ggtcaacaac 480  
 aaagacctcc cagcgcccat cgagagaacc atctcaaac ccaaagggtc agtaagagct 540  
 ccacaggtat atgtcttgcc tccaccagaa gaagagatga ctaagaaaca ggtcactctg 600  
 acctgcatgg tcacagactt catgcctgaa gacatttacg tggagtggac caacaacggg 660  
 aaaacagagc taaactaaa gaacactgaa ccagtcctgg actctgatgg ttcttacttc 720  
 atgtacagca agctgagagt ggaaaagaag aactgggtgg aaagaaatag ctactcctgt 780  
 tcagtgttcc acgaggggtct gcacaatcac cacacgacta agagcttctc ccggactccg 840  
 ggtaaa 846

25 <210> 4  
 <211> 281  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

ES 2 548 030 T3

<220>

<223> Proteína recombinante

<400> 4

5

```

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly
1          5          10          15
Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu
20          25          30
Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly Ala
35          40          45
Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro
50          55          60
Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys
65          70          75          80
Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val
85          90          95
Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe
100         105         110

```

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu  
 115 120 125

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His  
 130 135 140

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys  
 145 150 155 160

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser  
 165 170 175

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met  
 180 185 190

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro  
 195 200 205

Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn  
 210 215 220

Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met  
 225 230 235 240

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser  
 245 250 255

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr  
 260 265 270

---

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys  
 275 280

5 <210> 5  
 <211> 323  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

10 <220>  
 <223> Proteina recombinante

<400> 5

ES 2 548 030 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
20 25 30

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
35 40 45

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly Ala  
 50 55 60

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro  
 65 70 75 80

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys  
 85 90 95

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val  
 100 105 110

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe  
 115 120 125

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu  
 130 135 140

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His  
 145 150 155 160

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys  
 165 170 175

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser  
 180 185 190

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met  
 195 200 205

---

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro  
 210 215 220

Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn  
 225 230 235 240

Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met  
 245 250 255

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser  
 260 265 270

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr  
 275 280 285

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Gln  
 290 295 300

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Gly Gly Ser His His His  
 305 310 315 320

His His His

<210> 6  
 <211> 323  
 <212> PRT  
 <213> Secuencia artificial

<220>  
 <223> Proteína recombinante

<400> 6

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
 1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
 20 25 30

Val Ala Asp Ala Tyr Ala Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
 35 40 45

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly Ala  
 50 55 60

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro  
 65 70 75 80

Ala Pro Asn Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys  
 85 90 95

Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Ile Val Thr Cys Val  
 100 105 110

Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp Phe  
 115 120 125

Val Asn Asn Val Glu Val His Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg Glu  
 130 135 140

Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln His  
 145 150 155 160

Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn Lys  
 165 170 175

Asp Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly Ser  
 180 185 190

ES 2 548 030 T3

Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu Met  
 195 200 205

Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met Pro  
 210 215 220

Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu Asn  
 225 230 235 240

Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe Met  
 245 250 255

Tyr Ser Lys Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn Ser  
 260 265 270

Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr Thr  
 275 280 285

Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Glu Gln  
 290 295 300

Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Gly Gly Gly Ser His His His  
 305 310 315 320

His His His

- <210> 7
- <211> 323
- 5 <212> PRT
- <213> Secuencia artificial
- <220>
- <223> Proteína recombinante
- 10 <400> 7

ES 2 548 030 T3

Met Pro Leu Leu Leu Leu Leu Pro Leu Leu Trp Ala Gly Ala Leu Ala  
1 5 10 15

Leu Ala Glu Ala Lys Val Leu Ala Asn Arg Glu Leu Asp Lys Tyr Gly  
20 25 30

Val Ser Asp Tyr Tyr Lys Asn Leu Ile Asn Asn Ala Lys Thr Val Glu  
35 40 45

Gly Val Lys Ala Leu Ile Asp Glu Ile Leu Ala Ala Leu Pro Gly Ala  
50 55 60

Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys Pro





ES 2 548 030 T3

<210> 8  
 <211> 232  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 8

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala  
 1 5 10 15

Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro  
 20 25 30

Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val  
 35 40 45

Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val  
 50 55 60

Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln  
 65 70 75 80

Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln  
 85 90 95

Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala  
 100 105 110

Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro  
 115 120 125

---

Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr  
 130 135 140

Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser  
 145 150 155 160

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr  
 165 170 175

Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr  
 180 185 190

Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe  
 195 200 205

Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys  
 210 215 220

Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 225 230

ES 2 548 030 T3

<210> 9  
 <211> 228  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

5

<400> 9

Glu Arg Lys Cys Cys Val Glu Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Pro Val  
 1 5 10 15

Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu  
 20 25 30

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser  
 35 40 45

His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu  
 50 55 60

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr  
 65 70 75 80

Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Val His Gln Asp Trp Leu Asn  
 85 90 95

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ala Pro  
 100 105 110

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln  
 115 120 125

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val  
 130 135 140

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ser Val  
 145 150 155 160

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro  
 165 170 175

Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr  
 180 185 190

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val  
 195 200 205

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu  
 210 215 220

Ser Pro Gly Lys  
225

5  
<210> 10  
<211> 279  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 10

Glu Leu Lys Thr Pro Leu Gly Asp Thr Thr His Thr Cys Pro Arg Cys  
1 5 10 15

Pro Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro  
20 25 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Glu  
35 40 45

Pro Lys Ser Cys Asp Thr Pro Pro Pro Cys Pro Arg Cys Pro Ala Pro  
50 55 60

Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
65 70 75 80

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
85 90 95

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Lys Trp Tyr Val Asp  
100 105 110

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
115 120 125

Asn Ser Thr Phe Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
130 135 140

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
145 150 155 160

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Gln Pro Arg  
165 170 175

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys  
180 185 190

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
195 200 205

ES 2 548 030 T3

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Ser Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Asn  
210 215 220

Thr Thr Pro Pro Met Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
225 230 235 240

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Ile Phe Ser  
245 250 255

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser  
260 265 270

Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
275

<210> 11  
<211> 229  
<212> PRT  
<213> Homo sapiens  
  
<400> 11

5

ES 2 548 030 T3

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser Cys Pro Ala Pro Glu Phe  
 1 5 10 15  
 Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr  
 20 25 30  
 Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val  
 35 40 45  
 Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val  
 50 55 60  
 Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser  
 65 70 75 80  
 Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu  
 85 90 95  
 Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser  
 100 105 110  
 Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro  
 115 120 125  
 Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln  
 130 135 140  
 Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala  
 145 150 155 160  
 Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr  
 165 170 175  
 Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser  
 195 200 205  
 Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser  
 210 215 220  
 Leu Ser Leu Gly Lys  
 225

<210> 12  
 <211> 8  
 <212> PRT

ES 2 548 030 T3

<213> Homo sapiens

<400> 12

5

**His Gln Asn Leu Ser Asp Gly Lys**  
**1 5**

<210> 13

<211> 8

<212> PRT

10

<213> Homo sapiens

<400> 13

**His Gln Asn Ile Ser Asp Gly Lys**  
**1 5**

15

<210> 14

<211> 8

<212> PRT

<213> Homo sapiens

20

<400> 14

**Val Ile Ser Ser His Leu Gly Gln**  
**1 5**

25

<210> 15

<211> 11

<212> PRT

<213> Homo sapiens

30

<400> 15

**Pro Lys Asn Ser Ser Met Ile Ser Asn Thr Pro**  
**1 5 10**

## REIVINDICACIONES

- 5 1. Una molécula que comprende un dominio de unión a albúmina (ABD) de la proteína G de *Streptococcus* fusionado a un fragmento Fc de IgG de unión a FcRn, en la que la molécula que comprende el ABD fusionado al fragmento Fc de IgG de unión a FcRn tiene una semivida más prolongada que una molécula que comprende el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn sin un ABD o que comprende el ABD sin el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn.
- 10 2. La molécula de la reivindicación 1, en la que la semivida es al menos un 10 % más prolongada.
3. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el fragmento Fc de IgG de unión a FcRn es un fragmento Fc de IgG1, IgG2, IgG3 o IgG4.
- 15 4. La molécula de la reivindicación 3, en la que el fragmento Fc comprende una región bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3.
5. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio ABD comprende una secuencia de aminoácidos de la SEC ID N° 1; la SEC ID N° 2; o una variante de la SEC ID N° 1 o la SEC ID N° 2.
- 20 6. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que un péptido enlazador separa el dominio ABD y el fragmento Fc.
7. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, en la que el dominio ABD está en el extremo carboxilo terminal de la molécula.
- 25 8. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende además un agente bioactivo de interés.
9. La molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-6, en la que el agente bioactivo es un polipéptido.
- 30 10. La molécula de la reivindicación 7, en la que el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
11. Una composición que comprende la molécula de cualquiera de las reivindicaciones anteriores junto con un vehículo, adyuvante o diluyente farmacéuticamente aceptable.
- 35 12. Una secuencia de ácido nucleico que codifica la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.
13. Una célula huésped que comprende el ácido nucleico de la reivindicación 12.
- 40 14. Un método de producción de una molécula, que comprende cultivar una línea celular transfectada con el ácido nucleico de la reivindicación 12 y purificar el polipéptido codificado por éste.
- 45 15. Un método de incremento de la semivida *in-vivo* de un agente bioactivo de interés que comprende fusionar genéticamente o conjugar químicamente el agente bioactivo con la molécula de cualquiera de las reivindicaciones 1-7.



