

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 552 793**

51 Int. Cl.:

C07K 14/47 (2006.01)
A61P 1/00 (2006.01)
A61P 29/00 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 37/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **17.06.2010 E 10790213 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.08.2015 EP 2443144**

54 Título: **Variantes de SAP y su uso**

30 Prioridad:

17.06.2009 US 268961 P

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

02.12.2015

73 Titular/es:

**PROMEDIOR INC. (100.0%)
101 Hartwell Avenue
Lexington, MA 02421-3125, US**

72 Inventor/es:

WILLETT, W. SCOTT

74 Agente/Representante:

ARIAS SANZ, Juan

ES 2 552 793 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

Variantes de SAP y su uso

Antecedentes de la invención

5 El amiloide P del suero (SAP) es un miembro de la familia de proteínas de las pentraxinas. El SAP se secreta por el hígado y circula en la sangre como un pentámero estable. La investigación anterior demuestra que el SAP tiene una función importante en tanto las fases de iniciación como de resolución de la respuesta inmunitaria. SAP pueden unirse a residuos de azúcar sobre la superficie de bacterias y así promover su opsonización y fagocitosis por células presentadoras de antígeno. SAP también se une a ADN libre y cromatina generada por células apoptóticas en la resolución de una respuesta inmunitaria, previniéndose así una respuesta inflamatoria secundaria contra estos antígenos.

10 Moléculas unidas por SAP se eliminan de las áreas extracelulares debido a la capacidad de SAP para unirse a los tres receptores de Fc γ clásicos (Fc γ R), que tienen una afinidad particular por Fc γ RII (CD32) y Fc γ RIII (CD16). Después de la unión al receptor, SAP y cualquier complejo unidos son generalmente internalizados y procesados por la célula.

15 Recientemente, se ha sugerido que SAP puede usarse como un agente terapéutico para tratar diversos trastornos, que incluyen trastornos relacionados con la fibrosis, trastornos de hipersensibilidad, trastornos autoinmunitarios, mucositis y trastornos inflamatorios, tales como aquellos producidos por infección microbiana. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente N.ºs: 11/707.333, 12/217.617, 12/720.845 y 12/720.847. Los agentes terapéuticos de proteína para tratar enfermedad humana han revolucionado la industria sanitaria. Sin embargo, hay muchas dificultades en producir un producto terapéutico de proteína que tenga la potencia necesaria y/o en cantidad suficiente para ser útil como agente terapéutico. Muchos posibles agentes terapéuticos se modifican para aumentar su actividad biológica, tales como semivida en plasma, con respecto a la proteína naturalmente derivada. La tecnología de expresión recombinante normalmente se implementa para producir polipéptidos en cantidad suficiente. Desafortunadamente, muchos sistemas recombinantes producen polipéptidos que tienen propiedades biológicas diferentes de las de las formas naturalmente derivadas, que pueden afectar la farmacocinética, seguridad y eficacia de un producto terapéutico.

20

25 Por tanto, sigue existiendo la necesidad de desarrollar polipéptidos SAP adecuados para el tratamiento terapéutico de seres humanos. Los documentos WO 2009/009019 y WO 2009/009034 desvelan variantes de SAP para terapia.

Sumario de la invención

La invención se define por las reivindicaciones adjuntas.

30 En parte, la divulgación proporciona variantes de amiloide P del suero (SAP) y oligómeros de SAP. En ciertos aspectos, la divulgación proporciona una variante de SAP que comprende cinco protómeros de SAP, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos al menos el 90 % idéntica a SEC ID NO: 1 y en la que al menos uno de los protómeros de SAP comprende una o más modificaciones de aminoácidos que alteran una actividad biológica de la variante de SAP en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. En aspectos preferidos, una protómero de SAP variante comprende al menos una modificación de aminoácidos que se caracteriza por la presencia de uno o más aminoácidos variantes con respecto a SEC ID NO: 1, la ausencia de uno o más aminoácidos con respecto a SEC ID NO: 1, el acoplamiento de uno o más aminoácidos a un resto de modificación (por ejemplo, un resto de PEG, un resto de dextrano, etc.), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la variante de SAP es una variante de una proteína SAP humana. En algunas realizaciones, uno o más de los protómeros de SAP tienen una secuencia de aminoácidos al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o al menos el 100 % idéntica a SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, variantes de SAP tienen una actividad biológica alterada seleccionada de una o más de elevada semivida en plasma, elevada estabilidad *in vitro* o elevada estabilidad *in vivo*. En algunas realizaciones, variantes de SAP de la divulgación se caracterizan por elevada eficiencia de fabricación de la proteína SAP (por ejemplo, mayor rendimiento del producto de proteína, elevada homogeneidad del producto de proteína, elevada estabilidad del producto de proteína).

35

40

45 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona variantes de SAP que comprenden uno o más protómeros de SAP que están sustancialmente libres de glucanos asociados en N o asociados en O. En algunas realizaciones, un protómero de SAP comprende una modificación de aminoácidos en la posición 32 de SEC ID NO: 1 que inhibe la unión de un glucano asociado en N. En algunas realizaciones, al menos un protómero de SAP comprende un aminoácido en la posición 32 de SEC ID NO: 1 que no es asparagina (N). En realizaciones preferidas, al menos un protómero de SAP comprende un aspartato (D), glutamina (Q) o glutamato (E) en la posición 32 de SEC ID NO: 1.

50 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona variantes de SAP que son más resistentes a la escisión por proteasas que una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. En algunas realizaciones, las variantes de SAP de la divulgación son más resistentes a la escisión por proteasas por una serina proteasa, treonina proteasas, una cisteína proteasa, una ácido aspártico proteasa, una metaloproteasa, una ácido glutámico proteasa, o combinaciones de las mismas. En ciertas realizaciones, la divulgación proporciona variantes de SAP que son más resistentes a la escisión por

proteasas por quimotripsina, tripsina, Pronasa, o combinaciones de las mismas. En algunas realizaciones, una variante de SAP resistente a proteasas comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 144 de SEC ID NO: 1 que no es fenilalanina (F). En realizaciones preferidas, una variante de SAP resistente a proteasas comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 145 de SEC ID NO: 1 que no es aspartato (D). En algunas realizaciones, una variante de SAP resistente a proteasas comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 144 de SEC ID NO: 1 que no es fenilalanina (F) y un aminoácido en la posición 145 de SEC ID NO: 1 que no es aspartato (D). En realizaciones preferidas, una variante de SAP resistente a proteasas comprende al menos un protómero de SAP que comprende una leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o alanina (A) en la posición 144 de SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, una variante de SAP resistente a proteasas comprende al menos un protómero de SAP que comprende un glutamato (E) en la posición 145 de SEC ID NO: 1.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona variantes de SAP que son más resistentes a la auto-agregación dependiente del calcio que una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. En algunas realizaciones, una variante de SAP que es resistente a auto-agregación dependiente del calcio comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 167 de SEC ID NO: 1 que no es glutamato (E). En realizaciones preferidas, una variante de SAP que es resistente a auto-agregación dependiente del calcio comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aspartato (D), asparagina (N), glutamina (Q), alanina (A) o histidina (H) en la posición 167 de SEC ID NO: 1.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona variantes de SAP que comprenden al menos un protómero de SAP que comprende uno o más aminoácidos que están covalentemente unidos a uno o más polímeros inertes. En algunas realizaciones, al menos uno de los polímeros inertes es un resto de polietilenglicol (PEG). En ciertas realizaciones, uno o más de los protómeros de SAP comprende al menos una cisteína (C) nativa o de variante (por ejemplo, por sustitución, adición o deleción de aminoácidos) con respecto a SEC ID NO: 1, que tiene un resto de PEG unido. En una realización preferida, uno o más de los protómeros de SAP comprende una cisteína (C) de variante, localizada en el extremo N de SEC ID NO: 1, que tiene un resto de PEG unido. En otras realizaciones, uno o más de los protómeros de SAP comprende al menos una (Q) nativa o de variante, con respecto a SEC ID NO: 1, que tiene un resto de PEG unido. En una realización preferida, uno o más de los protómeros de SAP comprende una glutamina (Q) en la posición 32 de SEC ID NO: 1 que tiene un resto de PEG unido. En algunas realizaciones, la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende uno o más residuos de cisteína (C) y uno o más residuos de glutamina (Q) que están unidos a un resto de PEG. En algunas realizaciones, al menos uno de los polímeros inertes es un resto de dextrano. En ciertas realizaciones, uno o más de los protómeros de SAP comprende un residuo de glutamina (Q) nativa o de variante, con respecto a SEC ID NO: 1, que tiene un resto de dextrano unido. En una realización preferida, uno o más de los protómeros de SAP comprende un residuo de glutamina nativa en la posición 32 de SEC ID NO: 1 que tiene un resto de dextrano unido. En ciertas realizaciones, la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende uno o más aminoácidos unidos a un resto de PEG y uno o más aminoácidos unidos a un resto de dextrano.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona una variante de SAP que comprende al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco protómeros de SAP variantes diferentes como se describe en el presente documento.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un oligómero de SAP covalentemente reticulado que comprende al menos dos pentámeros de SAP, en el que cada uno de los pentámeros de SAP comprende cinco protómeros de SAP. Los oligómeros de SAP de la invención pueden comprender protómeros de SAP al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 % o al menos el 100 % idénticos a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1. Por consiguiente, los oligómeros de SAP pueden comprender al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más de los protómeros de variante de SAP como se describen en el presente documento. En algunas realizaciones, los oligómeros de SAP pueden comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más protómeros de SAP variantes diferentes como se describe en el presente documento. En realizaciones preferidas, los oligómeros de SAP reticulados se caracterizan por uno o más de elevada semivida en plasma, elevada estabilidad *in vitro* y elevada estabilidad *in vivo* en comparación con una muestra correspondiente de SAP aislado de suero humano.

En ciertos aspectos, los oligómeros de SAP comprenden pentámeros de SAP covalentemente unidos mediante uno o más reticulantes químicos. En ciertas realizaciones, al menos uno del reticulante químico es un agente heterobifuncional seleccionado de 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo, éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida, (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo, 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo, clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida, 4-succinimidiloxicarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)-tolueno, 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo o 6-((3-(2-piridilditio)propionato)hexanoato de succinimidilo. En ciertas realizaciones, al menos uno de los reticulantes químicos es un agente homobifuncional seleccionado de suberato de disuccinimidilo, bismaleimidohexano o dimetilpimelidato-2HCl. En ciertas realizaciones, al menos uno de los reticulantes químicos es un agente fotorreactivo seleccionado de bis-(β -(4-azidosalicilamido)etil)disulfuro o N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenil-amino)hexanoato.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona una preparación farmacéutica adecuada para su uso en un mamífero que comprende una o más de las variantes de SAP y/u oligómeros de SAP covalentemente reticulados. Preparaciones farmacéuticas de la invención incluyen al menos una de las variantes de SAP y/u oligómeros de SAP desvelados en el presente documento y un vehículo farmacéuticamente aceptable. En algunas realizaciones, la preparación farmacéutica comprende además un agente activo adicional. En algunas realizaciones, la preparación farmacéutica se prepara como una formulación de liberación sostenida. En algunas realizaciones, preparaciones farmacéuticas de la divulgación son adecuadas para administración a un paciente tópicamente, mediante inyección, mediante inyección intravenosa, por inhalación, por depósito continuo, o por bomba.

La divulgación proporciona además procedimientos para tratar o prevenir trastornos o afecciones sensibles a SAP administrando a un paciente en necesidad de los mismos una cantidad terapéuticamente eficaz de una o más de las variantes de SAP y/u oligómeros de SAP. Trastornos o afecciones sensibles a SAP incluyen, pero no se limitan a, trastornos o afecciones fibróticas o fibroproliferativas, trastornos o afecciones de hipersensibilidad, trastornos o afecciones autoinmunitarios y mucositis. La variante de SAP y/u oligómero de la invención puede administrarse a un paciente tópicamente, mediante inyección, mediante inyección intravenosa, por inhalación, por depósito continuo o bomba, o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, la variante de SAP y/u oligómero de la invención se administra conjuntamente con uno o más agentes activos adicionales. En ciertas realizaciones, las variantes de SAP y/u oligómeros se formulan para administrarse conjuntamente. Las variantes de SAP y/u oligómeros pueden administrarse conjuntamente como formulaciones separadas o en formulaciones combinadas. Las variantes de SAP y/u oligómeros pueden administrarse simultáneamente o en programas de dosificación diferentes.

20 Breve descripción de los dibujos

Figura 1: una variante de SAP que comprende una sustitución de aminoácidos E167Q, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1, es más resistente a la agregación mediada por calcio que una muestra correspondiente de SAP humano recombinante sin modificar (rhSAP). Se añadieron cantidades graduales de calcio a una disolución que comprendía SAP y se observó la cantidad de agregación de SAP midiendo la absorbancia de la disolución a 600 nm en un espectrofotómetro.

Figura 2: una variante de SAP que comprende una sustitución de aminoácidos E167Q, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1, tiene una semivida en plasma similar en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano recombinante sin modificar (rhSAP). Se administraron ratas con SAP (dosis de 1 mg/kg i.v. por rata, n=3). Durante veinticuatro horas, las ratas se evaluaron para concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de proteína SAP.

Figura 3: variantes de SAP E167Q y N32D, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1, son al menos tan activas como una muestra correspondiente de SAP humano recombinante sin modificar (rhSAP). Se incubaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) enriquecidas en monocitos con concentraciones variables de SAP. Tras la incubación, los sobrenadantes de cultivo resultantes se extrajeron y se ensayaron por ELISA para cuantificar la cantidad de quimiocina derivada de macrófago (MDC) que se produjo.

Figura 4: la variante de SAP N32D tuvo una semivida en plasma similar a la de rhSAP silvestre. Mientras que una forma asialo de hSAP tiene una semivida en plasma significativamente reducida en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano recombinante sin modificar (rhSAP). Se administraron ratas con SAP (dosis de 1 mg/kg i.v. por rata, n=3). Durante veinticuatro horas, las ratas se evaluaron para concentraciones plasmáticas ($\mu\text{g/ml}$) de proteína SAP.

Figura 5: representa una reacción química que une covalentemente PEG a rhSAP.

Figura 6: se purificó rhSAP PEGilado de componentes de reacción por cromatografía de intercambio aniónico. Se reunieron fracciones de la columna de cromatografía y se concentraron antes del análisis por SDS-PAGE.

Descripción detallada de la invención

Visión general

El amiloide P del suero ("SAP") es una proteína del suero que existe de forma natural en mamíferos y es un miembro de la familia de las pentraxinas de proteínas estructuralmente relacionadas. Se produce en el hígado como una glicoproteína de 125.000 Dalton y tiene una semivida fisiológica de 24 horas en suero. El SAP está compuesto por cinco subunidades idénticas o "protómeros" que están asociados no covalentemente en una molécula tipo disco. Los protómeros de SAP se asocian no covalentemente entre sí mediante dos "interfases de protómero". La interfase de protómero 1 de la subunidad 1 se asocia con la interfase de protómero 2 de la subunidad 2. La interfase de protómero 1 de la subunidad 2 se asocia con la interfase de protómero 2 de la subunidad 3, etc. Cada protómero expone una "cara A" que puede unirse a $\text{Fc}\gamma\text{R}$ y una "cara B" opuesta que media en la unión al calcio y unión a ligando mediada por el calcio. En altas concentraciones de calcio iónico, SAP se agrega y puede precipitar como el componente de amiloide P, que es un constituyente normal de la

membrana basal glomerular, además de tejidos humanos de dermis, cuello uterino, testículo y placenta. Veáanse Baltz, M. L., et al., Clin. Exp. Immunol., 66:691-700 (1986); Dyck, R. F., et al., J. Exp. Med., 152:1162-1174 (1980); Melvin, T., Am. J. Pathol., 125:460-464 (1986); Breathnach, S. M., J. Invest. Derm., 92:53-58 (1989); Clayton, J., Cell. Pathol., 43:63-66 (1983); Herriot, R., et al., J. Pathol., 157:11-14 (1989); Khan, A. M., et al., Placenta, 6:551-554 (1985). La secuencia madura del protómero de SAP humano se representa a continuación (aminoácidos 20-223 de N.º de acceso de GenBank: NP_001630; secuencia señal no representada).

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLCFRAYS DLSRAYS L F
 SYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAPVHICVSWE
 SSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQE QDSYGGKFD RSQ
 SFVGEIGDLYMWDSVLPENILSAYQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVII
 KPLVWV (SEQ ID NO: 1)

Los procesos de cicatrización normal, además de los acontecimientos desregulados que producen fibrosis, implican la proliferación y diferenciación de fibroblastos y la deposición de matriz extracelular. Si estos fibroblastos se derivan localmente o de una población precursora circulante no está claro. Los fibrocitos, precursores de fibrocitos, precursores de miofibroblastos y precursores de monocitos hematopoyéticos pertenecen a una población distinta de células tipo fibroblasto derivadas de monocitos de sangre periférica. Estas células pueden migrar a sitios de lesión de tejido para promover la angiogénesis y cicatrización. Los monocitos de sangre periférica CD14⁺ cultivados en ausencia de suero o plasma se diferencian en fibrocitos en el plazo de 72 horas. Recientemente, se mostró que SAP inhibía la diferenciación de fibrocitos, precursores de fibrocitos, precursores de miofibroblastos y/o precursores de monocitos hematopoyéticos a niveles similares a los del suero. A diferencia, el plasma agotado en SAP tiene una reducida capacidad para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos, precursores de fibrocitos, precursores de miofibroblastos y/o precursores de monocitos hematopoyéticos. En comparación con sueros de individuos sanos, el suero de sujetos con artritis reumatoide, esclerodermia, enfermedades de tejido conjuntivo mixto y ciertas enfermedades fibróticas sistémicas, han reducido la potencia para inhibir la diferenciación de fibrocitos, precursores de fibrocitos, precursores de miofibroblastos y/o precursores de monocitos hematopoyéticos *in vitro*. Por consiguiente, los niveles en suero de SAP son significativamente menores en algunos sujetos con estos trastornos que se observan para sujetos sanos. Estos resultados indican que niveles anormalmente bajos de SAP pueden aumentar los procesos patológicos que conducen a fibrosis y sugiere que SAP puede ser útil como agente terapéutico para inhibir la fibrosis en afecciones inflamatorias crónicas. Recientemente, se ha sugerido que SAP puede usarse como agente terapéutico para tratar diversos otros trastornos, que incluyen trastornos relacionados con la fibrosis, trastornos de hipersensibilidad, trastornos autoinmunitarios, mucositis y trastornos inflamatorios, tales como aquellos producidos por infección microbiana. Véanse, por ejemplo, las solicitudes de patente N.ºs: 11/707.333, 12/217.617 12/720.845 y 12/720.847.

