(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 647 351**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/24	(2006.01)	***A61K 39/00***	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01)	***A61K 49/00***	(2006.01)
C07K 14/51	(2006.01)	***C07K 14/705***	(2006.01)
C07K 16/18	(2006.01)		
A61K 38/00	(2006.01)		
A61K 39/395	(2006.01)		
A61K 39/44	(2006.01)		
C07K 14/78	(2006.01)		
C12N 9/96	(2006.01)		
G01N 33/53	(2006.01)		

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **07.12.2009** **E 16159226 (6)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.09.2017** **EP 3059247**

(54) Título: **Péptidos de unión a SPARC y usos de los mismos**

(30) Prioridad:

05.12.2008 US 120228 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.12.2017

(73) Titular/es:

ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC (100.0%)
11755 Wilshire Boulevard, Suite 2000
Los Angeles, CA 90025, US

(72) Inventor/es:

TRIEU, VUONG

(74) Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

ES 2 647 351 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

Péptidos de unión a SPARC y usos de los mismos

Reivindicación de prioridad

Esta solicitud reivindica los derechos de prioridad de la Solicitud Provisional de los Estados Unidos n.º 61/120.228, presentada el 5 de diciembre de 2008.

Antecedentes de la invención

La proteína secretada acídica y rica en cisteínas (SPARC), también conocida como osteonectina, es una glucoproteína de 303 aminoácidos que se expresa en el cuerpo humano. La expresión de SPARC está regulada por el desarrollo, estando expresada SPARC predominantemente en tejidos que experimentan remodelación durante el desarrollo normal o en respuesta a lesiones. Véase, por ejemplo, Lane et al., FASEB J., 8, 163-173 (1994). Por ejemplo, se expresan altos niveles de proteína SPAR en los huesos y dientes en desarrollo, principalmente en osteoblastos, odontoblastos, fibroblastos pericondriales y condrocitos en diferenciación en embriones murinos, bovinos y humanos. SPARC también desempeña papeles importantes en las interacciones con la matriz celular durante la remodelación de tejidos, la reparación de heridas, la morfogénesis, la diferenciación celular, la migración celular y la angiogénesis, incluyendo los casos donde estos procesos se asocian con estados patológicos. Por ejemplo, SPARC se expresa en la fibrosis intersticial renal e interviene en la respuesta del hospedador a lesiones pulmonares, tales como la fibrosis pulmonar inducida por bleomicina.

SPARC se expresa diferencialmente en tumores y en su estroma adyacente en diversos cánceres en comparación con el tejido normal, dependiendo el patrón del tipo de cáncer. Por lo tanto, no hay un modelo unificado que explique todas las facetas de su función y contribución al desarrollo y la progresión del cáncer. En un patrón, se ha notificado una expresión aumentada de SPARC en cáncer de mama (Bellahcene y Castronovo, 1995; Jones et al., 2004; Lien et al., 2007; Porter et al., 1995), melanoma (Ledda et al., 1997a) y glioblastomas (Rempel et al., 1998). La expresión aumentada de SPARC desempeña un papel en la promoción o progresión tumoral en estos cánceres.

Por consiguiente, la sobreexpresión de SPARC en la inflamación y en algunos cánceres hace que SPARC sea una diana potencial para diagnósticos y terapias.

Breve sumario de la invención

La invención proporciona composiciones para suministrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un sitio de enfermedad en un mamífero, que comprenden una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico de una composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado a un péptido de unión a SPARC ("SBP") y un vehículo farmacéuticamente aceptable ("composiciones de la invención"), incluyendo cuando el SBP comprende una o más de las SEQ ID NO: 1 o 2.

Las realizaciones particularmente preferidas incluyen, por ejemplo, composiciones de la invención para suministrar un agente terapéutico a un sitio de enfermedad en un mamífero, que comprenden uno o más SBP, en donde el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio Fc de anticuerpo funcional, incluyendo, por ejemplo, en donde el dominio Fc de anticuerpo funcional comprende la SEQ ID NO: 118.