Fig 1

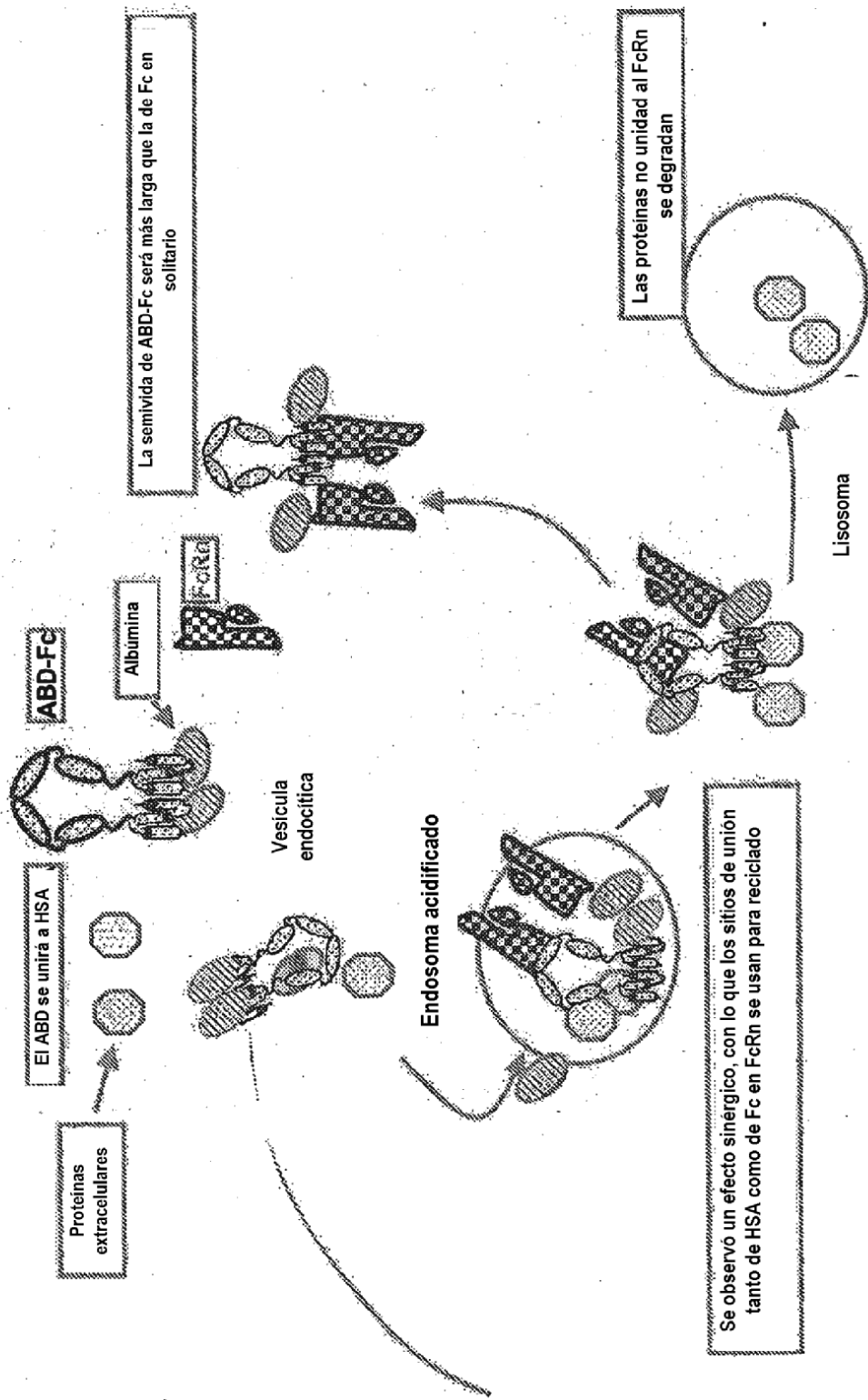


Fig 2