Los polipéptidos son susceptibles a desnaturalización o degradación enzimática en la sangre, hígado o riñón. Debido a la baja estabilidad de algunos polipéptidos, se ha requerido administrar fármacos de polipéptido en una frecuencia sostenida a un sujeto con el fin de mantener una concentración plasmática eficaz de la sustancia activa. Además, como los fármacos de polipéptido se administran normalmente por infusión, la frecuente inyección de fármacos de polipéptido puede producir una molestia considerable a un sujeto. Así, ha habido muchos estudios para desarrollar fármacos de polipéptido que tienen una elevada semivida circulante en la sangre, mientras que se mantiene una alta eficacia farmacológica. Por consiguiente, un objetivo primario de la presente divulgación es proporcionar variantes de SAP, composiciones, preparaciones farmacéuticas y formulaciones que tienen una prolongada semivida *in vivo* en comparación con SAP humano. Ventajas de elevada semivida en plasma incluyen, pero no se limitan a, reducir la cantidad y/o frecuencia de dosificación.

Además, las composiciones farmacéuticas de péptidos terapéuticos tienen preferentemente una estabilidad en almacén de varios años con el fin de ser adecuadas para uso común. Sin embargo, las composiciones de péptido son inherentemente inestables debido a la sensibilidad hacia degradación química y física. Ejemplos de degradación química incluyen cambio de enlaces covalentes, que incluyen, pero no se limitan a, oxidación, hidrólisis, racemización o reticulación. Ejemplos de degradación física incluyen cambios conformacionales con respecto a la estructura nativa del péptido, que pueden conducir a agregación, precipitación o adsorción del polipéptido a superficies. Por consiguiente, otro objetivo de la presente divulgación es proporcionar variantes de SAP, composiciones, preparaciones farmacéuticas y formulaciones que tienen una estabilidad en almacén prolongada, o estabilidad *in vitro* bastante elevada, en comparación con SAP humano. Durante el proceso de fabricación, es frecuentemente difícil producir grandes cantidades de una proteína con consistencia reproducible en las características del producto, tales como modificación post-traducciona l y/o plegamiento. En algunas realizaciones, las variantes de SAP de la divulgación se caracterizan por elevada eficiencia de

fabricación de la proteína SAP (por ejemplo, mayor rendimiento del producto de proteína, elevada homogeneidad del producto de proteína, elevada estabilidad del producto de proteína), particularmente para uso *in vivo* (por ejemplo, como agente terapéutico).

Definiciones

5 A menos que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento generalmente tienen el mismo significado que comúnmente es entendido por un experto habitual en la materia. Generalmente, la nomenclatura usada en el presente documento y los procedimientos de laboratorio en cultivo celular, genética molecular, química orgánica y química e hibridación de ácidos nucleicos son aquellos muy conocidos y comúnmente empleados en la materia. Técnicas convencionales se usan para la síntesis de ácidos nucleicos y de péptidos. Las técnicas y procedimientos se realizan generalmente según procedimientos convencionales en la materia y diversas referencias generales (por ejemplo, Sambrook et al., 1989, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2ª ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.), que se proporcionan en todo este documento.

Los artículos “un” y “una” se usan en el presente documento para referirse a uno o a más de uno (es decir, a al menos un) del sujeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, “un elemento” significa un elemento o más de un elemento.

15 Como se usa en el presente documento, los términos “tratamiento”, “tratar” y similares se refieren a obtener un efecto farmacológico y/o fisiológico deseado. El efecto puede ser profiláctico en términos de prevenir completamente o parcialmente un trastorno o síntoma del mismo y/o puede ser terapéutico en términos de una cura parcial o completa de un trastorno y/o efecto adverso atribuible al trastorno. “Tratamiento”, como se usa en el presente documento, cubre cualquier tratamiento de una enfermedad en un mamífero, particularmente en un ser humano e incluye: (a) aumentar el tiempo de supervivencia; (b) disminuir el riesgo de muerte debido a la enfermedad; (c) disminuir el riesgo de que una enfermedad se produzca en un sujeto que puede tener predisposición a la enfermedad, pero todavía no ha sido diagnosticado con que la tiene; (d) inhibir la enfermedad, es decir, detener su desarrollo (por ejemplo, reducir la tasa de progresión de la enfermedad); y (e) aliviar la enfermedad, es decir, causar la regresión de la enfermedad.

20 Como se usa en el presente documento, un agente terapéutico que “inhibe” o “previene” un trastorno o afección es un compuesto que, en una muestra estadística, reduce la aparición del trastorno o afección en la muestra tratada con respecto a una muestra de control no tratada, o retrasa la aparición o reduce la gravedad de uno o más síntomas del trastorno o afección con respecto a la muestra de control no tratada.

25 Como se usa en el presente documento, los términos “sujeto” y “paciente” se refieren a animales que incluyen mamíferos, tales como seres humanos. El término “mamífero” incluye primates, animales domesticados que incluyen perros, gatos, ovejitas, ganado vacuno, caballos, cabras, cerdos, ratones, ratas, conejos, cobayas, animales cautivos tales como animales de zoológico y animales salvajes.

Como se usa en el presente documento, el término “tejido” se refiere a un órgano o conjunto de células especializadas tales como tejido de piel, tejido de pulmón, tejido de riñón y otros tipos de células.

30 El término “efecto terapéutico” es reconocido en la técnica y se refiere a un efecto local o sistémico en animales, particularmente mamíferos y más particularmente seres humanos, producido por una sustancia farmacológicamente activa. La expresión “cantidad terapéuticamente eficaz” significa aquella cantidad de una sustancia tal que produce algún efecto local o sistémico deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a cualquier tratamiento. La cantidad terapéuticamente eficaz de tal sustancia variará dependiendo del sujeto y condición de enfermedad que está tratándose, el peso y edad del sujeto, la gravedad de la condición de enfermedad, el modo de administración y similares, que pueden determinarse fácilmente por un experto habitual en la materia. Por ejemplo, ciertas composiciones descritas en el presente documento pueden administrarse en una cantidad suficiente para producir un efecto deseado a una relación beneficio/riesgo razonable aplicable a tal tratamiento.

35 Como se usa en el presente documento, el término “ácido nucleico” se refiere a un polinucleótido tal como ácido desoxirribonucleico (ADN) y cuando corresponda, ácido ribonucleico (ARN). También debe entenderse que el término incluye, como equivalentes, análogos de cualquier ARN o ADN preparado a partir de análogos de nucleótidos y como es aplicable a la realización que se describe, polinucleótido monocatenario (tal como sentido o antisentido) y bicatenario.

40 Los términos “péptidos”, “proteínas” y “polipéptidos” se usan indistintamente en el presente documento. El término “proteína purificada” se refiere a una preparación de una proteína o proteínas que se aíslan preferentemente de, o de otro modo sustancialmente libres de, otras proteínas normalmente asociadas a la(s) proteína(s) en una célula o lisado celular. El término “sustancialmente libre de otras proteínas celulares” o “sustancialmente libre de otras proteínas contaminantes” se define como que engloba preparaciones individuales de cada una de las proteínas que comprende menos del 20 % (por peso seco) de proteína contaminante y preferentemente comprende menos del 5 % de proteína contaminante. Pueden prepararse formas funcionales de cada una de las proteínas como preparaciones purificadas usando un gen clonado como se conoce bien en la técnica. Por “purificado” se indica que la molécula indicada está presente en ausencia

5 sustancial de otras macromoléculas biológicas, tales como otras proteínas (particularmente otras proteínas que pueden enmascarar, disminuir, confundir o alterar sustancialmente las características de las proteínas componente tanto como preparaciones purificadas como en su función en la mezcla reconstituida objeto). El término "purificado", como se usa en el presente documento, significa preferentemente al menos el 80 % por peso seco, más preferentemente en el intervalo del 85 % en peso, más preferentemente del 95-99 % en peso y lo más preferentemente al menos el 99,8 % en peso, de macromoléculas biológicas del mismo tipo presentes (pero pueden estar presentes agua, tampones y otras moléculas pequeñas, especialmente moléculas que tienen un peso molecular inferior a 5000). El término "puro", como se usa en el presente documento, tiene preferentemente los mismos límites numéricos que "purificado" inmediatamente anterior.

10 El término "semivida" o "semivida en plasma", como se usa en el presente documento en el contexto de administrar un fármaco de péptido a un sujeto, se define como el tiempo requerido para que la concentración plasmática de un fármaco en un sujeto se reduzca a la mitad. Explicación adicional de "semivida" se encuentra en Pharmaceutical Biotechnology (1997, DFA Crommelin y RD Sindelar, eds., Harwood Publishers, Ámsterdam, pp 101 120).

Variantes de SAP y oligómeros de SAP

(ii) Proteínas de variante de SAP

15 En parte, la divulgación proporciona proteínas de variante de amiloide P del suero (SAP). El término "variante de SAP" pretende referirse a una proteína SAP que comprende cinco subunidades o "protómeros" de SAP. En aspectos preferidos, una variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que tiene una o más modificaciones de aminoácidos (es decir, un protómero de SAP variante) que modifican al menos una actividad biológica de la proteína SAP. En algunas realizaciones, las modificaciones de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, la presencia de uno o más aminoácidos
20 variantes con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1 (por ejemplo, sustitución o adición de aminoácidos), la ausencia de uno o más aminoácidos nativos con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1 (por ejemplo, delección de aminoácidos), el acoplamiento de uno o más aminoácidos a un resto de modificación (por ejemplo, un resto de PEG, un resto de dextrano, etc.), o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, un protómero de SAP comprende al menos un aminoácido variante, con respecto a SEC ID NO: 1 y al menos un aminoácido acoplado a un resto de modificación. En particular, las variantes de SAP se caracterizan por una actividad biológica alterada en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. En algunos aspectos, una variante de SAP de la divulgación se caracteriza por una actividad biológica alterada seleccionada de una o más de elevada semivida en plasma, elevada estabilidad *in vivo*, elevada estabilidad *in vitro*, o elevada eficiencia de fabricación.

30 El término "protómero de SAP" pretende referirse a un polipéptido que es al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos el 99 %, o el 100 % idéntico al protómero de SAP ejemplificado por SEC ID NO: 1. Por consiguiente, el término "protómero de SAP" engloba fragmentos y proteínas de fusión que comprenden cualquiera de los precedentes. En aspectos preferidos, las variantes de SAP de la divulgación son proteínas SAP humanas. Generalmente, un protómero de SAP se diseñará para ser soluble en disoluciones acuosas a temperaturas, niveles de pH y osmolaridad biológicamente
35 relevantes. Los protómeros que se asocian no covalentemente juntos para formar una variante de SAP de la divulgación pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas y/o modificaciones post-traduccionales o, alternativamente, protómeros individuales pueden tener diferentes secuencias y/o modificaciones. Por consiguiente, una variante de SAP puede comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o cinco protómeros de SAP idénticos o, alternativamente, comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o al menos cinco protómeros de SAP
40 variantes idénticos o diferentes. En algunas realizaciones, al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro de los protómeros de SAP tienen el 100 % de identidad de secuencias con SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, una variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP variante que confiere uno o más de actividad biológica alterada como se describe en el presente documento. Las modificaciones post-traduccionales pueden efectuarse *in vivo* y/o *in vitro* e incluyen, pero no se limitan a, procesamiento (por ejemplo, eliminación de secuencias señal, maduración de pro-péptidos, etc.) y modificación química (por ejemplo, glucosilación, pegilación, etc.) de los polipéptidos SAP traducidos.

La invención también proporciona protómeros de SAP que comparten un grado especificado de identidad de secuencias o similitud con un polipéptido SAP. Para determinar la identidad en porcentaje de dos secuencias de aminoácidos, las secuencias se alinean para fines de comparación óptima (por ejemplo, pueden introducirse huecos en una o ambas de una primera y una segunda secuencia de aminoácidos o de ácidos nucleicos para el alineamiento óptimo y secuencias no homólogas pueden ignorarse para fines de comparación). En una realización preferida, al menos el 30 %, al menos el 40 %, al menos el 50 %, al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 90 %, al menos el 95 % o más de la longitud de una secuencia de referencia (por ejemplo, SAP humano) se alinea para fines de comparación. Entonces se comparan los residuos de aminoácidos en posiciones de aminoácidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo residuo de aminoácido que la posición correspondiente en la segunda
55 secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se usa en el presente documento, "identidad" de aminoácidos es equivalente a "homología" de aminoácidos). La identidad en porcentaje entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos y la

longitud de cada hueco, que necesita introducirse para el alineamiento óptimo de las dos secuencias.

La comparación de secuencias y la determinación de la identidad en porcentaje y similitud entre dos secuencias pueden llevarse a cabo usando un algoritmo matemático (Computational Molecular Biology, Lesk, A. M., ed., Oxford University Press, Nueva York, 1988; Biocomputing: Informatics and Genome Projects, Smith, D. W., ed., Academic Press, Nueva York, 1993; Computer Analysis of Sequence Data, Part 1, Griffin, A. M., and Griffin, H. G., eds., Humana Press, Nueva Jersey, 1994; Sequence Analysis in Molecular Biology, von Heinje, G., Academic Press, 1987; y Sequence Analysis Primer, Gribskov, M. y Devereux, J., eds., M Stockton Press, Nueva York, 1991).

En ciertas realizaciones, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch (J Mol. Biol. (48):444-453 (1970)) que se ha incorporado en el programa GAP en el paquete de software GCG (disponible en <http://www.gcg.com>). En una realización específica, los siguientes parámetros se usan en el programa GAP: tanto una matriz Blossom 62 como una matriz PAM250 y un peso por hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización más, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG (Devereux, J., et al., Nucleic Acids Res. 12(1):387 (1984)) (disponible en <http://www.gcg.com>). Parámetros a modo de ejemplo incluyen usar una matriz NWSgapdna.CMP y un peso por hueco de 40, 50, 60, 70 o 80 y un peso por longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6.

En otra realización, la identidad en porcentaje entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de E. Myers y W. Miller (CABIOS, 4:11-17 (1989)), que se ha incorporado en el programa ALIGN (versión 2.0), usando una tabla de residuos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

Otra realización para determinar el mejor alineamiento global entre dos secuencias de aminoácidos puede determinarse usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). En un alineamiento de secuencias, las secuencias de consulta y objeto son ambas secuencias de aminoácidos. El resultado de dicho alineamiento global de secuencias se presenta en términos de identidad en porcentaje. En ciertas realizaciones, la identidad de secuencias de aminoácidos se realiza usando el programa informático FASTDB basado en el algoritmo de Brutlag et al. (Comp. App. Biosci., 6:237-245 (1990)). En una realización específica, los parámetros empleados para calcular la identidad en porcentaje y la similitud de un alineamiento de aminoácidos comprenden: Matriz=PAM 150, k-tuple=2, Penalización por desapareamientos=1, Penalización por unión =20, Longitud del grupo de aleatorización=0, Puntuación de corte=1, Penalización por hueco=5 y Penalización por tamaño del hueco =0,05.

Algunos aspectos de la invención proporcionan polipéptidos SAP (es decir, protómeros), o proporcionan procedimientos terapéuticos para emplear aquellos polipéptidos, en los que dichos polipéptidos se definen, al menos en parte, por una secuencia de referencia. En realizaciones preferidas, la secuencia de referencia se corresponde con la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1. Por consiguiente, tales polipéptidos pueden tener un cierto porcentaje de residuos de aminoácidos que no son idénticos a una secuencia de referencia. En una realización preferida, los residuos no idénticos tienen propiedades químicas similares a los residuos a los que no son idénticos. Grupos que tienen propiedades similares incluyen los siguientes aminoácidos: E, D, N y Q; H, K y R; Y, F y W; I, L, V, M, C y A; y S, T, C, P y A.

En otra realización, los residuos que no son idénticos son aquellos que no están evolutivamente conservados entre la secuencia de referencia y una secuencia ortóloga en al menos una especie evolutivamente relacionada, tal como en especies dentro del mismo orden. En el caso de una secuencia de referencia de mamífero, los aminoácidos que pueden mutarse en una realización preferida son aquellos que no están conservados entre la secuencia de referencia y la secuencia ortóloga en otra especie de mamífero. Por ejemplo, si se dice que un polipéptido usado en un procedimiento de la presente invención comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SAP humano (SEC ID NO:1), entonces dicho polipéptido puede tener residuos no idénticos a aquellas posiciones en las que se diferencian el SAP humano y el de otro mamífero.

Polipéptidos SAP (es decir, protómeros) que comparten al menos el 90 % de identidad con SEC ID NO: 1 incluyen polipéptidos que tienen sustituciones conservativas en estas áreas de divergencia. Normalmente consideradas como sustituciones conservativas son las sustituciones, uno por el otro, entre los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu y Ile, intercambio de los residuos de hidroxilo Ser y Thr, intercambio de los residuos ácidos Asp y Glu, sustitución entre los residuos de amida Asn y Gln, intercambio de los residuos básicos Lys y Arg y sustituciones entre los residuos aromáticos Phe, Tyr. Orientación adicional referente a qué cambios de aminoácidos es probable que sean fenotípicamente silenciosos puede encontrarse en Bowie et al., Science 247:1306-1310 (1990).

La divulgación también proporciona protómeros de SAP con mutaciones en residuos de aminoácidos específicos. Mutaciones a modo de ejemplo se desvelan en el presente documento y se numeran según la posición de aminoácido de SAP humano, por ejemplo, como se ejemplifica en SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, una variante de SAP i) comprende uno o más protómeros que son al menos el 60 %, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 % o al menos el 99 % idénticos a SEC ID NO: 1, ii) tiene una o más de las siguientes características en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero: elevada semivida en plasma, elevada estabilidad *in vitro*, elevada estabilidad *in vivo* o elevada eficiencia de fabricación.

Como se describe en el presente documento, los aminoácidos de un protómero de SAP pueden mutarse añadiendo uno o más residuos de aminoácidos especificados, delecionando uno o más residuos de aminoácidos especificados, o sustituyendo uno o más residuos de aminoácidos especificados. Procedimientos para mutar o modificar químicamente polipéptidos SAP se describen en las siguientes secciones.