También se divulgan composiciones para suministrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un sitio de enfermedad en una composición para mamíferos, por ejemplo, en donde el SBP comprende: al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-112 y 117. Preferentemente, el SBP puede estar formado por al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-112 y 117. Otras composiciones incluyen composiciones, por ejemplo, en donde hay dos o más SBP separados, en donde cada SBP individual comprende al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-112 y 117, preferentemente una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-5. Las realizaciones incluyen composiciones, por ejemplo, en donde hay dos o más SBP separados, en donde los SBP individuales están formados por una o más de las SEQ ID NO: 1 o 2.

También se divulgan composiciones para suministrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un sitio de enfermedad en un mamífero, que comprenden una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico de una composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado a un SBP, un vehículo farmacéuticamente aceptable y un vehículo farmacéuticamente aceptable, que además comprende un péptido de unión a albúmina ("ABP"), en donde el ABP comprende la SEQ ID NO: 119 o la SEQ ID NO: 120 o tanto la SEQ ID NO: 119 como la 120. Dichas composiciones incluyen casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en el mismo polipéptido y casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en diferentes polipéptidos.

También se divulgan métodos para suministrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un sitio de enfermedad en un mamífero, que comprenden una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico de una

composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado a un péptido de unión a SPARC y un vehículo farmacéuticamente aceptable, en donde el SBP comprende las SEQ ID NO: 1-117. Dichos métodos incluyen métodos en donde en las composiciones, por ejemplo, el SBP comprende: al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-112 y 117, más preferentemente de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-5 y 117.

También se divulgan métodos, por ejemplo, en donde hay dos o más SBP separados, en donde los SBP individuales están formados por una o más de las SEQ ID NO: 1-117. La invención también proporciona métodos inventivos, en donde hay dos o más polipéptidos separados formados cada uno por al menos un SBP y en donde los SBP comprenden al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-112.

Los métodos de la invención particularmente preferidos incluyen composiciones, por ejemplo, en donde el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo que comprende un dominio Fc de anticuerpo funcional, tal como en donde el fragmento de anticuerpo comprende la SEQ ID NO: 118. Dichos métodos de acuerdo con la invención incluyen, por ejemplo, casos en donde el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo que media una o más de activación de complemento, citotoxicidad mediada por células, inducción de la apoptosis, inducción de la muerte celular y opsonización.

Los métodos divulgados en el presente documento también incluyen péptidos de unión a albúmina sérica ("ABP") que comprenden las SEQ ID NO: 119 o 120 o tanto SEQ ID NO: 119 como la 120. Los métodos incluyen además, por ejemplo, tanto casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en el mismo polipéptido como casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en diferentes polipéptidos. Sin embargo, el SBP también puede estar formado por al menos 10 aminoácidos consecutivos de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-112.

Las composiciones de la invención y los métodos de la invención proporcionados pueden emplearse en casos donde el sitio de enfermedad es un tumor y en donde el mamífero es un paciente humano.

Breve descripción de las diversas vistas de los dibujos

La FIG. 1 representa el concepto general de fusionar un péptido de unión a un agente terapéutico o de diagnóstico. En el ejemplo representado en este dibujo, el agente terapéutico es un dominio Fc de anticuerpo.

La FIG. 2 representa la estrategia general para la exploración iterativa de una biblioteca de presentación en fagos.

La FIG. 3 representa las secuencias identificadas después de explorar una biblioteca de presentación en fagos de péptidos respecto de la unión a SPARC por el número de veces que se aísla la secuencia.

La FIG. 4 representa las secuencias identificadas después de explorar una biblioteca de presentación en fagos de péptidos respecto de la unión a SPARC por la avidez de la unión a SPARC (indicada por la DO).

La FIG. 5 representa la clonación de cualquiera de los péptidos PD 15 o PD21 en el vector pFUSE-hIgG1-Fc2 para dar proteína de fusión PD15 o PD21 Fc.

La FIG. 6 demuestra la secuencia de ADN resultante de la clonación de las secuencias que codifican en péptido 15 y el péptido 21 en el vector pFUSE-hIgG1-Fc2 para codificar proteínas de fusión péptido-Fc.

La FIG. 7 representa las proteínas de fusión expresadas y purificadas PD 15-Fc y PD 21-Fc en electroforesis en gel de poliacrilamida.