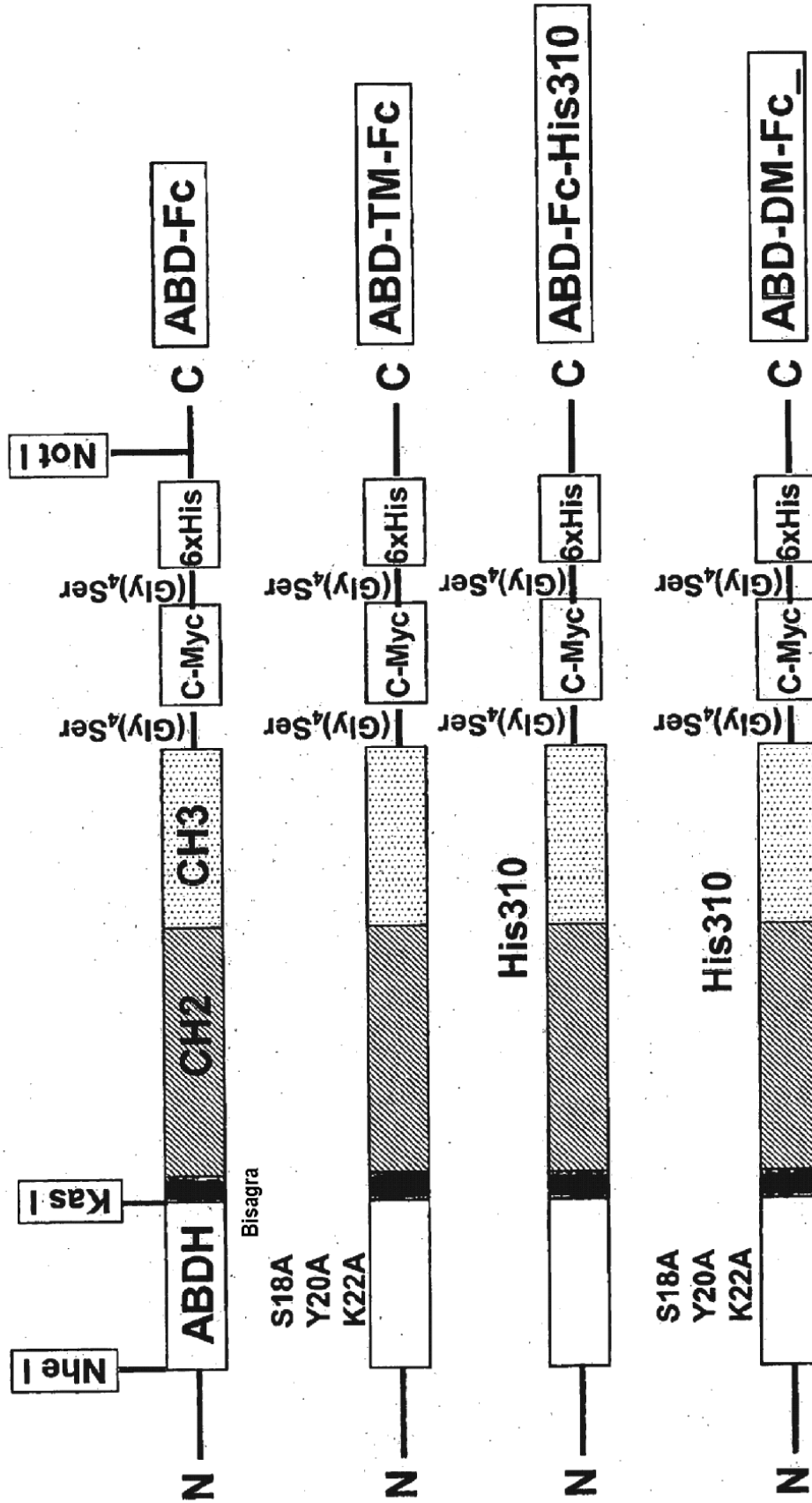


Fig 3.