- 5 Puede ser deseable potenciada semivida en suero y estabilidad *in vivo* para reducir la frecuencia de dosificación que se requiere para lograr la eficacia terapéutica. Por consiguiente, en ciertos aspectos, la semivida en suero de una variante de SAP es al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos diez, o al menos veinte días o más. Procedimientos para el análisis farmacocinético y determinación de la semivida y estabilidad *in vivo* serán conocidos para aquellos expertos en la materia. Pueden encontrarse detalles en Kenneth, A et al: Chemical Stability of
 10 Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists y en Peters et al, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª Rev. Ex edición (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como semividas t_{α} y t_{β} y área bajo la curva (ABC). Como se describe en los ejemplos de la divulgación, un procedimiento para determinar la estabilidad *in vivo* implica administrar una variante de SAP a un animal y medir la concentración de la variante de SAP dentro del plasma del animal a intervalos
 15 regulares después de la administración. El perfil farmacocinético (es decir, la concentración plasmática de SAP con el tiempo) de una variante de SAP puede compararse con el de otra proteína SAP, por ejemplo, una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero.

En ciertos aspectos, variantes de SAP de la divulgación son más estables que una composición por lo demás idéntica de SAP humano en condiciones idénticas. En ciertas realizaciones, las composiciones desveladas tienen una estabilidad en
 20 almacén, o *in vitro*, estabilidad al menos dos veces, al menos tres veces, al menos cuatro veces, o al menos cinco veces o más que un SAP humano de muestra correspondiente. Se conocen muchos procedimientos para medir la estabilidad *in vitro* en la materia, que incluyen, por ejemplo, medir la estabilidad de proteínas por SDS-PAGE, transferencia Western, RP-HPLC, AEX-HPLC, CL-EM, o secuenciación del extremo N.

En algunas realizaciones, las variantes de SAP de la invención tienen una bioactividad alterada o similar en comparación
 25 con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. La bioactividad de una variante de SAP puede determinarse, por ejemplo, determinando la CI_{50} para inhibir la diferenciación de monocitos en fibrocitos *in vitro*. En algunas realizaciones, la CI_{50} de una variante de SAP es inferior a 1/2, inferior a 1/3, inferior a 1/4, inferior a 1/10, o inferior a 1/100 que la de una muestra correspondiente de SAP silvestre aislado de suero humano. Hay muchos procedimientos bien caracterizados para determinar la sensibilidad de células mononucleares de sangre periférica (CMSP) o células de
 30 monocito a SAP para la diferenciación de fibrocitos. Estos procedimientos pueden usarse para determinar la potencia relativa de cualquiera de la variante de SAP de la invención en comparación con una muestra de SAP derivado de suero humano, cualquier otro polipéptido de variante de SAP, u otro supresor de fibrocitos o agente de activación. Las CMSP o monocitos adecuados para su uso en estos procedimientos pueden obtenerse de diversas líneas de cultivo de tejido. Alternativamente, pueden obtenerse células adecuadas para los ensayos de diferenciación de fibrocitos de cualquier
 35 muestra biológica que contenga CMSP o células de monocito. La muestra biológica puede obtenerse de suero, plasma, tejido sano o tejido fibrótico. En general, se realizan ensayos de diferenciación de fibrocitos incubando CMSP o células de monocito en medios con diversas concentraciones de un polipéptido SAP para determinar el grado de diferenciación de fibrocitos. La concentración de SAP puede oscilar de 0,0001 $\mu\text{g/ml}$ a 1 mg/ml y en algunas realizaciones es 0,001 $\mu\text{g/ml}$, 1,0 $\mu\text{g/ml}$, 5 $\mu\text{g/ml}$, 10 $\mu\text{g/ml}$, 15 $\mu\text{g/ml}$, 20 $\mu\text{g/ml}$, 25 $\mu\text{g/ml}$, 30 $\mu\text{g/ml}$, 35 $\mu\text{g/ml}$, 40 $\mu\text{g/ml}$, 45 $\mu\text{g/ml}$, 50 $\mu\text{g/ml}$, 100 $\mu\text{g/ml}$,
 40 200 $\mu\text{g/ml}$, 300 $\mu\text{g/ml}$ o 500 $\mu\text{g/ml}$. En algunos ensayos, los medios pueden complementarse con entre 1-100 ng/ml de hMCSF; siendo la concentración preferida de hMCSF 25 ng/ml . La indicación de que las CMSP y monocitos se han diferenciado en fibrocitos puede determinarse por un experto en la materia. En general, los fibrocitos se definen morfológicamente como células adherentes con una forma de husillo alargada y la presencia de un núcleo ovalado. En algunos ensayos, las células se fijan y se tiñen con Hema 3 antes de enumerar los fibrocitos por recuento directo, por
 45 ejemplo, usando un microscopio invertido. La cantidad de diferenciación de fibrocitos se interpreta por un experto en la materia como una indicación de la sensibilidad de una célula a SAP. Como se indica por los ejemplos de la divulgación, una mayor supresión de la diferenciación de fibrocitos indica un mayor grado de sensibilidad de SAP. Un procedimiento alternativo de medición de la diferenciación de fibrocitos implica determinar la expresión de marcadores de la superficie celular específicos de fibrocitos o factores secretados, por ejemplo, citocinas (tales como IL-1ra, ENA-78/CXCL-5, PAI-1),
 50 fibronectina, colágeno-1, quimiocina derivada de macrófagos). Procedimientos de detección y/o cuantificación de marcadores de la superficie celular o factores secretados son muy conocidos en la técnica, que incluyen, pero no se limitan a, diversas técnicas basadas en ELISA y FACS usando anticuerpos inmunorreactivos contra uno o más marcadores específicos de fibrocitos.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona variantes de SAP que son más resistentes a la escisión por proteasas que
 55 una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. Una variante de SAP de la invención puede ser resistente a la escisión por proteasas de cualquier número de proteasas que incluyen serina proteasas, treonina proteasas, cisteína proteasas, ácido aspártico proteasas, metaloproteasas y ácido glutámico proteasas. En ciertas realizaciones, una variante de SAP es más resistente a la escisión por quimotripsina, tripsina o Pronase. En realizaciones preferidas, la variante de SAP resistente a proteasas tiene una elevada semivida en plasma en comparación con una

muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. Procedimientos para medir la escisión proteolítica incluyen, pero no se limitan a, analizar muestras tratadas con proteasa de una proteína (por ejemplo, una variante de SAP y un patrón de SAP humano derivado del suero) por SDS-PAGE, transferencia Western, RP-HPLC, AEX-HPLC, CL-EM, o secuenciación del extremo N. Otros ejemplos de ensayos de escisión por proteasas están dentro del ámbito de un experto en la materia y se ejemplifican en Kinoshita CM, et al., Protein Science 1:700-709 (1992). Por tanto, variantes de SAP de la invención pueden ensayarse fácilmente para resistencia relativa a la escisión por proteasas en comparación con una muestra correspondiente de otra proteína SAP, por ejemplo, una muestra de SAP humano derivado del suero.

En ausencia de calcio, SAP humano se susceptible a escisión por α -quimotripsina entre los residuos Phe₁₄₄ y Asp₁₄₅ (Kinoshita CM, et al., Protein Science 1:700-709 (1992)). En ciertas realizaciones, un protómero de SAP comprende una modificación de aminoácidos en la posición 144 y/o posición 145 de SEC ID NO: 1, produciendo una variante de SAP que es más resistente a la escisión por proteasas. En algunas realizaciones, un protómero de SAP comprende un aminoácido variante en la posición 144 de SEC ID NO: 1. En particular, variantes de SAP más resistentes a la escisión por proteasas pueden tener un residuo de leucina (L), isoleucina (I), valina (V), alanina (A) o glutamina (Q) en la posición de aminoácido 144 de SEC ID NO: 1. Un protómero de SAP también puede comprender, independientemente o en combinación con, un aminoácido variante en la posición 145 de SEC ID NO: 1. Protómeros de SAP variantes de la divulgación pueden comprender un glutamato (E) en la posición 145 en SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, una variante de SAP comprende uno o más promotores que son i) al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 % al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticos a SEC ID NO: 1 y ii) comprenden una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos F144L, F144I, F144V, F144A, F144G, D145E con respecto a SEC ID NO: 1. Cualquiera de los protómeros de SAP anteriormente mencionados que son resistentes a la escisión por proteasas pueden comprender además cualquiera de las otras modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

La divulgación proporciona además variantes de SAP con elevada unión a metales en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. La elevada unión a metales en el sitio de unión al calcio de un protómero de SAP disminuye la susceptibilidad del protómero a la proteólisis estabilizando la estructura de bucle que contiene el residuo de aminoácido en la posición 145 de SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, una variante de SAP que tiene elevada unión a metales comprende uno o más protómeros de SAP con un aminoácido variante en la posición 145 de SEC ID NO: 1. En particular, las variantes de SAP caracterizadas por elevada unión a metales pueden tener un aminoácido glutamato (E), glutamina (Q), histidina (H), alanina (A), glicina (G) en la posición 145 de SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, una variante de SAP demuestra elevada unión al metal calcio en comparación con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. Las constantes de unión al calcio para una proteína SAP pueden medirse mediante una variedad de procedimientos, que incluyen aquellos ejemplificados en Calcium-binding Protein Protocols: methods and techniques por Hans J. Vogel, Contributor Hans J. Vogel, publicado por Humana Press, 2002. En algunas realizaciones, las constantes de unión al calcio para una proteína SAP pueden medirse por diálisis en equilibrio usando un intervalo de concentraciones de calcio, seguido de análisis de la representación de Scatchard (véase, por ejemplo Segel, I.H., Enzyme Kinetics 1975, Wiley-Interscience Publisher, p218-19). La diálisis en equilibrio puede realizarse usando tanto isótopos radiactivos del calcio como electrodos sensibles al calcio para cuantificar niveles de calcio libre. Las constantes de unión al calcio también pueden determinarse valorando el calcio en una disolución de SAP en presencia de un quelante cromóforo (ácido 5,5'-dibromo-1,2-bis(2aminofenoxi)etano-N,N,N',N'-tetraacético (Linse, S, Helmersson, A. Forsen, S, 1991 JBC 266:13 pp. 8050-8054). También puede usarse calorimetría de valoración isoterma para medir afinidades de unión al calcio (Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J.F. y Lin, L.N., (1989) Anal Biochem 179, 131-7). Las variantes de SAP caracterizadas por elevada unión a metales pueden compararse con una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero para cambios en la estabilidad proteolítica (por ejemplo, digestión con quimotripsina en presencia y ausencia de calcio), bioactividad *in vitro* y o farmacocinética, además de procedimientos de caracterización biofísica (por ejemplo, RP-HPLC, SE-HPLC, SDS-PAGE, CL-EM). En ciertas realizaciones, una variante de SAP comprende uno o más protómeros de SAP que son i) al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 % al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticos a SEC ID NO: 1 y ii) que comprenden una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: D145E, D145Q, D145H, D145A o D145G. Cualquiera de los protómeros de SAP anteriormente mencionados que demuestra elevada unión a metales puede comprender además cualquiera de las otras modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

En ausencia de ligando, la unión al calcio produce la auto-agregación de SAP (Emsley, et. al. Nature 367:338-345 (1994)) y una vez agregado, SAP se elimina rápidamente de la corriente sanguínea (Pepys, et. al., Nature 417:254-259 (2002)). En ciertas realizaciones, una variante de SAP de la divulgación es más resistente a la auto-agregación dependiente del calcio que una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero. En algunas realizaciones, una variante de SAP resistente a la auto-agregación dependiente del calcio comprende uno o más protómeros de SAP que comprenden un aminoácido variante en la posición 167 de SEC ID NO: 1. En algunas realizaciones, una variante de SAP resistente a la auto-agregación dependiente del calcio comprende un aspartato (D), asparaginas (N), glutamina (Q), alanina (A) o histidina (H) en la posición 167 de SEC ID NO: 1. La agregación de SAP puede determinarse por cualquier número de procedimientos conocidos que incluyen filtración en gel cromatografía y dispersión de la luz dinámica (véase Ho, et. al., J Biol Chem 280:31999-32008 (2005)). Por tanto, variantes de SAP de la invención pueden ensayarse fácilmente para

resistencia relativa a la agregación en comparación con una muestra correspondiente de otra proteína SAP, por ejemplo, una muestra de SAP humano derivado del suero. En ciertas realizaciones, una variante de SAP comprende uno o más protómeros de SAP que son al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 % al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticos a SEC ID NO: 1 y ii) comprende una o más de una de las siguiente sustituciones de aminoácidos: E167D, E167N, E167Q E167A, E167H. Cualquiera de los protómeros de SAP anteriormente mencionados que son resistentes a la auto-agregación puede comprender además cualquiera de las otras modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

La glucosilación de polipéptidos normalmente está tanto enlazada en N como enlazada en O. Enlazada en N se refiere a la unión del resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de un residuo de asparagina. Las secuencias de tripéptidos asparagina-X-serina y asparagina-X-treonina, en las que X es cualquier aminoácido, salvo prolina, son las secuencias de reconocimiento para la unión enzimática de un resto de hidrato de carbono a la cadena lateral de asparagina. Así, la presencia de cualquiera de estas secuencias de tripéptidos en un polipéptido crea un posible sitio de glucosilación enlazado en N. La glucosilación enlazada en O se refiere a la unión de restos de azúcar (por ejemplo, N-acetilgalactosamina, galactosa o xilosa) a un hidroxiaminoácido, lo más comúnmente sobre un residuo de serina o treonina.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona una variante de SAP que comprende al menos un protómero de SAP que está sustancialmente libre de glucanos. Por "sustancialmente libre" se indica que al menos aproximadamente el 25 % (por ejemplo, al menos aproximadamente el 27 %, al menos el aproximadamente el 30 %, al menos el aproximadamente el 35 %, al menos el aproximadamente el 40 %, al menos el aproximadamente el 45 %, al menos el aproximadamente el 50 %, al menos el aproximadamente el 55 %, al menos el aproximadamente el 60 %, al menos el aproximadamente el 65 %, al menos el aproximadamente el 70 %, al menos el aproximadamente el 75 %, al menos el aproximadamente el 80 %, al menos el aproximadamente el 85 %, al menos el aproximadamente el 90 %, o al menos aproximadamente el 95 %, o al menos aproximadamente el 99 %) de los aminoácidos del protómero de SAP no están glucosilados. En realizaciones preferidas, un protómero de SAP, o variante de SAP, está libre de cualquier estructura asociada a glucano.

En algunas realizaciones, los protómeros de SAP de la divulgación se han modificado para inhibir la unión de glucanos enlazados en N, glucanos enlazados en O o tanto glucanos enlazados en N como en O. La eliminación de sitios de glucosilación enlazados en N sobre una variante de SAP se lleva a cabo modificando (por ejemplo, por delección, adición o sustitución de aminoácidos) la secuencia de aminoácidos de uno o más de los protómeros de SAP de forma que el protómero carezca de una o más de las secuencias de tripéptidos anteriormente descritas (para sitios de glucosilación enlazados en N). La alteración también puede incluir la delección o sustitución de uno o más residuos de serina o treonina del protómero de SAP. Una variante de SAP de la invención comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido variante en la posición 32 de SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, una variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido variante en la posición 33 y/o 34 de SEC ID NO: 1. En realizaciones preferidas, un protómero de SAP variante comprende un aspartato (D), glutamina (Q) o glutamato (E) en la posición 32 de SEC ID NO: 1. Un protómero de SAP variante también puede comprender, independientemente o en combinación con, una prolina en la posición 33 de SEC ID NO: 1. En ciertas realizaciones, una variante de SAP comprende uno o más protómeros que son i) al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 % al menos 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 % idénticos a SEC ID NO: 1 y ii) comprende una o más de las siguientes sustituciones de aminoácidos: N32D, N32Q, N32E, 33P. Cualquiera de los protómeros de SAP anteriormente mencionados que están sustancialmente libres de glucanos puede comprender además cualquiera de las otras modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento.

En ciertos aspectos, una variante de SAP de la invención comprende uno o más protómeros de SAP que comprenden uno o más aminoácidos covalentemente unidos a uno o más polímeros inertes.

Un polímero inerte unido a un protómero de SAP puede ser de cualquier peso molecular eficaz y puede estar ramificado o sin ramificar. Polímeros usados en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, (a) dextrano y derivados de dextrano, que incluyen sulfato de dextrano, dextrina reticulada y carboximetildextrina; (b) celulosa y derivados de celulosa, que incluyen metilcelulosa y carboximetilcelulosa; (c) almidón, ciclodextrinas y dextrinas y derivados de los mismos; (d) polialquilenglicol y derivados del mismo, que incluyen PEG, mPEG, homopolímeros de PEG, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol, en los que dichos homopolímeros y copolímeros están sin sustituir o sustituidos en un extremo con un grupo alquilo; (e) heparina y fragmentos de heparina; (f) poli(alcohol vinílico) y éteres poliviniléticos; (g) polivinilpirrolidona; (h) α,β -poli((2-hidroxietil)-DL-aspartamida; y (i) polioles polioxiethylados. Cualquiera de los protómeros de SAP anteriormente mencionados que tenga uno o más aminoácidos covalentemente unidos a uno o más polímeros inertes puede comprender además cualquiera de las modificaciones de aminoácidos descritas en el presente documento

En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una variante de SAP que comprende uno o más protómeros de SAP que comprenden al menos un aminoácido covalentemente unido a un resto de polietilenglicol. En algunas realizaciones, el peso molecular de un resto de polietilenglicol es entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 100

kDa (indicando el término “aproximadamente” que en preparaciones de polietilenglicol, algunas moléculas pesarán más, algunos menos, que el peso molecular establecido). Pueden usarse otros tamaños, dependiendo del perfil terapéutico deseado (por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, el grado o ausencia de antigenicidad, etc.). En ciertas realizaciones, el polietilenglicol puede tener un peso molecular promedio de al menos 1, al menos 20, o al menos 40 kDa. El polietilenglicol puede tener una estructura ramificada y polietilenglicoles ramificados se describen, por ejemplo,

5 en la patente de EE.UU. N.º 5.643.575; Morpurgo et al., Appl. Biochem. Biotechnol. 56:59-72 (1996); Vorobjev et al., Nucleosides Nucleotides 18:2745-2750 (1999); y Caliceti et al., Bioconjug. Chem. 10:638-646 (1999). Los restos de polietilenglicol pueden unirse a una variante de SAP con consideración de efectos sobre las porciones catalíticas o que eligen diana.