La FIG. 8 representa la ProtoArray usada para definir la unión fuera de la diana de PD15 y PD21.

La FIG. 9 es una gráfica de ensayos de unión ELISA que compara la avidez de la unión a SPARC por PD 15 y PD 21 con la de un anticuerpo anti-SPARC.

La FIG. 10 representa fotomicrografías de estudios inmunohistológicos llevados a cabo en secciones de un tumor humano, que demuestran expresión tumoral de SPARC con un anticuerpo anti-SPARC (Anti-SPARC de R&D). El anticuerpo de control negativo anti-Herceptin (solo fragmento Fc) y una proteína de fusión de péptido de unión a Estabilina-Fc (stab-Fc) no tiñen el tumor.

La FIG. 11 representa la tinción histológica de un tumor que expresa SPARC, que demuestra la unión de PD 15 y PD 21 a las células del tumor que expresan SPARC.

La FIG. 12 representa un sitio de unión a SPARC potencial en la elastina.

La FIG. 13 representa la actividad antitumoral de PD 15 y PD 21 en un sistema modelo de cáncer de próstata humano/ratón desnudo.

La FIG. 14 representa la actividad antitumoral de PD 15 y PD 21 en un sistema modelo de cáncer de mama humano/ratón desnudo.

La FIG. 15 representa dos polipéptidos de scFv, ScFv 3-1 y ScFv 3-2, con actividad de unión a SPARC.

La FIG. 16 representa dos polipéptidos de scFv, ScFv 2-1 y ScFv 2-2, con actividad de unión a SPARC.

Descripción detallada de la invención

Los SBP y los ABP son "dominios de ligando peptídico". La expresión "dominio de ligando peptídico" significa una secuencia de aminoácidos que puede existir sola y/o dentro de una secuencia de polipéptido más grande y que se une a otra biomolécula con especificidad. Por ejemplo, el principal sistema de transporte sanguíneo para ácidos grasos, bilirrubina, triptófano, calcio, hormonas esteroideas y otros compuestos fisiológicamente importantes, implica la unión de estas biomoléculas a la albúmina sérica. La unión de estas biomoléculas se produce en sitios discretos en las secuencias de aminoácidos de la albúmina, es decir, en dominios de ligando peptídico en la albúmina sérica.

La invención proporciona composiciones para suministrar un agente terapéutico o de diagnóstico a un sitio de enfermedad en un mamífero, que comprenden una cantidad eficaz desde el punto de vista terapéutico o de diagnóstico de una composición farmacéutica que comprende el agente terapéutico o de diagnóstico acoplado a un péptido de unión a SPARC ("SBP") y un vehículo farmacéuticamente aceptable ("composiciones de la invención" y "métodos de la invención"). La presente invención incluye composiciones y métodos en donde el SBP comprende un péptido con la secuencia de una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1 o 2.

El término "homólogo" significa un polipéptido que tiene sustancialmente la misma secuencia de aminoácidos que la secuencia original y que muestra propiedades relevantes que son sustancialmente similares a las propiedades mostradas por la secuencia original. Un ejemplo de una de dichas propiedades es la capacidad para modular la distribución tisular de un agente activo, en donde un homólogo de las SEQ ID NO: 1-117 podría ser capaz de proporcionar un nivel de modulación sustancialmente similar al proporcionado por las SEQ ID NO: 1-117. En este contexto, por ejemplo y de manera deseable, un homólogo de las SEQ ID NO: 1-117 que muestre dicha modulación sustancialmente similar proporcionaría un nivel en sangre del agente activo de al menos aproximadamente un 80%, preferentemente al menos aproximadamente un 85%, más preferentemente al menos aproximadamente un 90% y, aún más preferentemente, al menos aproximadamente un 95%, en relación con el proporcionado por las SEQ ID NO: 1-117. Como alternativa, el término "homólogo" también se refiere a, por ejemplo, una secuencia de péptido de al menos 6 aminoácidos consecutivos, preferentemente de al menos 7 aminoácidos consecutivos, más preferentemente, de al menos 8 aminoácidos consecutivos, aún más preferentemente, de al menos 9 aminoácidos consecutivos y, aún más preferentemente, de al menos 10 aminoácidos consecutivos, de una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-112, siendo lo más deseable una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1-5.