10 En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona una variante de SAP que comprende uno o más protómeros de SAP que comprenden al menos un aminoácido covalentemente unido a un resto de dextrano. En algunas realizaciones, el peso molecular de un resto de dextrano unido al protómero de SAP está generalmente entre aproximadamente 1 kDa y aproximadamente 250 kDa (indicando el término “aproximadamente” que en preparaciones de conjugados de dextrano, algunas moléculas pesarán más, algunos menos, que el peso molecular establecido). Pueden usarse otros tamaños,

15 dependiendo del perfil terapéutico deseado por ejemplo, la duración de la liberación sostenida deseada, el grado o ausencia de antigenicidad, etc.). En ciertas realizaciones, el dextrano puede tener un peso molecular promedio de al menos 1, al menos 20, o al menos 40 kDa. SAP puede conjugarse con dextrano o un derivado de dextrano que incluye sulfato de dextrano, dextrano reticulado con p-aminoetilo y carboximetildextrano.

(ii) Oligómeros de SAP

20 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona oligómeros de SAP que comprenden dos o más pentámeros de SAP. En aspectos preferidos, los oligómeros de SAP son pentámeros covalentemente reticulados, es decir, mediante reticulaciones protómero-protómero.

Hay un gran número de agentes de reticulación químicos que son conocidos para aquellos expertos en la materia, además de su procedimiento de uso. En ciertas realizaciones, los pentámeros de SAP se reticulan usando uno o más

25 reticulantes heterobifuncionales, que pueden usarse para enlazar proteínas de una manera escalonada. Los reticulantes heterobifuncionales proporcionan la capacidad de diseñar procedimientos de acoplamiento más específicos para conjugar proteínas, reduciendo así los casos de reacciones secundarias no deseadas tales como polímeros de homo-proteína. Se conocen en la técnica una amplia variedad de reticulantes heterobifuncionales. Estos incluyen: 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de succinimidilo (SMCC), éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); (4-yodoacetil)aminobenzoato de N-succinimidilo (SIAB), 4-(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB), clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)carbodiimida (EDC); 4-succinimidiloxycarbonil- α -metil- α -(2-piridilditio)-tolueno (SMPT), 3-(2-piridilditio)propionato de N-succinimidilo (SPDP), 6-((3-(2-piridilditio)propionato)hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP). Aquellos agentes de reticulación que tienen restos de N-hidroxisuccinimida pueden obtenerse como los

30 análogos de N-hidroxisulfosuccinimida, que generalmente tienen mayor solubilidad en agua. Además, aquellos agentes de reticulación que tienen puentes de disulfuro dentro de la cadena de enlace pueden sintetizarse en lugar de los derivados de alquilo de manera que se reduzca la cantidad de conector escisión *in vivo*.

Además de los reticulantes heterobifuncionales, existen varios otros agentes de reticulación que incluyen reticulantes homobifuncionales y fotorreactivos. Suberato de disuccinimidilo (DSS), bismaleimidohexano (BMH) y dimetilpimelidato-2HCl (DMP) son ejemplos de agentes de reticulación homobifuncionales útiles y bis-(β -(4-azidosalicilamido)etil)disulfuro (BASED) y N-succinimidil-6-(4'-azido-2'-nitrofenil-amino)hexanoato (SANPAH) son ejemplos de reticulantes fotorreactivos

40 útiles para su uso en la presente invención. Para una revisión de técnicas de acoplamiento de proteínas véase Means et al. (1990) Bioconjugate Chemistry 1:2-12.

Una clase particularmente útil de reticulantes heterobifuncionales, incluidos anteriormente, contienen el grupo reactivo de amina primaria, N-hidroxisuccinimida (NHS), o su análogo soluble en agua N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-NHS). Las aminas primarias (grupos épsilon-lisina) a pH alcalino no están protonadas y reaccionan por ataque nucleófilo sobre

45 ésteres de NHS o sulfo-NHS. Esta reacción produce la formación de un enlace amida y la liberación de NHS o sulfo-NHS como subproducto.

Los tioles también son grupos reactivos particularmente útiles como parte de un reticulante heterobifuncional. Grupos reactivos de tiol comunes incluyen maleimidias, halógenos y disulfuros de piridilo. Las maleimidias reaccionan

50 específicamente con sulfhidrilo libres (residuos de cisteína) en minutos, en condiciones de ligeramente ácidas a neutras (pH 6,5-7,5). Los halógenos (funciones de yodoacetilo) reaccionan con grupos -SH a pH fisiológico. Ambos de estos grupos reactivos producen la formación de enlaces tioéter estables.

Un tercer componente del reticulante heterobifuncional es el brazo espaciador o puente. El puente es la estructura que conecta los dos extremos reactivos. La característica más evidente del puente es su efecto sobre el impedimento estérico.

55 En algunos casos, un puente más largo puede abarcar más fácilmente la distancia necesaria para enlazar dos biomoléculas complejas.

La preparación de conjugados de proteína-proteína usando reactivos heterobifuncionales es un proceso de dos etapas que implican la reacción de amina y la reacción de sulfhidrilo y tales procesos son generalmente muy conocidos en la técnica. Véanse, por ejemplo, Partis et al. (1983) J. Pro. Chem. 2:263; Ellman et al. (1958) Arch. Biochem. Biophys. 74:443; Riddles et al. (1979) Anal. Biochem. 94:75; Blattler et al. (1985) Biochem 24:1517).

5 En ciertos aspectos, la divulgación proporciona un oligómero de SAP covalentemente reticulado que comprende al menos dos pentámeros de SAP, en el que cada uno de los pentámeros de SAP comprende cinco protómeros de SAP. En ciertas realizaciones, los oligómeros de SAP de la invención pueden comprender protómeros de SAP al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 96 %, al menos el 97 %, al menos el 98 % o al menos el 99 %, idénticos a la secuencia de aminoácidos de SEC ID NO: 1. Alternativamente, los oligómeros de SAP pueden comprender al menos uno, al menos
10 dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más de los protómeros de SAP variantes descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los oligómeros de SAP pueden comprender al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis, al menos siete, al menos ocho, al menos nueve o más protómeros de SAP variantes diferentes como se describen en el presente documento. En realizaciones preferidas, un oligómero de SAP reticulado se caracteriza por uno o más de elevada semivida en plasma, elevada estabilidad *in vitro* y elevada estabilidad *in vivo* en comparación con una muestra correspondiente de SAP aislado de suero humano. En ciertas realizaciones, los oligómeros de SAP reticulados tienen una o más de las siguientes características en comparación con SAP humano derivado del suero: elevada resistencia a proteasa, elevada resistencia a la auto-agregación mediada por calcio y elevada unión a ion metálico.

Procedimientos de producción de variantes de SAP

20 En parte, la divulgación proporciona procedimientos para generar las variantes de SAP y oligómeros de SAP de la invención. Las variantes de SAP de la divulgación pueden comprender al menos un protómero que tiene una o más alteraciones de aminoácidos que modifican al menos una actividad biológica de la proteína SAP. Como se describe en el presente documento, procedimientos de generación de alteraciones de aminoácidos incluyen, pero no se limitan a, mutar al menos un aminoácido de SEC ID NO: 1 (por ejemplo, delección de uno o más aminoácidos, adición de uno o más aminoácidos, o sustitución de uno o más aminoácidos), modificar químicamente uno o más aminoácidos de SEC ID NO: 1 (por ejemplo, unir uno o más polipéptidos inertes a un aminoácido de SEC ID NO: 1), o una combinación de los mismos.

En ciertos aspectos, pueden generarse protómeros de SAP variantes de la invención usando técnicas de mutagénesis al azar, técnicas de mutagénesis dirigida, evolución dirigida, o combinación de las mismas. Pueden generarse protómeros de SAP variantes usando técnicas que introducen mutaciones aleatorias o dirigidas en la secuencia codificante de un ácido nucleico. El ácido nucleico se expresa entonces en un sistema de expresión deseado y el péptido resultante se evalúa para propiedades de interés, por ejemplo, resistencia a la auto-agregación, resistencia a la escisión por proteasas, elevada unión a ion metálico, elevada semivida en suero, elevada semivida *in vitro*, elevada semivida *in vivo*. Técnicas para introducir mutaciones aleatorias o dirigidas en secuencias de ADN son muy conocidas en la técnica e incluyen mutagénesis por PCR, mutagénesis por saturación y enfoques de oligonucleótidos degenerados. Véanse Sambrook y Russell (2001, Molecular Cloning, A Laboratory Approach, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, N.Y.) y Ausubel et al. (2002, Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY).

En la mutagénesis mediante la PCR aleatoria se usa fidelidad reducida de la polimerasa Taq para introducir mutaciones aleatorias en un fragmento de ADN clonado (Leung et al., 1989, Technique 1: 11-15). La región de ADN que va a mutagenizarse se amplifica usando PCR en condiciones que reducen la fidelidad de la síntesis de ADN por la ADN polimerasa Taq usando, por ejemplo, una relación dGTP/dATP alterada y añadiendo Mn²⁺ a la reacción de la PCR. El conjunto de fragmentos de ADN amplificados se inserta en vectores de clonación adecuados para proporcionar bibliotecas de mutantes aleatorios.

La mutagénesis por saturación permite la rápida introducción de un gran número de sustituciones de una sola base en fragmentos de ADN clonados (Mayers et al., 1985, Science 229:242). Esta técnica incluye la generación de mutaciones, por ejemplo, mediante tratamiento o irradiación de ADN monocatenario *in vitro* y la síntesis de una hebra de ADN complementario. Puede modularse la frecuencia de la mutación modulando la gravedad del tratamiento y pueden obtenerse esencialmente todas las sustituciones de bases posibles. Debido a que este procedimiento no implica una selección genética de fragmentos de mutantes, se obtienen sustituciones neutras, así como aquellas que alteran la función. Además, la distribución de mutaciones puntuales no está sesgada hacia elementos de secuencias conservados.

También puede generarse una biblioteca de homólogos de ácidos nucleicos a partir de un conjunto de secuencias de oligonucleótidos degenerados. Puede llevarse a cabo la síntesis química de secuencias de oligonucleótidos degenerados en un sintetizador automático de ADN y los genes sintéticos pueden entonces asociarse en un vector de expresión adecuado. Se conoce en la técnica la síntesis de oligonucleótidos degenerados (véanse, por ejemplo, Narang, S A (1983) Tetrahedron 39:3; Itakura et al. (1981) Recombinant DNA, Proc 3rd Cleveland Sympos. Macromolecules, ed. AG Walton, Amsterdam: Elsevier pp. 273-289; Itakura et al. (1984) Annu. Rev. Biochem. 53:323; Itakura et al. (1984) Science

198:1056; Ike et al. (1983) *Nucleic Acid Res.* 11:477. Tales técnicas se han empleado en la evolución dirigida de otros péptidos (véanse, por ejemplo, Scott et al. (1990) *Science* 249:386-390; Roberts et al. (1992) *PNAS* 89:2429-2433; Devlin et al. (1990) *Science* 249:404-406; Cwirla et al. (1990) *PNAS* 87:6378-6382; así como las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.223.409, 5.198.346 y 5.096.815).

- 5 Los protómeros de SAP variantes también pueden generarse usando técnicas de “evolución dirigida”. Estas estrategias son diferentes de los procedimientos de mutagénesis aleatoria tradicionales debido a que implican someter la secuencia de ácido nucleico que codifica el péptido de interés a rondas repetitivas de mutación, cribado y amplificación.

En algunas técnicas de “evolución dirigida”, la diversidad de los ácidos nucleicos obtenidos se genera mediante procedimientos de mutación que crean al azar mutaciones puntuales en la secuencia de ácido nucleico. Las técnicas de mutación puntual incluyen, pero no se limitan a, “error-prone PCRTM” (Caldwell y Joyce, 1994; *PCR Methods Appl.* 2:28-33; y Ke y Madison, 1997, *Nucleic Acids Res.* 25: 3371-3372), mutagénesis dirigida a oligonucleótidos repetidos (Reidhaar-Olson et al., 1991, *Methods Enzymol.* 208: 564-586) y cualquiera de los procedimientos anteriormente mencionados de mutagénesis aleatoria.

15 Otro procedimiento para crear diversidad mediante el que puede actuar la evolución dirigida es el uso de genes mutadores. El ácido nucleico de interés se cultiva en una cepa de células mutadoras, cuyo genoma normalmente codifica los genes de reparación del ADN defectuoso (patente de EE.UU. N.º 6.365.410; Selifonova et al., 2001, *Appl. Environ. Microbiol.* 67:3645-3649; Long-McGie et al., 2000, *Biotech. Bioeng.* 68:121-125; véase Genencor International Inc., Palo Alto CA).

20 El logro de diversidad usando técnicas de evolución dirigida también puede realizarse usando mutagénesis de saturación junto con cebadores degenerados (Gene Site Saturation MutagenesisTM, Diversa Corp., San Diego, CA). En este tipo de mutagénesis de saturación se usan cebadores degenerados diseñados para cubrir la longitud de la secuencia de ácido nucleico que va a diversificarse para cebar la polimerasa en las reacciones de la PCR. De este modo, cada codón de una secuencia codificante para un aminoácido puede mutarse para codificar cada uno de los diecinueve aminoácidos usuales que quedan. Esta técnica también puede usarse para introducir mutaciones, deleciones e inserciones en regiones específicas de una secuencia codificante de ácido nucleico dejando a la vez sin tocar el resto de la molécula del ácido nucleico. Los procedimientos para la técnica de saturación de genes son muy conocidos en la técnica y pueden encontrarse en la patente de los EE.UU. N.º: 6.171.820.

30 También pueden generarse protómeros de SAP variantes usando las técnicas de transposición de genes, transposición de motivos, transposición de exones y/o transposición de codones (denominadas en su conjunto “transposición de ADN”). Las técnicas de transposición del ADN también pueden emplearse para modular las actividades de péptidos útiles en la invención y pueden usarse para generar péptidos que tengan actividad alterada. Véanse, generalmente, las patentes de EE.UU. N.ºs: 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252; y 5.837.458 y Stemmer et al. (1994, *Nature* 370(6488):389-391); Cramer et al. (1998, *Nature* 391 (6664):288-291); Zhang et al. (1997, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94(9):4504-4509); Stemmer et al. (1994, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 91(22):10747-10751), Patten et al. (1997, *Curr. Opin. Biotechnol.* 8:724-33); Harayama, (1998, *Trends Biotechnol.* 16(2):76-82); Hansson, et al., (1999, *J. Mol. Biol.* 287:265-76); y Lorenzo and Blasco (1998, *Biotechniques* 24(2):308 13).

40 La transposición de ADN implica el ensamblaje de dos o más segmentos de ADN mediante recombinación homóloga o específica de sitio para generar variación en la secuencia del polinucleótido. Se ha usado transposición de ADN para generar variaciones novedosas de proteínas del virus de tipo 1 de la inmunodeficiencia humana (Pekrun et al., 2002, *J. Virol.* 76(6):2924-35), triazina hidrolasas (Raillard et al. 2001, *Chem Biol* 8(9):891-898), proteínas del virus de la leucemia murina (VLM) (Powell et al. 2000, *Nat Biotechnol* 18(12):1279 1282) e indolglucosil sintasa (Merz et al. 2000, *Biochemistry* 39(5):880 889).

45 La técnica de transposición de ADN fue desarrollada para generar diversidad biomolecular imitando la recombinación natural permitiendo la recombinación homóloga *in vitro* del ADN (Stemmler, 1994, *Nature* 370: 389-391; y Stemmler, 1994, *PNAS* 91: 10747-10751). Generalmente, en este procedimiento, una población de genes relacionados se fragmenta y se somete a ciclos repetitivos de desnaturalización, rehibridación, seguidas por la extensión de los nucleótidos protuberantes de 5' por la polimerasa Taq. Con cada ciclo, la longitud de los fragmentos aumenta y se produce la recombinación de ADN cuando los fragmentos que se originan a partir de diferentes genes se hibridan entre sí. La fragmentación inicial del ADN se realiza normalmente por digestión con nucleasas, usando normalmente DNasa (véanse las referencias a Stemmler, anteriormente), pero también puede realizarse por síntesis interrumpida de PCR (patente de EE.UU. N.º: 5.965.408, incorporada en el presente documento por referencia en su totalidad; véase, Diversa Corp., San Diego, CA). Los procedimientos de transposición del ADN tienen ventajas sobre los procedimientos de mutaciones puntuales aleatorias porque se consigue la recombinación directa de mutaciones beneficiosas generadas por cada ronda de transposición y por tanto, existe una auto-selección de fenotipos mejorados de péptidos. Las técnicas de transposición de ADN son muy conocidas para los expertos en la técnica. Explicaciones detalladas de tal tecnología se encuentran en Stemmler, 1994, *Nature* 370: 389-391 y Stemmler, 1994, *PNAS* 91: 10747-10751. La técnica de transposición de ADN

también se describe en las patentes de EE.UU. N.ºs: 6.180.406, 6.165.793, 6.132.970, 6.117.679, 6.096.548, 5.837.458, 5.834.252, 5.830.721, 5.811.238 y 5.605.793.

La técnica también proporciona modificaciones incluso más recientes de la técnica básica de transposición de ADN. En un ejemplo, la transposición de exones, exones o combinaciones de exones que codifican dominios específicos de péptidos se amplifican usando oligonucleótidos quiméricos. A continuación, las moléculas amplificadas se recombinan autocebando el ensamblaje de PCR (Kolkman y Stemmler, 2001, Nat. Biotech. 19:423-428). En otro ejemplo, usando la técnica de quimeragénesis aleatoria en la construcción de bibliotecas mediante moldes transitorios (RACHITT), se hibridan fragmentos de ADN parental monocatenario sobre un molde monocatenario de longitud completa (Coco et al., 2001, Nat. Biotechnol. 19:354-359). En otro ejemplo más, el proceso de extensión por etapas (StEP), se emplea el termociclado con ciclos de hibridación/extensión muy abreviados para interrumpir repetidamente la polimerización del ADN a partir de cebadores flanqueantes (Zhao et al., 1998, Nat. Biotechnol. 16:258-261). En la técnica conocida como CLERY, se combina la transposición de la familia *in vitro* con la recombinación homóloga *in vivo* en levadura (Abecassis et al., 2000, Nucleic Acids Res. 28:E88). Para maximizar la recombinación intergénica, el ADN monocatenario de hebras complementarias de cada uno de los ácidos nucleicos se digiere con DNasa y se hibrida (Kikuchi et al., 2000, Gene 243:133-137). Los extremos romos de dos ácidos nucleicos truncados de longitudes variables que están enlazados por una secuencia escindible se enlazan a continuación para generar la fusión génica sin recombinación homóloga (Sieber et al., 2001, Nat Biotechnol. 19: 456-460; Lutz et al., 2001, Nucleic Acids Res. 29:E16; Ostermeier et al., 1999, Nat. Biotechnol. 17:1205-1209; Lutz y Benkovic, 2000, Curr. Opin. Biotechnol. 11:319-324). También se ha potenciado la recombinación entre ácidos nucleicos con poca homología de secuencias en común usando extremos romos mediados por exonucleasas de fragmentos de ADN y enlazando los fragmentos juntos para recombinarlos (patente de EE.UU. N.º: 6.361.974).