Las composiciones y métodos divulgados en el presente documento también incluyen ABP que comprenden las SEQ ID NO: 119 o 120 o tanto la SEQ ID NO: 119 como la 120 y homólogos de las mismas. Los métodos incluyen además, por ejemplo, tanto casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en el mismo polipéptido como casos en donde el SBP y el ABP se encuentran en diferentes polipéptidos.

En el contexto de los cambios en relación con la secuencia original, un homólogo de una secuencia original será deseablemente al menos aproximadamente un 80% idéntico a la secuencia original, preferentemente, será al menos un 90% idéntico a la secuencia original, aún más preferentemente, será al menos aproximadamente un 95% idéntico a la secuencia original y, aún más preferentemente, será al menos un 99% idéntico a la secuencia original.

Tal como se usa en el presente documento, el "porcentaje de identidad de secuencia" significa el valor determinado al comparar dos secuencias alineadas de manera óptima a lo largo de una ventana de comparación. Además, la porción de la secuencia de polipéptido en la ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para conseguir un alineamiento óptimo de las dos secuencias. El porcentaje se calcula determinando el número de posiciones en las que aparece el resto de aminoácido idéntico en ambas secuencias para dar el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación y multiplicando el resultado por 100 para dar el porcentaje de identidad de secuencia. Preferentemente, el alineamiento óptimo se lleva a cabo usando el algoritmo de alineamiento de homología de Needleman y Wunsch (1970) J. Mol. Biol. 48:443 453.

También es deseable que en los casos donde los homólogos no contienen aminoácidos idénticos, las mutaciones den como resultado únicamente cambios de aminoácidos conservativos. Por consiguiente, las posiciones de restos que no son idénticas difieren de tal modo que ciertos restos de aminoácido se sustituyen por otros restos de aminoácido con propiedades químicas similares (por ejemplo, carga o hidrofobia) y, por lo tanto, no cambian las propiedades funcionales de la molécula. Cuando las secuencias difieren en sustituciones conservativas, puede ajustarse al alza la identidad de secuencia para corregir respecto de la naturaleza conservativa de la sustitución. Se dice que las secuencias que difieren en dichas sustituciones conservativas tienen "similitud de secuencia" o

"similitud". Los medios para hacer este ajuste se conocen bien por los expertos en la técnica.

Para ilustrar adicionalmente lo que se entiende por una sustitución o cambio de aminoácido "conservativo", a continuación se listan los grupos A-F. El reemplazo de un miembro de los siguientes grupos por otro miembro del mismo grupo se considera una sustitución "conservativa".

El grupo A incluye leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilalanina, serina, cisteína, treonina y aminoácidos modificados que tienen las siguientes cadenas laterales: etilo, isobutilo, $-CH_2CH_2OH$, $-CH_2CH_2CH_2OH$, $-CH_2CHOHCH_3$ y $-CH_2SCH_3$.

El grupo B incluye glicina, alanina, valina, serina, cisteína, treonina y un aminoácido modificado que tiene una cadena lateral de etilo.

El grupo C incluye fenilalanina, fenilglicina, tirosina, triptófano, ciclohexilmetilo y restos de aminoácido modificados que tienen cadenas laterales sustituidas con bencilo o fenilo.

El grupo D incluye ácido glutámico, ácido aspártico, un éster alifático, aromático o bencílico sustituido o sin sustituir del ácido glutámico o aspártico (por ejemplo, metilo, etilo, n-propilo, iso-propilo, ciclohexilo, bencilo o bencilo sustituido), glutamina, asparagina, glutamina o asparagina CO-NH-alquilada (por ejemplo, con metilo, etilo, n-propilo e isopropilo) y aminoácidos modificados que tienen la cadena lateral $-(CH_2)_3COOH$, un éster de los mismos (éster alifático, aromático o bencílico sustituido o sin sustituir), una amida de los mismos y una amida N-alquilada sustituida o sin sustituir de los mismos.

El grupo E incluye histidina, lisina, arginina, N-nitroarginina, p-cicloarginina, g-hidroxiarginina, N-amidinocitrulina, ácido 2-amino guanidinbutanoico, homólogos de lisina, homólogos de arginina y ornitina.