Además de los protocolos publicados que detallan las técnicas de evolución dirigida y de transposición de genes, ahora están disponibles servicios comerciales que llevan a cabo los procedimientos de transposición y de selección de genes en los péptidos de elección. Maxygen (Redwood City, CA) ofrece servicios comerciales para generar bibliotecas personalizadas de ADN transpuesto. Además, esta empresa realizará procedimientos personalizados de evolución dirigida que incluyen la transposición y la selección de genes de una familia de péptidos de elección.

Optigenix, Inc. (Newark, Del.) ofrece el servicio relacionado de transposición de plásmidos. Optigenix usa familias de genes para obtener mutantes de los anteriores que tienen nuevas propiedades. El ácido nucleico de interés se clona en un plásmido en un sistema de expresión de *Aspergillus*. A continuación, el ADN de la familia relacionada se introduce en el sistema de expresión y se produce la recombinación en las regiones conservadas de la familia en el huésped. A continuación, el ADN mutante resultante se expresa y se criba el péptido producido a partir del anterior para la presencia de propiedades deseadas y la ausencia de propiedades no deseadas.

Tras cada ronda repetitiva de "evolución", los péptidos deseados expresados mediante genes mutados se criban para las características de interés. Los genes "candidatos" se amplifican a continuación y se combinan para la siguiente ronda de transposición del ADN. El procedimiento de cribado usado es muy dependiente del péptido que está siendo "evolucionado" y las características de interés. Pueden seleccionarse características tales como la estabilidad del péptido, actividad biológica, antigenicidad, entre otras, usando procedimientos que son muy conocidos en la técnica.

El técnico experto apreciará que las anteriores técnicas de mutación y selección pueden combinarse entre sí y con procedimientos adicionales para generar el mejor protómero de SAP variante posible útil en los procedimientos de la invención. Así, la invención no se limita a un procedimiento específico para la generación de variantes de SAP y debe considerarse que engloba todas y cada una de las metodologías descritas en el presente documento. Por ejemplo, inicialmente puede realizarse un procedimiento para introducir mutaciones puntuales especificadas en una secuencia de ácido nucleico, seguido de rondas repetitivas de transposición, selección y amplificación de ADN. Para algunas variantes puede usarse la introducción inicial de mutaciones puntuales para introducir diversidad en una población de genes que carece de esta y la siguiente ronda de transposición y cribado de ADN seleccionará mutaciones puntuales ventajosas.

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para modificar químicamente uno o más aminoácidos de un protómero de SAP. Hay varios procedimientos descritos en la materia para unir polímeros inertes a un polipéptido que incluyen, pero no se limitan a, usar bromuro de cianógeno (alquilación) y química de acoplamiento de dialdehídos y oxidación con peryodato. En particular, se han descrito en la materia muchos procedimientos para PEGilar aminoácidos. Por ejemplo, la patente de EE.UU. N.º: 4.088.538 desvela un conjugado de polímero enzimáticamente activo-enzima de una enzima covalentemente unida a PEG. Similarmente, la patente de EE.UU. N.º: 4.496.689 desvela un complejo covalentemente unido del inhibidor α -1 de la proteasa con un polímero tal como PEG o metoxipoli(etilenglicol) ("mPEG"). Abuchowski et al. (J. Biol. Chem. 252: 3578 (1977) desvelan la unión covalente de mPEG a un grupo amina de albúmina de suero bovino. La patente de EE.UU. N.º: 4.414.147 desvela un procedimiento de conversión de interferón menos hidrófobo conjugándolo con un anhídrido de un ácido dicarboxílico, tal como poli(anhídrido etilensuccínico). El documento PCT WO 87/00056 desvela la conjugación de PEG y polioles polioxiethylados con proteínas tales como interferón- β , interleucina-2 e inmunotoxinas. El documento EP 154.316 desvela y reivindica linfocinas químicamente modificadas, tales

como IL-2, que contienen PEG unido directamente a al menos un grupo amino primario de la linfocina. La patente de EE.UU. N.º: 4.055.635 desvela composiciones farmacéuticas de un complejo soluble en agua de una enzima proteolítica asociada covalentemente a una sustancia polimérica tal como un polisacárido. Otro modo de unir PEG a péptidos es mediante la oxidación no específica de residuos de glucosilo sobre un péptido. El azúcar oxidado se utiliza como locus para unir un resto de PEG al péptido. Por ejemplo, el documento WO 94/05332 desvela el uso de una hidracina- o amino-PEG para añadir PEG a una glicoproteína. Los restos de glucosilo se oxidan al azar a los aldehídos correspondientes, que posteriormente se acoplan al amino-PEG.

La divulgación también proporciona variantes de SAP que comprenden pegilación específica de sitio. En algunas realizaciones, un protómero de SAP se modifica por la introducción de residuos de cisteína "libres" (es decir, cisteínas que no participan en enlaces disulfuro) a los que el PEG puede unirse usando química de malaimida bien descrita (véase, por ejemplo, Natarajan, Bioconjug Chem. 2005 En-Feb;16(1):113-21; Goodson, Biotechnology NY. 1990 Apr;8(4):343-6). Se proporcionan variantes de SAP modificadas, en las que los sitios de conjugación de polímeros se introducen mediante residuos de cisteína de variante. El residuo de cisteína puede sustituirse con uno o más residuos de aminoácidos de SAP nativos o añadiendo una o más cisteínas a un polipéptido SAP. En algunas realizaciones, un residuo de cisteína se introduce en la posición -1 de SEC ID NO: 1 (es decir, se añade al extremo N del polipéptido). En algunas realizaciones, un residuo de cisteína se introduce por la sustitución del aminoácido nativo en una posición 32 de SEC ID NO: 1 con un residuo de cisteína. En algunas realizaciones, la cisteína introducida está PEGilada.

Para la pegilación de residuos de cisteína, el polipéptido puede tratarse con un agente reductor, tal como ditiotreitól (DDT) antes de la pegilación. El agente reductor se elimina posteriormente por cualquier procedimiento convencional, tal como por desalación. La conjugación de PEG con un residuo de cisteína normalmente tiene lugar en un tampón adecuado a pH 6-9 a temperaturas variables de 4 °C a 25 °C durante periodos de hasta aproximadamente 16 horas. Ejemplos de polímeros de PEG activados para acoplar con residuos de cisteína incluyen los siguientes PEG lineales y ramificados, que incluyen, pero no se limitan a, vinilsulfona-PEG (PEG-VS), tal como vinilsulfona-mPEG (mPEG-VS); disulfuro de ortopiridilo-PEG (PEG-OPSS), tal como disulfuro de ortopiridilo-mPEG (MPEG-OPSS); y maleimida-PEG (PEG-MAL), tal como maleimida-mPEG (mPEG-MAL) y maleimida-mPEG2 ramificado (mPEG2-MAL).

Un enfoque para añadir PEG o dextrano a SAP utiliza la enzima transglutaminasa (glutamil-péptido γ -glutamilttransferasa; EC 2.3.2.13). Esta enzima cataliza la adición de acilo dependiente del calcio a una amina primaria en la que el grupo gamma-carboxamida del residuo de glutamina unido al péptido es el donante de acilo y la amina primaria es el aceptor de acilo y el donante de amina. Por tanto, se emplea una reacción de transglutaminasa para conjugar covalentemente y de forma específica de sitio SAP con un polímero, tal como PEG o dextrano mediante un residuo de Gln que es capaz de actuar de aceptor de amina de la transglutaminasa.

El aceptor de amina de la transglutaminasa en SAP puede ser un residuo de Gln nativo o introducido (es decir, variante). En general, se ha mostrado que las repeticiones de glutamina potencian las propiedadesceptoras de cada residuo de glutamina en la repetición y también se ha mostrado que la accesibilidad de residuos de glutamina es importante en determinar su capacidad para funcionar de sustratos de transglutaminasa (Kahlem, P. et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 1996, 93, 14580-14585). En algunas realizaciones, la variante de SAP comprende una mutación N32Q, que introduce un aceptor de amina de la transglutaminasa. En algunas realizaciones, la variante de SAP comprende la secuencia de aminoácidos al menos el 70, 80, 85, 90, 95, 98 o el 100 % idéntica a SEC ID NO: 2 (en la que X es cualquier aminoácido, A es 3 a 20 e Y es 1 a 10):

**X_AQ_YHTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLIPTLEKPLQNFTLCFRAYS DLS
 RAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIEKFPAP
 VHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQPKIVLGQE QD
 SYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDW
 QALNYEIRGYVIKPLVWV (SEQ ID NO: 2)**

En algunas realizaciones, Y es 1. En algunas realizaciones, Y es 2. En algunas realizaciones, la variante de SAP está conjugada con PEG mediante un aceptor de amina de la transglutaminasa. En algunas realizaciones, la variante de SAP está conjugada con dextrano mediante un aceptor de amina de la transglutaminasa.

Se han descrito en la materia procedimientos para añadir polímeros a residuos de Gln (véanse, por ejemplo, la publicación de EE.UU. N.º 20060116322, Sugimura et al. 281 (26): 17699. (2006); Sato, H. Adv Drug Deliv Rev. 2002 Jun 17;54(4):487-504; Sato, et al, Bioconjug Chem. 2000 Jul-Aug;11(4):502-9; Sato, et al Bioconjug Chem. 2001 Sep-Oct;12(5):701-10, Fontana, et al Adv Drug Deliv Rev. 2008 Jan 3;60(1):13-28. Epub 2007 Aug 16, Hohenadl, J Biol Chem.

1995 Oct 6;270(40):23415-20)). Los polímeros se enlazan o modifican para contener una amina primaria que actuará de donante de amina de la transglutaminasa.

Pueden producirse variantes de SAP y oligómeros de SAP covalentemente reticulados descritos en el presente documento en células bacterianas, células de insecto, levadura, células fúngicas o células de mamífero que incluyen, por ejemplo, células humanas. En aquellos casos en los que la célula huésped es humana, la célula puede estar en un sujeto vivo o puede aislarse de un sujeto, por ejemplo, en un cultivo celular, muestra de tejido, suspensión de células, etc. Otras células huésped adecuadas son conocidas para aquellos expertos en la materia.

La divulgación proporciona además vectores de expresión para producir protómeros de SAP. Por ejemplo, se contemplan vectores de expresión que incluyen una secuencia de nucleótidos que codifica un protómero de SAP, en el que la secuencia codificante está operativamente enlazada a al menos una secuencia reguladora transcripcional. Secuencias reguladoras para dirigir la expresión de protómeros de SAP son reconocidas en la técnica y se seleccionan por varios criterios bien entendidos. Secuencias reguladoras a modo de ejemplo se describen en Goeddel; Gene Expression Technology: Methods in Enzymology, Academic Press, San Diego, CA (1990). Por ejemplo, puede usarse cualquiera de una amplia variedad de secuencias reguladoras que controlan la expresión de una secuencia de ADN cuando se enlazan operativamente a ella en estos vectores para expresar secuencias de ADN que codifican protómeros de SAP. Tales secuencias de control de la expresión útiles incluyen, por ejemplo, los promotores tempranos y tardíos del SV40, promotor temprano inmediato del adenovirus o citomegalovirus, el sistema *lac*, el sistema *trp*, el sistema TAC o TRC, promotor T7 cuya expresión está dirigida por T7 ARN polimerasa, un promotor para 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, los promotores de ácido fosfatasa, por ejemplo, Pho5 y los promotores de los factores de apareamiento α de la levadura y otras secuencias conocidas por controlar la expresión de genes de células procariotas o eucariotas o sus virus y diversas combinaciones de los mismos. Debe entenderse que el diseño del vector de expresión puede depender de factores tales como la elección de la célula huésped diana que va transformarse. Además, también debe considerarse el número de copias del vector, la capacidad para controlar ese número de copias y la expresión de cualquier otra proteína codificada por el vector, tal como marcadores de antibiótico.

La divulgación también proporciona una célula huésped transfectada con un gen recombinante con el fin de expresar un protómero de SAP. La célula huésped puede ser cualquier célula procariota o eucariota. Por ejemplo, puede expresarse un protómero de SAP en células bacterianas tales como *E. coli*, células de insecto, levadura, o células de mamífero. Otras células huésped adecuadas son conocidos para aquellos expertos en la materia.

Por consiguiente, la divulgación proporciona procedimientos de producción de protómeros de SAP. Por ejemplo, puede cultivarse una célula huésped transfectada con un vector de expresión que codifica un protómero de SAP de la invención en condiciones apropiadas para permitir que se produzca la expresión del polipéptido. El protómero de SAP puede secretarse, por inclusión de una secuencia señal de la secreción y aislarse de una mezcla de células y medio que contiene la proteína. Alternativamente, el protómero de SAP puede ser retenido citoplásmicamente y las células recogerse, lisarse y aislarse el protómero. Un cultivo celular incluye células huésped, medios y otros subproductos. Medios adecuados para el cultivo celular son muy conocidos en la técnica. Las proteínas pueden aislarse del medio de cultivo celular, células huésped, o ambos, usando técnicas conocidas en la técnica para purificar proteínas, que incluyen cromatografía de intercambio iónico, cromatografía de filtración en gel, ultrafiltración, electroforesis y purificación por inmunoafinidad con anticuerpos específicos para epítopos particulares de la proteína.

Así, puede usarse una secuencia codificante para un protómero de SAP para producir una forma recombinante de la proteína mediante procesos microbianos o celulares eucariotas. El enlazar la secuencia de polinucleótidos en una construcción génica, tal como un vector de expresión y transformar o transfectar en huéspedes, tanto eucariotas (levadura, aviares, de insecto o de mamífero) como procariotas (células bacterianas), son procedimientos convencionales.

Vehículos de expresión para la producción de una proteína recombinante incluyen plásmidos y otros vectores. Por ejemplo, vectores adecuados para la expresión de protómeros de SAP incluyen plásmidos de los tipos: plásmidos derivados de pBR322, plásmidos derivados de pEMBL, plásmidos derivados de pEX, plásmidos derivados de pBTac y plásmidos derivados de pUC para la expresión en células procariotas, tales como *E. coli*.

Existen varios vectores para la expresión de proteínas recombinantes en levadura. Por ejemplo yEp24, Ylp5, YEp51, YEp52, pYES2 y YRp17 son vehículos de clonación y expresión útiles en la introducción de construcciones genéticas en *S. cerevisiae* (véase, por ejemplo, Broach et al., (1983) en Experimental Manipulation of Gene Expression, ed. M. Inouye Academic Press, p. 83). Estos vectores pueden replicarse en *E. coli* debido a la presencia de pBR322 ori y en *S. cerevisiae* debido al determinante de replicación del plásmido de 2 micrómetros de levadura. Frecuentemente se usa selección o contraselección autótrofa en levadura. Además, puede usarse resistencia a marcadores de fármaco, tales como ampicilina, en bacterias.

Los vectores de expresión de mamífero pueden contener tanto secuencias procariotas para facilitar la propagación del vector en bacterias, como una o más unidades de transcripción eucariotas que se expresan en células eucariotas. Los vectores derivados de pcDNA1/amp, pcDNA1/neo, pRc/CMV, pSV2 gpt, pSV2neo, pSV2-dhfr, pTk2, pRSVneo, pMSG,

pSVT7, pko-neo y pHyg son ejemplos de vectores de expresión de mamífero adecuados para la transfección de células eucariotas. Algunos de estos vectores se modifican con secuencias de plásmidos bacterianos, tales como pBR322, para facilitar la replicación y resistencia a la selección de fármacos en tanto células procariotas como eucariotas. Alternativamente, pueden usarse derivados de virus tales como el virus del papiloma bovino (BPV-1) o el virus de Epstein-Barr (pHEBo, derivado de pREP y p205) para la expresión transitoria de proteínas en células eucariotas. Pueden encontrarse ejemplos de otros sistemas de expresión virales (incluyendo retrovirales) más adelante en la descripción de los sistemas de administración de terapia génica. Los diversos procedimientos empleados en la preparación de los plásmidos y transformación de organismos huésped son muy conocidos en la técnica. Para otros sistemas de expresión adecuados para tanto células procariotas como eucariotas, además de procedimientos recombinantes generales, véase Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Ed., ed. por Sambrook, Fritsch y Maniatis (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989) Capítulos 16 y 17. En algunos casos, puede desearse expresar los polipéptidos SAP recombinantes por el uso de un sistema de expresión de baculovirus. Ejemplos de tales sistemas de expresión de baculovirus incluyen vectores derivados de pVL (tales como pVL1392, pVL1393 y pVL941), vectores derivados de pAcUW (tales como pAcUW1) y vectores derivados de pBlueBac (tales como pBlueBac III que contiene beta-gal).

En algunos casos se deseará producir protómeros de SAP en células de vertebrado y la propagación de células de vertebrado en cultivo (cultivo de tejido) se ha convertido en un procedimiento rutinario. Ejemplos de líneas de células huésped de mamífero útiles son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); línea de riñón embrionario humano (células 293 o 293 subclonadas para el crecimiento en cultivo en suspensión, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59. (1977)); células de riñón de hámster bebé (BHK, ATCC CCL 10); células de ovario de hámster chino/- DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); células de Sertoli de ratón (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); células de riñón de mono (CV1 ATCC CCL 70); células de riñón de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA, ATCC CCL 2); células de riñón canino (MDCK, ATCC CCL 34); células de hígado de rata Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células de pulmón humano (W138, ATCC CCL 75); células de hígado humano (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; una línea de hepatoma humano (Hep G2); y células de mieloma o de linfoma (por ejemplo, células Y0, J558L, P3 y NS0) (véase la patente de EE.UU. N.º: 5.807.715).

En ciertas realizaciones, la producción de protómeros de SAP puede lograrse usando sistemas de traducción *in vitro*. Los sistemas de traducción *in vitro* son, generalmente, un sistema de traducción que es un extracto libre de células que contiene al menos los elementos mínimos necesarios para la traducción de una molécula de ARN en una proteína. Un sistema de traducción *in vitro* normalmente comprende al menos ribosomas, ARNt, metionil-ARNtMet iniciador, proteínas o complejos que participan en la traducción, por ejemplo, eIF2, eIF3, el complejo de unión a la caperuza (CB), que comprende la proteína de unión a la caperuza (CBP) y factor de iniciación eucariota 4F (eIF4F). Una variedad de sistemas de traducción *in vitro* son muy conocidos en la técnica e incluyen kits comercialmente disponibles. Ejemplos de sistemas de traducción *in vitro* incluyen lisados eucariotas, tales como lisados de reticulocitos de conejo, lisados de ovocitos de conejo, lisados de célula humanas, lisados de células de insecto y extractos de germen de trigo. Los lisados están comercialmente disponibles de fabricantes tales como Promega Corp., Madison, Wis.; Stratagene, La Jolla, Calif.; Amersham, Arlington Heights, Ill.; y GIBCO/BRL, Grand Island, N.Y. Los sistemas de traducción *in vitro* normalmente comprenden macromoléculas, tales como enzimas, factores de traducción, iniciación y alargamiento, reactivos químicos y ribosomas. Además, puede usarse un sistema de transcripción *in vitro*. Tales sistemas normalmente comprenden al menos una holoenzima ARN polimerasa, ribonucleótidos y cualquier factor de iniciación, alargamiento y terminación de la transcripción necesario. Pueden acoplarse transcripción y traducción *in vitro* en una reacción de una etapa para producir proteínas de uno o más ADN aislados.

Frecuentemente, es difícil producir grandes cantidades de una proteína con consistencia reproducible en las características del producto, tales como modificación y/o plegamiento post-traducciona. En algunas realizaciones, las variantes de SAP de la divulgación se caracterizan por elevada eficiencia de fabricación de la proteína SAP (por ejemplo, mayor rendimiento del producto de proteína, elevada homogeneidad del producto de proteína, elevada estabilidad del producto de proteína), particularmente para uso *in vivo* (por ejemplo, como agente terapéutico). En algunas realizaciones, las variantes de SAP de la divulgación se caracterizan por elevada estabilidad y/o homogeneidad cuando se expresan en una célula (por ejemplo, procariota, eucariota) en comparación con SAP silvestre expresado en la misma línea celular. Por ejemplo, las proteínas recombinantes se caracterizan generalmente por un alto grado de heterogeneidad con respecto a sus estructuras de glucano unidas. Cabría esperar que las variantes de SAP que tienen una secuencia de aminoácidos modificada para inhibir la glucosilación (tal como una sustitución de aminoácidos en la posición 32 de SEC ID NO: 1, por ejemplo, N32D) se produjeran más homogéneamente a partir de una célula.

En realizaciones a modo de ejemplo, las variantes de SAP pueden purificarse, por ejemplo, a una pureza del 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,9 %, o mayor, con respecto a macromoléculas contaminantes, particularmente otras proteínas y ácidos nucleicos y libres de agentes infecciosos y pirógenos. Las variantes de SAP pueden estar sustancialmente libres de otros polipéptidos, particularmente otros polipéptidos de origen animal.

Las variantes de SAP pueden purificarse usando procedimientos y medios de fraccionamiento y/o de purificación convencional. Puede usarse precipitación con sulfato de amonio y extracción con ácido o caótropro para el fraccionamiento de muestras. Etapas de purificación a modo de ejemplo pueden incluir hidroxapatita, exclusión por tamaño, FPLC y cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa. Medios de intercambio aniónico adecuados incluyen dextranos derivatizados, agarosa, celulosa, poliacrilamida, sílices de especialidad y similares. Son adecuados derivados de PEI, DEAE, QAE y Q, que incluyen, por ejemplo, DEAE Fast-Flow Sepharose (Farmacia, Piscataway, NJ). Medios cromatográficos a modo de ejemplo incluyen aquellos medios derivatizados con grupos fenilo, butilo u octilo, tales como Phenyl-Sepharose FF (Farmacia), Toyopearl butyl 650 (Toso Haas, Montgomeryville, PA), Octyl-Sepharose (Farmacia) y similares; o resinas poliacrílicas, tales como Amberchrom CG 71 (Toso Haas) y similares. Soportes sólidos adecuados incluyen perlas de vidrio, resinas basadas en sílice, resinas celulósicas, perlas de agarosa, perlas de agarosa reticulada, perlas de poliestireno, resinas de poliacrilamida reticulada y similares que son insolubles en las condiciones en las que van a usarse. Estos soportes pueden modificarse con grupos reactivos que permiten la unión de proteínas por grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo, grupos hidroxilo y/o restos de hidrato de carbono. Ejemplos de químicas de acoplamiento incluyen activación con bromuro de cianógeno, activación con N-hidroxisuccinimida, activación con epóxido, activación con sulfhidrilo, activación con hidrazida y derivados de carboxilo y amino para las químicas de acoplamiento de carbodiimida. Estos y otros medios sólidos son muy conocidos y se usan ampliamente en la materia y están disponibles de proveedores comerciales. Procedimientos para unir polipéptidos a medios de soporte son muy conocidos en la técnica. La selección de un procedimiento particular es una cuestión de diseño rutinario y se determina en parte por las propiedades del soporte elegido. Véase, por ejemplo, Affinity Chromatography: Principles & Methods (Farmacia LKB Biotechnology, Uppsala, Suecia, 1988). Las variantes de SAP descritas en el presente documento también pueden aislarse de una marca de afinidad (por ejemplo, polihistidina, proteína de unión a maltosa, GST, dominio de unión a almidón, FLAG, un dominio de inmunoglobulina) para facilitar la purificación como se describe adicionalmente en el presente documento.

Procedimientos de tratamiento

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona procedimientos para tratar un trastorno sensible a SAP en un paciente administrando una cantidad terapéuticamente eficaz de una variante de SAP u oligómero de SAP de la invención a un paciente en necesidad del mismo. La dosificación y frecuencia de tratamiento pueden ser determinadas por un experto en la materia y variarán dependiendo de los síntomas, edad y peso corporal del paciente y la naturaleza y gravedad del trastorno que va a tratarse o prevenirse. En algunas realizaciones, una variante de SAP u oligómero de SAP se administra a un paciente una vez o dos veces por día, una vez o dos veces por semana, una vez o dos veces por mes, o justo antes de o en la aparición de los síntomas.

Pueden determinarse fácilmente dosificaciones por técnicas conocidas para aquellos expertos en la materia o como se enseña en el presente documento. La toxicidad y eficacia terapéutica de SAP pueden determinarse mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en animales experimentales, por ejemplo, determinando la DL₅₀ y la DE₅₀. La DE₅₀ (dosis eficaz 50) es la cantidad de fármaco requerida para producir un efecto especificado en el 50 % de una población de animales. La DL₅₀ (dosis letal 50) es la dosis de fármaco que destruye el 50 % de una población de muestra.

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es fibrosis. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la fibrosis se describe en la solicitud de patente de EE.UU. N.º: 2007/0243163. Trastornos relacionados con la fibrosis que pueden ser susceptibles al tratamiento con el procedimiento objeto incluyen, pero no se limitan a, enfermedad del colágeno, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar fibrótica humana (por ejemplo, bronquiolitis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar de una etiología conocida, estroma tumoral en enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica que afecta los pulmones, síndrome de Hermansky-Pudlak, neumoconiosis de los trabajadores del carbón, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada al SIDA, sarcoidosis, asma de moderado a grave y similares), enfermedad vascular fibrótica, esclerosis arterial, aterosclerosis, venas varicosas, infartos coronarios, infartos cerebrales, fibrosis miocárdica, fibrosis musculoesquelética, adherencias post-quirúrgicas, enfermedad renal humana (por ejemplo, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, nefropatía asociada al VIH, enfermedad renal poliquística, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada a lupus sistémico y similares), esclerosis sistémica progresiva (PSS), colangitis esclerosante primaria (PSC), fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, enfermedad crónica de injerto contra huésped, esclerodermia (local y sistémica), oftalmopatía de Graves, retinopatía diabética, glaucoma, enfermedad de Peyronie, fibrosis del pene, uretostenosis después de cistoscopia, adherencia interna después de cirugía, cicatrización, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis peritoneal de una etiología conocida, ergotismo inducido por fármacos, fibrosis conducente a cáncer benigno o maligno, fibrosis conducente a infección microbiana (por ejemplo, viral, bacteriana, parasítica, fúngica, etc.), enfermedad de Alzheimer, fibrosis conducente a enfermedad inflamatoria del intestino (que incluye formación de constricción en enfermedad de Crohn y colitis microscópica), tumores de células del estroma, mucositis, fibrosis inducida por productos químicos o agresiones medioambientales (por ejemplo, quimioterapia para el cáncer, pesticidas o radiación (por ejemplo, radioterapia para el cáncer)).

En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la fibrosis está seleccionado de esclerodermia sistémica o local,

queloides, cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, reestenosis, inflamación pulmonar y fibrosis, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis como resultado de infección crónica por hepatitis B o C, enfermedad renal, enfermedad cardíaca resultante de tejido cicatricial, degeneración macular y retinopatía retiniana y vítrea. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la fibrosis resulta de fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por la radiación y lesiones y quemaduras. En algunas realizaciones, el trastorno o afección relacionada con la fibrosis resulta de cicatrización post-quirúrgica, por ejemplo, tras trabeculectomía u otra cirugía de filtración del ojo.

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es un trastorno de hipersensibilidad tal como aquellos mediados por respuestas Th1 o Th2. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para los trastornos de hipersensibilidad también se describe en la solicitud provisional de EE.UU. N.º: 61/209.795. Los trastornos relacionados con la hipersensibilidad que pueden ser susceptibles a tratamiento con SAP incluyen, pero no se limitan a, rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico en la producción de moco en los pulmones, eccema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxis, neumonitis y asma alérgica.

En algunas realizaciones, una variante de SAP u oligómero de SAP de la invención puede usarse para tratar respuestas inmunitarias específicas de alérgenos tales como anafilaxis, a diversos antígenos, que incluyen, pero no se limitan a, antimicrobianos (por ejemplo, cefalosporinas, sulfonamidas, penicilina y otras β -lactamas), anticonvulsivos (por ejemplo, fenitoína, fenobarbital, carbamazepina, dapsona, alopurinol y minociclina), quimioterapéuticos (por ejemplo, taxanos, compuestos de platino, asparaginasas y epipodofilotoxinas), heparina, insulina, protamina, aspirina y otros fármacos antiinflamatorios no esteroideos, relajantes musculares (por ejemplo, succinilcolina, atracurio, vecuronio y pancuronio), agentes de inducción (por ejemplo, barbitúricos, etomidato, propofol), narcóticos (por ejemplo, fentanilo, meperidina, morfina), coloides para la expansión del volumen intravascular, materiales de radiocontraste, hemoderivados, látex, productos animales, caspa de animal, ácaros del polvo, insectos (por ejemplo, mordeduras, picaduras o veneno), cosméticos, metales (por ejemplo, níquel, cobalto y cromato), plantas, esporas, polen, alimento (por ejemplo, leche, huevos, trigo, soja, cacahuetes y frutos secos de árbol, marisco), vacunación y antígenos fúngicos (por ejemplo, especies de *Aspergillus*, *Curvularia*, *Exserohilum* y *Alternaria*).

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es un trastorno autoinmunitario tal como aquellos mediados por respuestas Th1 o Th2. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para trastornos autoinmunitarios también se describe en la solicitud provisional de EE.UU. N.º: 61/209.845. Trastornos relacionados autoinmunitarios que pueden ser susceptibles al tratamiento con SAP incluyen, pero no se limitan a, diabetes tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmune, pénfigo, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmune, artritis crónica de Lyme, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad del injerto contra el huésped.

En algunas realizaciones, el trastorno sensible a SAP es una mucositis. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la mucositis también se describe en la solicitud de EE.UU. N.º: 12/217.614. Los procedimientos descritos en el presente documento pueden ser útiles para tratar mucositis oral, esofágica y gastrointestinal, además de úlceras gástricas y duodenales, o erosiones del estómago y esófago.

En algunas realizaciones, una variante de SAP u oligómero de SAP puede usarse para tratar una enfermedad inflamatoria. En algunas realizaciones, la enfermedad inflamatoria puede ser una infección viral, bacteriana, fúngica o parasítica. El uso de SAP como tratamiento terapéutico para la infección viral también se ha descrito en la patente de EE.UU. 6.406.698 y en la solicitud PCT WO1997/026906.

Preparaciones y formulaciones farmacéuticas

En ciertos aspectos, la divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden uno o más agentes terapéuticos de SAP (es decir, variantes de SAP y oligómeros de SAP) formulados para administración. Los agentes terapéuticos de la invención pueden formularse de un modo convencional usando uno o más vehículos o excipientes fisiológicamente aceptables. Por ejemplo, agentes terapéuticos y sus sales y solvatos fisiológicamente aceptables pueden formularse para administración por, por ejemplo, inyección (por ejemplo, SubQ, IM, IP), inhalación o insuflación (tanto por la boca como la nariz) o administración oral, bucal, sublingual, transdérmica, nasal, parenteral o rectal. En ciertas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden administrarse localmente, en el sitio en el que las células diana están presentes, es decir, en un tejido, órgano o líquido específico (por ejemplo, sangre, líquido cefalorraquídeo, masa tumoral, etc.).

La presente invención proporciona además el uso de cualquier variante de SAP u oligómero de SAP de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento o prevención de un trastorno o una afección, como se ha descrito en el presente documento, en un paciente, por ejemplo, el uso de una variante de SAP u oligómero de SAP en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno o afección descrita en el presente documento. En algunos aspectos, cualquier variante de SAP u oligómero de SAP de la invención puede usarse para preparar una preparación farmacéutica para uso en el tratamiento o prevención de una enfermedad o afección descrita en el presente documento.

Los agentes terapéuticos pueden formularse para una variedad de modos de administración, que incluyen administración sistémica y tópica o localizada. Las técnicas y formulaciones generalmente puede encontrarse en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, PA. Para administración parenteral, se prefiere inyección, que incluye intramuscular, intravenosa, intraperitoneal y subcutánea. Para inyección, los compuestos pueden formularse en disoluciones líquidas, preferentemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como disolución de Hank o disolución de Ringer. Además, los compuestos pueden formularse en forma sólida y redisolverse o suspenderse inmediatamente antes de uso. También están incluidas formas liofilizadas. En algunas realizaciones, los agentes terapéuticos pueden administrarse a células mediante una variedad de procedimientos conocidos para aquellos conocidos en la materia, que incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogeles, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas.

Para administración por vía oral, las composiciones farmacéuticas pueden tomar la forma de, por ejemplo, comprimidos, pastillas para chupar, o cápsulas preparadas mediante medios convencionales con excipientes farmacéuticamente aceptables tales como aglutinantes (por ejemplo, almidón de maíz pregelatinizado, polivinilpirrolidona o hidroxipropilmetilcelulosa); cargas (por ejemplo, lactosa, celulosa microcristalina o hidrogenofosfato de calcio); lubricantes (por ejemplo, estearato de magnesio, talco o sílice); disgregantes (por ejemplo, almidón de patata o glicolato sódico de almidón); o agentes humectantes (por ejemplo, laurilsulfato de sodio). Los comprimidos pueden recubrirse por procedimientos muy conocidos en la técnica. Preparaciones líquidas para administración por vía oral pueden tomar la forma de, por ejemplo, disoluciones, jarabes o suspensiones, o pueden presentarse como un producto seco para constitución con agua u otro vehículo adecuado antes de uso. Tales preparaciones líquidas pueden prepararse mediante medios convencionales con aditivos farmacéuticamente aceptables tales como agentes de suspensión (por ejemplo, jarabe de sorbitol, derivados de celulosa o grasas comestibles hidrogenadas); agentes emulsionantes (por ejemplo, lecitina o goma arábiga); vehículos no acuosos (por ejemplo, aceite de almendra, ésteres aceitosos, alcohol etílico o aceites vegetales fraccionados); y conservantes (por ejemplo, p-hidroxibenzoatos de metilo o propilo o ácido sórbico). Las preparaciones también pueden contener sales tampón, aromatizantes, colorantes y edulcorantes, según convenga. Las preparaciones para administración por vía oral pueden formularse adecuadamente para dar la liberación controlada del compuesto activo.

Para administración por inhalación (por ejemplo, administración pulmonar), los agentes terapéuticos pueden administrarse convenientemente en forma de una presentación de espray en aerosol de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor apropiado, por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado. En el caso de un aerosol presurizado, la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para administrar una cantidad dosificada. Pueden formularse cápsulas y cartuchos de gelatina, por ejemplo, para su uso en un inhalador o insuflador, que contienen una mezcla en polvo del compuesto y una base en polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

En los procedimientos de la invención, los compuestos farmacéuticos también pueden administrarse por vías intranasales o intrabronquiales que incluyen insuflación, polvos y formulaciones en aerosol (por ejemplos, de inhalantes de esteroides, véase Rohatagi (1995) J. Clin. Pharmacol. 35:1187-1193; Tjwa (1995) Ann. Allergy Asthma Immunol. 75:107-111). Por ejemplo, pueden disponerse formulaciones en aerosol en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse como productos farmacéuticos para preparaciones no presurizadas tales como en un nebulizador o un atomizador. Normalmente, tal administración es en un tampón acuoso farmacológicamente aceptable.

Pueden prepararse composiciones farmacéuticas adecuadas para administración respiratoria (por ejemplo, intranasal, inhalación, etc.) de polipéptidos de SAP de variante en tanto forma sólida como líquida.

Pueden formularse variantes de SAP u oligómeros de SAP de la invención para administración parenteral mediante inyección, por ejemplo, mediante inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección pueden presentarse en forma de dosificación unitaria, por ejemplo, en ampollas o en recipientes multi-dosis, con un conservante añadido. Las composiciones pueden adoptar formas tales como suspensiones, disoluciones o emulsiones en vehículos aceitosos o acuosos y pueden contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Alternativamente, el principio activo puede estar en forma de polvo para constitución con un vehículo adecuado, por ejemplo, agua libre de pirógenos estéril, antes de uso.