El grupo F incluye serina, treonina, cisteína y aminoácidos modificados que tienen cadenas laterales alquilo C1-C5 lineales o ramificadas sustituidas con -OH o -SH.

También se describen composiciones que comprenden una molécula conjugada, comprendiendo la molécula conjugada un dominio de ligando peptídico conjugado con un agente activo, en donde el dominio de ligando peptídico comprende hasta aproximadamente 50 aminoácidos adicionales, preferentemente hasta aproximadamente 25 aminoácidos adicionales, más preferentemente hasta aproximadamente 15 aminoácidos adicionales y, aún más preferentemente, hasta aproximadamente 10 aminoácidos adicionales, añadidos al extremo amino o carboxilo o a ambos extremos. Los polipéptidos resultantes, que están de acuerdo con la invención, incluyen polipéptidos que tienen una longitud total menor de 50, menor de 40, menor de 30, menor de 25 o menor de 20 aminoácidos.

También se describen composiciones que comprenden una molécula conjugada, comprendiendo la molécula conjugada un SBP conjugado con un agente activo, en donde hay uno o múltiples SBP que comprenden una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-137, 141-143 y, aún más deseablemente, una cualquiera o más de las SEQ ID NO: 1, 2 y 135-137, 141-143.

También se describen polinucleótidos aislados que codifican polipéptidos que tienen la secuencia de aminoácidos de dominio de unión a ligando peptídico, entre los que se incluyen aquellos con dichos aminoácidos adicionales añadidos a los extremos amino y/o carboxilo.

II. Métodos para producir péptidos de acuerdo con la invención

Los polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico proporcionados por la presente invención pueden sintetizarse, detectarse, cuantificarse y purificarse usando tecnologías conocidas. Por ejemplo, pueden generarse células que expresan polipéptidos que contienen dominio de unión a ligando peptídico exógeno colocando un ADNc bajo el control de un promotor fuerte/inicio de la traducción e introducirse el vector por transfección o transformación en células procariotas o eucariotas adecuadas para dirigir la expresión de los polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico mediante métodos de sobra conocidos por los expertos en la materia. Como alternativa, los polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico pueden producirse químicamente mediante métodos de sobra conocidos por los expertos en la materia.

Los polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico pueden prepararse mediante síntesis en fase sólida convencional. Como se sabe generalmente, pueden prepararse péptidos de la longitud necesaria usando equipos y reactivos disponibles en el mercado siguiendo las instrucciones de los fabricantes para bloquear grupos interferentes, proteger el aminoácido que se vaya a hacer reaccionar, acoplar, desproteger y tapar los restos que no hayan reaccionado. Pueden obtenerse equipos adecuados, por ejemplo, de Applied Biosystems, Foster City, CA o de Biosearch Corporation en San Raphael, CA.

Por ejemplo, los péptidos se sintetizan usando protocolos de síntesis en fase sólida automatizada convencionales empleando t-butoxicarbonil-alfa-aminoácidos con protección adecuada de la cadena lateral. El péptido terminado se

retira del soporte de fase sólida con desprotección simultánea de la cadena lateral usando el método convencional de fluoruro de hidrógeno. Los péptidos en bruto se purifican adicionalmente mediante HPLC en fase reversa semi-preparativa (Vydac C18) usando gradientes de acetonitrilo en ácido trifluoroacético (TFA) al 0,1%. Los péptidos se secan al vacío para retirar el acetonitrilo y se liofilizan a partir de una solución de TFA al 0,1% en agua. La pureza se verifica mediante RP-HPLC analítica. Los péptidos pueden liofilizarse y después solubilizarse en agua o ácido acético 0,01 M a concentraciones en peso de 1-2 mg/ml.

El uso de los métodos sintéticos anteriormente mencionados es necesario en caso de estar presentes en los péptidos aminoácidos no codificados o las formas D de los aminoácidos. Sin embargo, para péptidos que están codificados génicamente, también puede recurrirse a las técnicas recombinantes que usan secuencias de ADN fácilmente sintetizadas en sistemas de expresión disponibles en el mercado.