Además, también pueden formularse variantes de SAP u oligómeros de SAP de la invención como preparación de depósito. Tales formulaciones de acción prolongada pueden administrarse por implantación (por ejemplo subcutáneamente o intramuscularmente) o mediante inyección intramuscular. Así, por ejemplo, pueden formularse agentes terapéuticos con materiales poliméricos o hidrófobos adecuados (por ejemplo, como una emulsión en un aceite aceptable) o resinas de intercambio iónico, o como derivados moderadamente solubles, por ejemplo, como sal moderadamente soluble. La fórmula de liberación controlada también incluye parches.

En ciertas realizaciones, los compuestos descritos en el presente documento pueden formularse para administración al

sistema nervioso central (SNC) (revisado en Begley, *Pharmacology & Therapeutics* 104: 29-45 (2004)). Enfoques convencionales para la administración de fármacos al SNC incluyen: estrategias neuroquirúrgicas (por ejemplo, inyección intracerebral o infusión intracerebroventricular); manipulación molecular del agente (por ejemplo, producción de una proteína de fusión quimérica que comprende un péptido de transporte que tiene una afinidad por una molécula de la superficie de células endoteliales en combinación con un agente que es él mismo incapaz de cruzar la barrera hematoencefálica en un intento por explotar una de las vías de transporte endógenas de la barrera hematoencefálica); estrategias farmacológicas diseñadas para aumentar la solubilidad de lípidos de un agente (por ejemplo, conjugación de agentes solubles en agua con vehículos de lípido o de colesterol); y la rotura transitoria de la integridad de la BBB por rotura hiperosmótica (resultante de la infusión de una disolución de manitol en la arteria carótida o el uso de un agente biológicamente activo tal como un péptido de angiotensina).

En ciertas realizaciones, las variantes de SAP u oligómeros de SAP de la invención se incorporan en una formulación tópica que contiene un vehículo tópico que es generalmente adecuado para la administración tópica de fármacos y que comprende cualquier material de este tipo conocido en la técnica. El vehículo tópico puede seleccionarse de manera que se proporcione la composición en la forma deseada, por ejemplo, como una pomada, loción, crema, microemulsión, gel, aceite, disolución, o similares y puede comprender un material que tanto existe de forma natural como es de origen sintético. Es preferible que el vehículo seleccionado no afecte adversamente el agente activo u otros componentes de la formulación tópica. Ejemplos de vehículos tópicos adecuados para su uso en el presente documento incluyen agua, alcoholes y otros disolventes orgánicos no tóxicos, glicerina, aceite mineral, silicona, vaselina, lanolina, ácidos grasos, aceites vegetales, parabenos, ceras y similares.

Las composiciones farmacéuticas (incluyendo preparaciones cosméticas) pueden comprender de aproximadamente el 0,00001 al 100 %, tal como del 0,001 al 10 % o del 0,1 % al 5 % en peso de una o más de las variantes de SAP u oligómeros de SAP descritos en el presente documento. En ciertas formulaciones tópicas, el agente activo está presente en una cantidad en el intervalo de aproximadamente el 0,25 % en peso al 75 % en peso de la formulación, preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,25 % en peso al 30 % en peso de la formulación, más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 0,5 % en peso al 15 % en peso de la formulación y lo más preferentemente en el intervalo de aproximadamente el 1,0 % en peso al 10 % en peso de la formulación.

Las afecciones del ojo pueden tratarse o prevenirse, por ejemplo, por inyección sistémica, tópica, intraocular de agentes terapéuticos, o por inserción de un dispositivo de liberación sostenida que libera agentes terapéuticos. Las variantes de SAP u oligómeros de SAP de la invención pueden administrarse en un vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable, de forma que el compuesto se mantenga en contacto con la superficie ocular durante un periodo de tiempo suficiente para permitir que el compuesto penetre en las regiones córneas e internas del ojo, como, por ejemplo, la cámara anterior, conjuntiva, cámara posterior, cuerpo vítreo, humor acuoso, humor vítreo, cornea, iris/ciliar, cristalino, coroides/retina y esclerótica. El vehículo oftálmico farmacéuticamente aceptable puede, por ejemplo, ser una pomada, aceite vegetal o un material de encapsulamiento. Alternativamente, los compuestos pueden inyectarse directamente en el humor vítreo y acuoso. En otra alternativa, los compuestos pueden administrarse sistémicamente, tal como por infusión o inyección intravenosa, para el tratamiento del ojo.

Los agentes terapéuticos descritos en el presente documento pueden almacenarse en un entorno libre de oxígeno según procedimientos en la materia.

Composiciones a modo de ejemplo comprenden una variante de SAP u oligómero de SAP con uno o más vehículos farmacéuticamente aceptables y opcionalmente, otros componentes terapéuticos. El (Los) vehículo(s) deben ser "farmacéuticamente aceptables" en el sentido de ser compatibles con los otros componentes de la composición y no provocar un efecto perjudicial inaceptable en el sujeto. Tales vehículos se describen en el presente documento o son de otro modo muy conocidos para aquellos expertos en la materia de la farmacología. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de pirógenos y son adecuadas para administración a un paciente humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de irritantes y son adecuadas para administración a un paciente humano. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas están libres de alérgenos y son adecuadas para administración a un paciente humano. Las composiciones pueden prepararse por cualquiera de los procedimientos muy conocidos en la técnica de la farmacia.

En algunas realizaciones, una variante de SAP u oligómero de SAP se administra en una formulación de liberación con el tiempo, por ejemplo, en una composición que incluye un polímero de liberación lenta. Puede prepararse una variante de SAP u oligómero de SAP con vehículos que protegerá contra la rápida liberación. Ejemplos incluyen un vehículo de liberación controlada, tal como un polímero, sistema de administración microencapsulado o gel bioadhesivo. Alternativamente, puede lograrse la administración prolongada de una variante de SAP u oligómero de SAP incluyendo en la composición agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, hidrogeles de monoestearato de aluminio y gelatina.

Se conocen en la técnica procedimientos para administrar compuestos de ácido nucleico (véase, por ejemplo, Akhtar et al., 1992, *Trends Cell Bio.*, 2, 139; y *Delivery Strategies for Antisense' Oligonucleotide Therapeutics*, ed. Akhtar, 1995;

Sullivan et al., publicación PCT N.º: WO 94/02595). Estos protocolos pueden utilizarse para la administración de prácticamente cualquier compuesto de ácido nucleico. Los compuestos de ácido nucleico pueden administrarse a las células mediante una variedad de procedimientos conocidos para aquellos familiarizados con la materia, que incluyen, pero no se limitan a, encapsulación en liposomas, por iontoforesis, o por incorporación en otros vehículos, tales como hidrogel, ciclodextrinas, nanocápsulas biodegradables y microesferas bioadhesivas. Alternativamente, la combinación de ácido nucleico/vehículo se administra localmente por inyección directa o por el uso de una bomba de infusión. Otras vías de administración incluyen, pero no se limitan a, administración oral (forma de comprimido o píldora) y/o intratecal (Gold, 1997, Neuroscience, 76, 1153-1158). Otros enfoques incluyen el uso de diversos sistemas de transporte y de vehículo, por ejemplo, mediante el uso de conjugados y polímeros biodegradables. Para una revisión completa sobre las estrategias de administración de fármacos véase Ho et al., 1999, Curr. Opin. Mol. Ther., 1, 336-343 y Jain, Drug Delivery Systems: Technologies and Commercial Opportunities, Decision Resources, 1998 y Groothuis et al., 1997, J. NeuroVirology, 3, 387-400. Descripciones más detalladas de la liberación y administración de ácidos nucleicos se proporcionan en Sullivan et al., arriba, Draper et al., documento PCT WO93/23569, Beigelman et al., publicación PCT N.º: WO99/05094 y Klimuk et al., publicación PCT N.º: WO99/04819.

Los siguientes ejemplos sirven para describir más completamente el modo de uso de la invención anteriormente descrita, además de exponer los mejores modos contemplados para llevar a cabo diversos aspectos de la invención. Se entiende que estos ejemplos no sirven de ninguna forma para limitar el alcance real de la presente invención, sino que se presentan para fines ilustrativos.

Ejemplificación

20 Ejemplo 1: Variantes de SAP resistentes a la agregación mediada por calcio.

Se expresó una variante de SAP humano recombinante (rhSAP) que comprendía una sustitución E167Q de aminoácidos, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1, en células CHO y se purificó del medio de cultivo de células CHO. La agregación mediada por calcio de la variante de rhSAP se comparó entonces con la de una muestra correspondiente de rhSAP silvestre. Se añadieron cantidades graduales de calcio a tanto una disolución de variante de rhSAP E167Q como rhSAP silvestre (cada una a una concentración de SAP de 4,4 mg/ml) y la cantidad de agregación de SAP se observó midiendo la absorbancia de la disolución a 600 nm en un espectrofotómetro. La Figura 1 demuestra que la variante de rhSAP E167Q es significativamente más resistente a la agregación mediada por calcio que rhSAP silvestre.

La farmacocinética (PK) de la variante de rhSAP E167Q también se comparó con una muestra correspondiente de rhSAP silvestre. Se administraron ratas (dosis de 1 mg/kg i.v. por rata, n=3) con tanto la variante de rhSAP E167Q como una muestra correspondiente de rhSAP silvestre. Durante las siguientes veinticuatro horas, las ratas se evaluaron para concentración plasmática ($\mu\text{g/ml}$) de proteína SAP. La Figura 2 demuestra que la variante de rhSAP E167Q tiene una semivida en plasma similar a la de rhSAP silvestre.

En otro experimento, se usó un bioensayo *in vitro* para determinar la actividad relativa de la variante de rhSAP E167Q. En este ensayo, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) enriquecidas en monocitos con concentraciones variables de tanto la variante de rhSAP E167Q como hSAP durante 96 horas. Tras esta incubación, los sobrenadantes de cultivo resultantes se extrajeron y se ensayaron por ELISA para cuantificar la cantidad de quimiocina derivada de macrófagos (MDC) que se produjo. La MDC se produce por fibrocitos y por tanto, un indicador de la diferenciación de monocitos en fibrocitos. Comparando la concentración inhibitoria, el 50 % (CI_{50}) de la muestra, con el patrón de referencia de hSAP puede determinarse la potencia relativa de una variante de SAP. El resultado se expresa como una relación de CI_{50} de la muestra frente al patrón de referencia de hSAP.

Todas las muestras y patrones de SAP se diluyeron inicialmente a una concentración de 1,0 mg/ml en Supplemented FibroLife Media. Los patrones de SAP se diluyeron sucesivamente para generar concentraciones de patrón de trabajo de 60, 30, 20, 13,4, 8,8, 6,0, 3,0, 1,5 y 0,75 $\mu\text{g/ml}$ (concentración patrón final de 30, 15, 10, 6,7, 4,4, 3,0, 1,5, 0,75 y 0,375 $\mu\text{g/ml}$). Véase la siguiente Tabla 1

Concentración patrón de rhSAP de trabajo ($\mu\text{g/ml}$)	Volumen de patrón	Volumen de medios FibroLife suplementados
60	60 (1 mg/ml)	940
30	600 (60 $\mu\text{g/ml}$)	600
20	800 (30 $\mu\text{g/ml}$ de patrón)	400
13,4	800 (20 $\mu\text{g/ml}$ de patrón)	400
8,8	800 (13,4 $\mu\text{g/ml}$ de patrón)	400

6,0	800 (8,8 µg/ml de patrón)	400
3,0	600 (6,0 µg/ml de patrón)	600
1,5	600 (3,0 µg/ml de patrón)	600
0,75	600 (1,5 µg/ml de patrón)	600

Para preparar el ensayo de ELISA, se diluyó el anticuerpo de captura (es decir, ratón anti-MDC humana) a la concentración de trabajo en PBS sin proteína transportadora. El anticuerpo de captura diluido se usó para recubrir placas de 96 pocillos y a continuación cada placa se selló y se incubó durante la noche a temperatura ambiente. Antes de usar las placas recubiertas, cada pocillo se aspiró y se lavó con tampón de lavado, repitiéndose el proceso dos veces durante un total de tres lavados. Las placas se bloquearon a continuación añadiendo 300 µl de reactivo diluyente a cada pocillo e incubando a temperatura ambiente durante una hora. Después de la incubación se repitió el procedimiento de aspiración y lavado de pocillos.

Para el ensayo de ELISA, se añadieron muestras de 100 µl de cualquiera de los sobrenadantes de los cultivos de monocitos/fibroblastos o los patrones de SAP a cada pocillo. La placa se incubó a continuación a temperatura ambiente durante 2 horas antes de aspirar y lavar los pocillos. A continuación se añadieron 100 µl de una disolución de trabajo de estreptavidina-HRP a cada pocillo. La placa se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente antes de añadir 50 µl de disolución de parada a cada pocillo. Inmediatamente, la densidad óptica de cada pocillo se midió usando un lector de microplacas establecido a 450 nm. Si la corrección de la longitud de onda estuvo disponible, el lector de microplacas se estableció a 540 nm o 570 nm. Si la corrección de la longitud de onda no estuvo disponible, entonces las lecturas a 540 nm o 570 nm se restaron de las lecturas a 450 nm. Esta resta corrige las imperfecciones ópticas en la placa.

La Figura 3 demuestra que la variante de rhSAP E167Q es al menos tan biológicamente activa como rhSAP silvestre.

Ejemplo 2: Variantes de SAP desglucosiladas tienen semivida en plasma y actividad biológica alteradas

Se expresó una variante de SAP humano recombinante (rhSAP) que comprendía una sustitución N32D de aminoácidos, con respecto a la secuencia de SEC ID NO: 1, en células CHO y se purificó del medio de cultivo de células CHO. Esta mutación altera el sitio consenso de N-glicosilación y así previene la unión de glucanos enlazados en N a SAP en esa posición. En paralelo, se trató hSAP silvestre con una sialidasa para eliminar todos los restos de ácido siálico unidos al polipéptido SAP (es decir, asialo hSAP). Se compararon tanto rhSAP N32D tratado como asialo hSAP con una muestra correspondiente de rhSAP en un ensayo PK para medir la estabilidad en suero *in vivo* (Figura 4). Aunque la PK de rhSAP N32D fue ligeramente reducida en comparación con SAP silvestre, la semivida de rhSAP N32D fue sustancialmente superior a la de la asialo hSAP. La variante de rhSAP N32D se comparó adicionalmente con una muestra correspondiente de hSAP derivado del suero usando un bioensayo *in vitro* para determinar la actividad relativa de estas proteínas (Figura 3). Estos datos indican que la variante N32D de SAP mantiene una semivida en plasma y actividad comparable a hSAP silvestre.

Ejemplo 3: Unión covalente de PEG a SAP.

Se unió covalentemente un SAP humano recombinante (rhSAP) a un derivado de metoxi-PEG activado de 20 kDa (PEG). El resto de PEG se unió a un grupo de amina primaria de rhSAP según el siguiente protocolo y como se ilustra en la Figura 5. Primero, se disolvió aproximadamente 1 mg de metoxi-PEG-éster succinimidilcarboximetílico de 20 kDa (número de catálogo de JenKem: M-SCM-20K) por mg de rhSAP en una disolución de 20 mg/ml de rhSAP. Se dejó que la reacción de acoplamiento avanzara durante 24 horas a temperatura ambiente. El hSAP PEGilado resultante se purificó de los componentes de reacción por cromatografía de intercambio aniónico. Las fracciones de la columna de cromatografía se reunieron y se concentraron (Figura 6). rhSAP PEGilado preparado por este procedimiento contuvo de 1-3 PEG/protómeros de 20 kDa, siendo 1 PEG/protómero la forma más abundante, como se evalúa por SDS-PAGE.

Se ensayaron rhSAP PEGilado y SAP derivado de suero humano (hSAP) para bioactividad usando un bioensayo *in vitro*. En este ensayo, se incubaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) enriquecidas en monocitos con concentraciones variables de tanto rhSAP PEGilado como hSAP durante 96 horas. Tras esta incubación, se eliminaron los sobrenadantes de cultivo resultantes y se ensayaron por ELISA para cuantificar la cantidad de quimiocina derivada de macrófagos (MDC) que se produjo. La MDC se produce por fibroblastos y por tanto, un indicador de diferenciación de monocitos en fibroblastos. Comparando la concentración inhibitoria, el 50 % (CI₅₀) de la muestra, con el patrón de referencia de hSAP puede determinarse la potencia relativa de una variante de SAP. El resultado se expresa como una relación de CI₅₀ de la muestra frente al patrón de referencia de hSAP como se describe en los ejemplos precedentes.

La variante de rhSAP PEGilado tuvo una relación de CI₅₀ de 0,24 en comparación con una muestra correspondiente de hSAP, demostrando así que el rhSAP PEGilado tiene actividad comparable a SAP silvestre.

Aunque se han tratado realizaciones específicas de la materia, la memoria descriptiva anterior es ilustrativa y no

restrictiva. Muchas variaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia tras la revisión de esta memoria descriptiva y las reivindicaciones enumeradas más adelante. El alcance completo de la invención debe determinarse por referencia a las reivindicaciones.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una variante del amiloide P del suero (SAP) que comprende cinco protómeros de SAP, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 90 % idéntica a SEC ID NO: 1 y en la que uno o más de los protómeros de SAP comprenden un aminoácido en la posición 32 de SEC ID NO: 1 que no es asparagina (N).
2. La variante de SAP de la reivindicación 1, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95 % idéntica a SEC ID NO: 1.
3. La variante de SAP de la reivindicación 1, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 97 % idéntica a SEC ID NO: 1.
- 10 4. La variante de SAP de la reivindicación 1, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 98 % idéntica a SEC ID NO: 1.
5. La variante de SAP de la reivindicación 1, en la que cada uno de los protómeros de SAP tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 99 % idéntica a SEC ID NO: 1.
- 15 6. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que uno o más de los protómeros de SAP están sustancialmente libres de glucanos enlazados en N y enlazados en O.
7. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que el protómero de SAP comprende un aspartato (D), una glutamina (Q) o un glutamato (E) en la posición 32 de SEC ID NO: 1.
8. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que la variante de SAP es más resistente a la escisión por proteasas que una muestra correspondiente de SAP humano derivado del suero.
- 20 9. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en la que la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 144 de SEC ID NO: 1 que no es fenilalanina (F).
10. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en la que la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 145 de SEC ID NO: 1 que no es aspartato (D).
- 25 11. La variante de SAP de la reivindicación 9, en la que el protómero de SAP comprende una leucina (L), isoleucina (I), valina (V) o alanina (A) en la posición 144 de SEC ID NO: 1.
12. La variante de SAP de la reivindicación 10, en la que el protómero de SAP comprende un glutamato (E) en la posición 145 de SEC ID NO: 1.
13. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 12, en la que la variante de SAP es más resistente a la auto-agregación dependiente del calcio que una muestra correspondiente de SAP humano no variante.
- 30 14. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 13, en la que la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende un aminoácido en la posición 167 de SEC ID NO: 1 que no es glutamato (E).
15. La variante de SAP de la reivindicación 14, en la que el protómero de SAP comprende un aspartato (D), asparagina (N), glutamina (Q), alanina (A) o histidina (H) en la posición 167 de SEC ID NO: 1.
- 35 16. La variante de SAP de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, en la que la variante de SAP comprende al menos un protómero de SAP que comprende uno o más aminoácidos que están covalentemente unidos a uno o más polímeros inertes.
17. La variante de SAP de la reivindicación 16, en la que al menos uno de los polímeros inertes es un resto de polietilenglicol (PEG).
- 40 18. La variante de SAP de la reivindicación 17, en la que el resto de PEG está unido a al menos un residuo de glutamina (Q) nativa o variante de SEC ID NO: 1.
19. La variante de SAP de la reivindicación 18, en la que el resto de PEG está unido a una glutamina (Q) en la posición 32 de SEC ID NO: 1.
20. La variante de SAP de la reivindicación 16, en la que al menos uno de los polímeros inertes es un resto de dextrano.
- 45 21. La variante de SAP de la reivindicación 20, en la que el resto de dextrano está unido a al menos un residuo de glutamina (Q) nativa o variante de SEC ID NO: 1.