La presente divulgación proporciona un vector recombinante que comprende los elementos que controlan la expresión de una secuencia de polinucleótido que codifica un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico. También se divulga en el presente documento una célula que comprende un ácido nucleico que codifica un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico, en donde la célula es una célula procariota o una célula eucariota. Los métodos de cultivo microbiano y tisular son de sobra conocidos por los expertos en la materia (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001), págs. 16.1-16.54). Por lo tanto, se divulga un método para producir polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico que comprenden: (a) transformar células con un ácido nucleico que codifica el polipéptido de la reivindicación 1; (b) inducir la expresión del polipéptido por las células transformadas; y (c) purificar el polipéptido.

La expresión de proteínas es dependiente del nivel de transcripción de ARN, que a su vez está regulado por señales del ADN. De forma análoga, la traducción de ARNm requiere de, por lo menos, un codón de iniciación AUG, que normalmente está ubicado dentro de una distancia de 10 a 100 nucleótidos del extremo 5' del mensaje. Se ha demostrado que las secuencias que flanquean al codón iniciador AUG influyen en su reconocimiento. Por ejemplo, para su reconocimiento por ribosomas eucariotas, los codones iniciadores AUG incluidos en secuencias acordes a una secuencia "consenso de Kozak" perfecta dan como resultado una traducción óptima (véase, por ejemplo, Kozak, J. Molec. Biol. 196: 947-950 (1987)). Asimismo, la expresión exitosa de un ácido nucleico exógeno en una célula puede requerir la modificación postraduccional de una proteína resultante.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento comprenden preferentemente una región codificante unida operablemente a un promotor adecuado, por ejemplo, un promotor funcional en células eucariotas. Pueden usarse promotores víricos, tales como, sin limitación, el promotor de RSV y el promotor tardío principal de adenovirus. Los promotores no víricos adecuados incluyen, pero sin limitación, el promotor de fosfoglicerocinasa (PGK) y el promotor del factor de elongación 1α. Los promotores no víricos son deseablemente promotores humanos. También pueden unirse a o insertarse en el ácido nucleico de la invención y las construcciones elementos genéticos adecuados adicionales, muchos de los cuales se conocen en la técnica, para proporcionar funciones, un nivel de expresión o un patrón de expresión adicionales.

Además, las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden unirse operablemente a potenciadores para facilitar la transcripción. Los potenciadores son elementos de ADN que actúan en cis que estimulan la transcripción de genes adyacentes. Los ejemplos de potenciadores que confieren un alto nivel de transcripción a los genes unidos en varios tipos celulares diferentes de muchas especies incluyen, sin limitación, el potenciador de SV40 y el RSV-LTR. Dichos potenciadores pueden combinarse con otros potenciadores que tienen efectos específicos del tipo celular o puede emplearse cualquier potenciador individualmente.

Para optimizar la producción de proteínas en células eucariotas, la molécula de ácido nucleico puede comprender además un sitio de poliadenilación a continuación de la región codificante de la molécula de ácido nucleico. Asimismo, preferentemente, todas las señales de transcripción adecuadas (y las señales de traducción, en su caso) estarán dispuestas correctamente de tal forma que el ácido nucleico exógeno se exprese de manera adecuada en las células en las que se introduce. Si se desea, el ácido nucleico exógeno también puede incorporar sitios de corte y empalme (es decir, sitios aceptores de corte y empalme y sitios donantes de corte y empalme) para facilitar la producción de ARNm a la vez que se mantiene un transcrito de longitud completa en fase. Además, las moléculas de ácido nucleico pueden comprender además las secuencias adecuadas para el procesamiento, la secreción, la localización intracelular y similares.

Las moléculas de ácido nucleico pueden insertarse en cualquier vector adecuado. Los vectores adecuados incluyen, sin limitación, vectores víricos. Los vectores víricos adecuados incluyen, sin limitación, vectores retrovíricos, alfavíricos, de vaccinia, adenovíricos, de virus adenoasociados, de herpesvirus y del virus de la viruela aviar. Los vectores tienen preferentemente una capacidad natural o introducida por ingeniería genética para transformar células eucariotas, por ejemplo, células CHO-K1. Además, los vectores pueden ser vectores de ácido nucleico "desnudo" (es decir, vectores que tienen una cantidad escasa o nula de proteínas, azúcares y/o lípidos que los encapsulan), tales como plásmidos o episomas, o los vectores pueden estar formando complejos con otras moléculas. Otras moléculas que pueden combinarse de manera adecuada con los ácidos nucleicos incluyen, sin

limitación, envueltas víricas, lípidos catiónicos, liposomas, poliaminas, partículas de oro y restos de direccionamiento, tales como ligandos, receptores o anticuerpos que se dirigen a moléculas celulares.