22. La variante de SAP de la reivindicación 21, en la que el resto de dextrano está unido a una glutamina (Q) en la posición 32 de SEC ID NO: 1.
23. Un oligómero de SAP covalentemente reticulado que comprende al menos dos pentámeros de SAP, en el que cada uno de los pentámeros de SAP comprende una variante de SAP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22.
- 5 24. El oligómero de SAP covalentemente reticulado de la reivindicación 23, en el que los pentámeros de SAP están covalentemente unidos mediante uno o más reticulantes químicos.
25. Una preparación farmacéutica adecuada para uso en un mamífero que comprende la variante de SAP u oligómero de SAP covalentemente reticulado de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.
- 10 26. La variante de SAP según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 22, el oligómero de SAP covalentemente reticulado según una cualquiera de las reivindicaciones 23 a 24 o la preparación farmacéutica según la reivindicación 25 para uso en el tratamiento o prevención de un trastorno o afección fibrótica o fibroproliferativa, un trastorno o afección de hipersensibilidad, un trastorno o afección autoinmune, una afección ocular, o mucositis en un paciente.

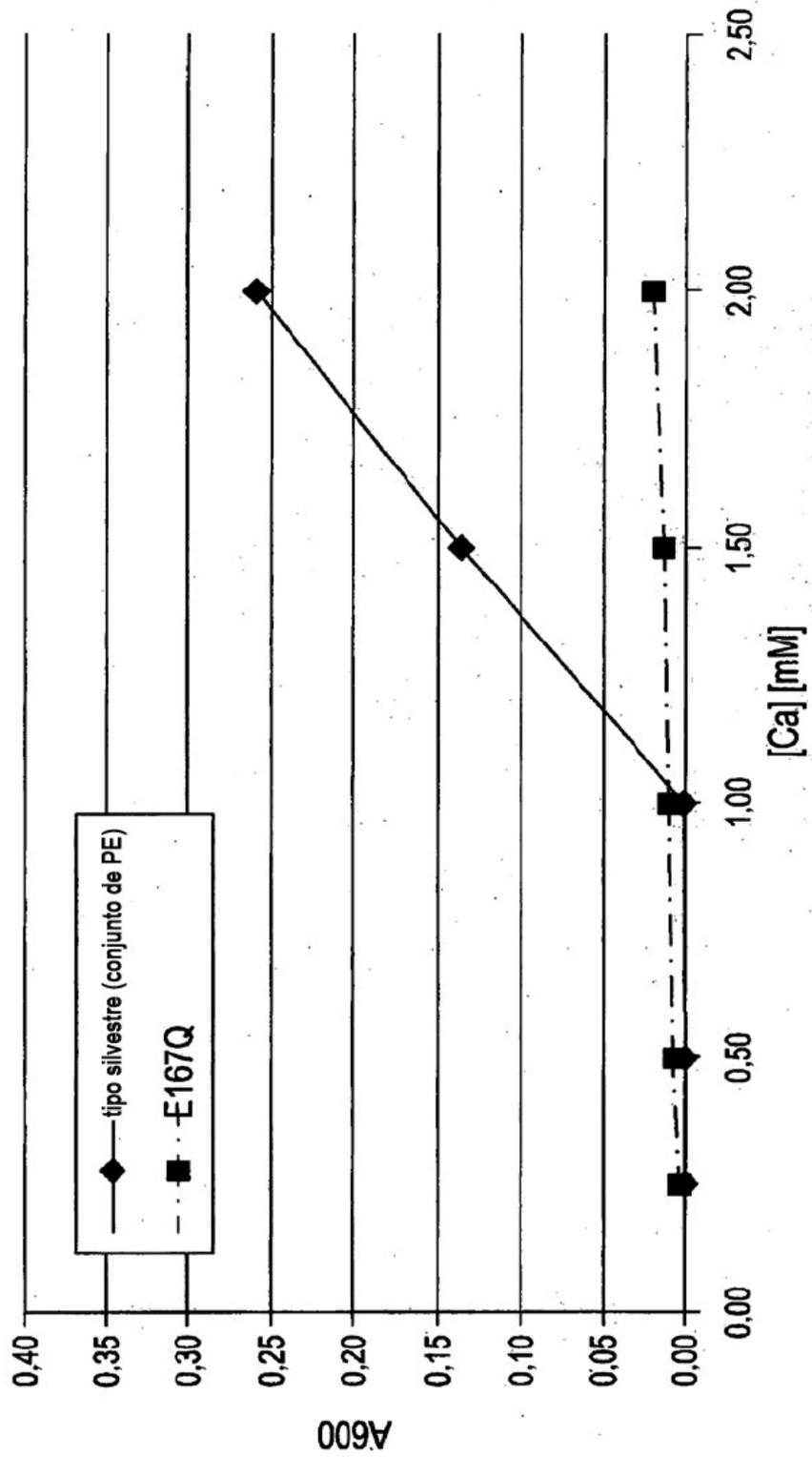


FIGURA 1

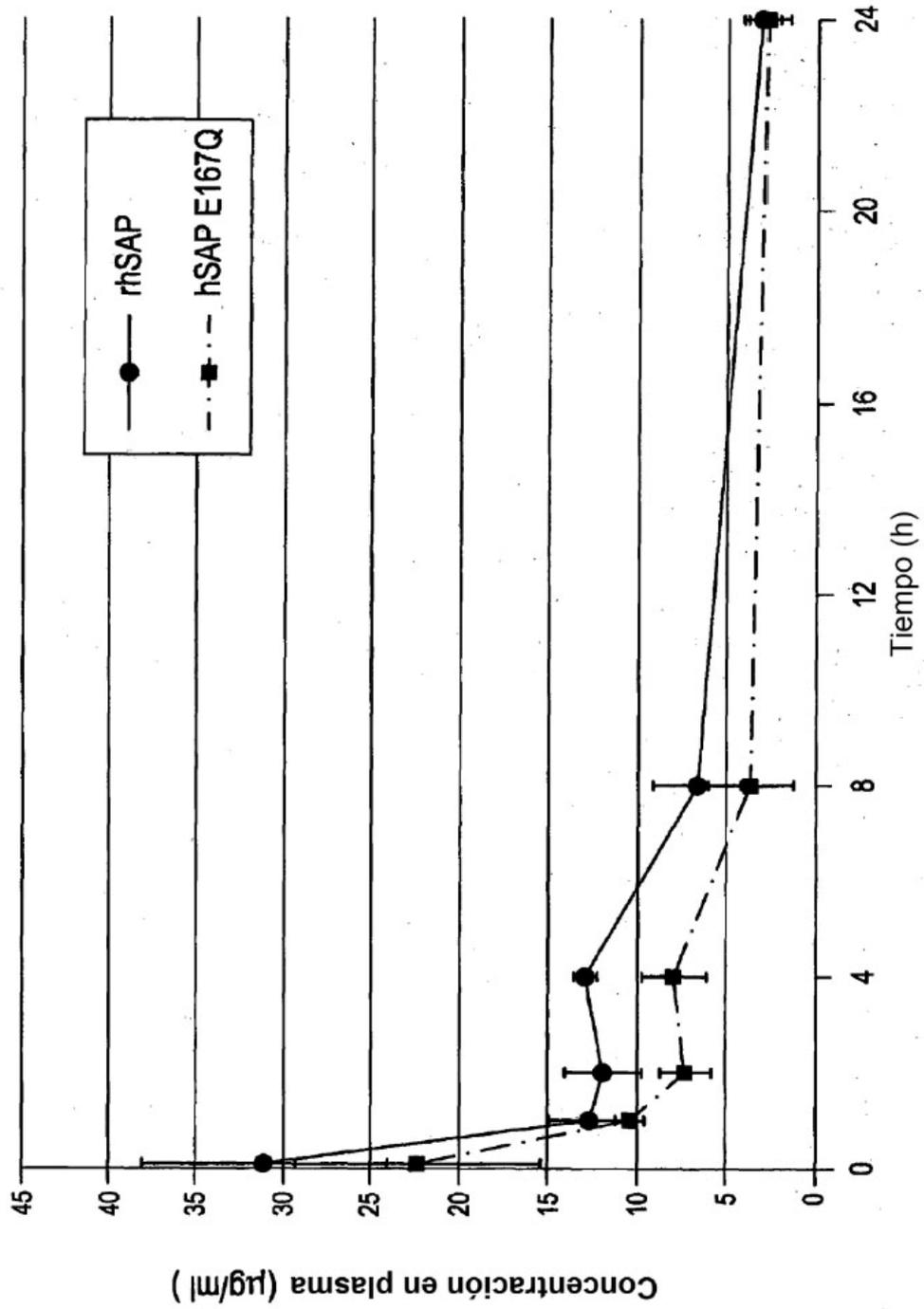


FIGURA 2

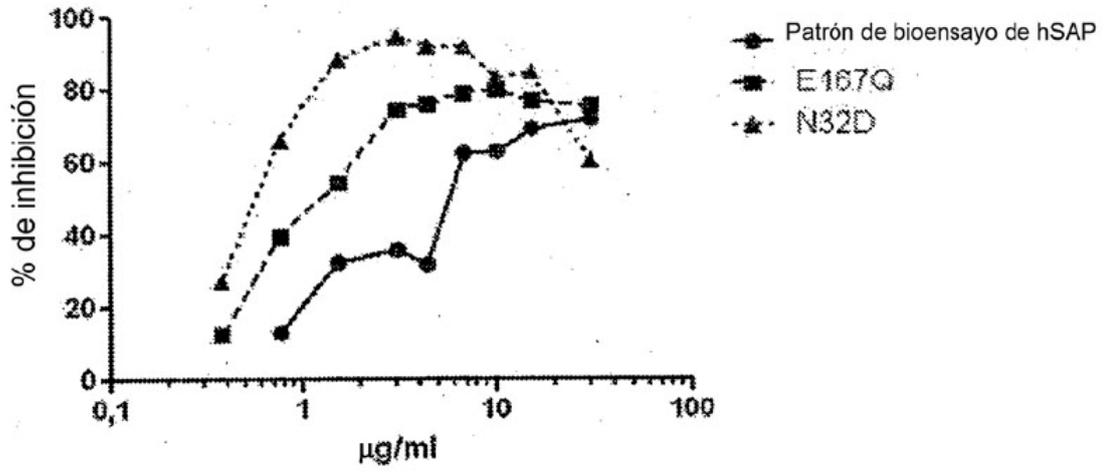


FIGURA 3

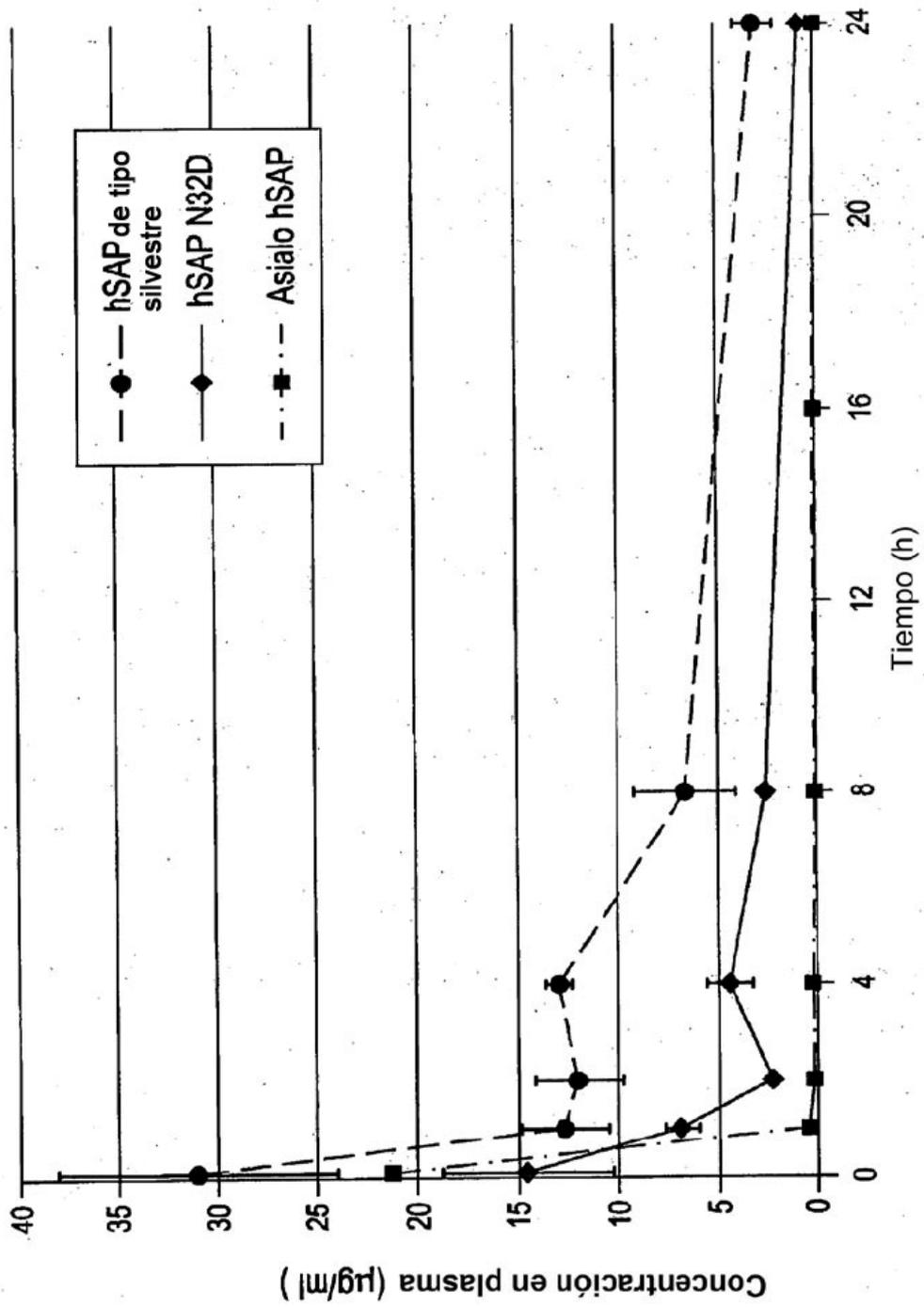


FIGURA 4

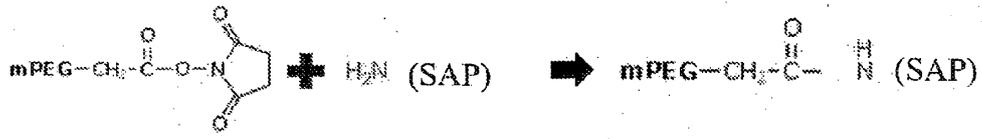


FIGURA 5

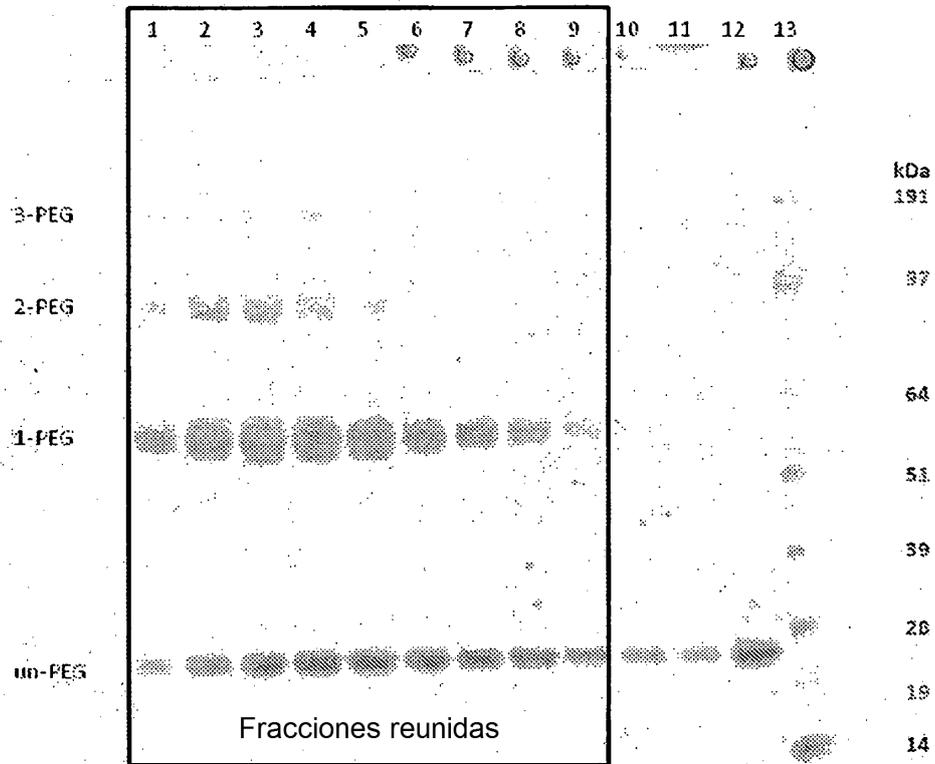


FIGURA 6