Las moléculas de ácido nucleico descritas en el presente documento pueden transformarse encualquier célula adecuada, típicamente una célula eucariota, tal como, por ejemplo, CHO, HEK293 o BHK, dando como resultado deseablemente la expresión de un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico, tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende las SEQ ID NO: 1-120 u homólogos del mismo, como se describe en el presente documento. La célula puede cultivarse para permitir la expresión de la molécula de ácido nucleico y, por lo tanto, la producción del polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico tal como, por ejemplo, un polipéptido que comprende la secuencia de aminoácidos de las SEQ ID NO: 1-120 u homólogos del mismo, como se describe en el presente documento.

Por consiguiente, en el presente documento se divulga una célula transformada o transfectada con una molécula de ácido nucleico descrita en el presente documento. Se conocen bien en la técnica medios para transformar o transfectar células con moléculas de ADN exógeno. Por ejemplo, sin limitación, se introduce una molécula de ADN en una célula usando técnicas de transformación o transfección estándar bien conocidas en este campo, tales como transfección mediada por fosfato de calcio o DEAE-dextrano, fusión de protoblastos, electroporación, liposomas y microinyección directa (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001), págs. 1.1-1.162, 15.1-15.53, 16.1-16.54).

Otro ejemplo de método de transformación es el método de fusión de protoplastos, donde se mezclan directamente con células de mamífero cultivadas protoplastos obtenidos de bacterias que portan altos números de copias de un plásmido de interés. Después de la fusión de las membranas celulares (normalmente con polietilenglicol), se suministran los contenidos de las bacterias al interior del citoplasma de las células de mamífero y se transfiere el ADN plasmídico al núcleo.

La electroporación, aplicación de breves pulsos de alto voltaje a una diversidad de células de mamífero y vegetales, da lugar a la formación de poros de tamaño nanométrico en la membrana plasmática. El ADN se introduce directamente en el citoplasma celular ya sea a través de estos poros o como consecuencia de la redistribución de componentes de la membrana que acompaña al cierre de los poros. La electroporación puede ser extremadamente eficaz y puede usarse tanto para la expresión transitoria de clones de genes como para el establecimiento de líneas celulares que portan copias integradas del gen de interés.

Dichas técnicas pueden usarse para la transformación tanto estable como transitoria de células eucariotas. El aislamiento de células transformadas de manera estable requiere de la introducción de un marcador de selección junto con la transformación con el gen de interés. Dichos marcadores de selección incluyen genes que confieren resistencia a la neomicina, así como el gen HPRT en células negativas para HPRT. La selección puede requerir un cultivo prolongado en medio de selección, durante al menos aproximadamente 2-7 días, preferentemente durante al menos aproximadamente 1-5 semanas (véase, por ejemplo, Sambrook y Russell, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Nueva York (2001), págs. 16.1-16.54).

Puede expresarse y purificarse un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico a partir de una célula hospedadora recombinante. Las células hospedadoras recombinantes pueden ser procariotas o eucariotas, incluyendo, sin limitación, bacterias, tales como *E. coli*, células fúngicas, tales como levaduras, células de insecto que incluyen, sin limitación, líneas celulares obtenidas de Drosophila y gusano de seda y células y líneas celulares de mamífero. Cuando se expresa un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico en una célula, por ejemplo, una célula humana, ya sea *in vitro* o *in vivo,* pueden optimizarse los codones seleccionados para dicho polinucleótido que codifica el péptido para un tipo celular dado (es decir, para una especie). Se conocen en la materia muchas técnicas para la optimización de codones (véase, por ejemplo, Jayaraj et al., Nucleic Acids Res. 33(9):3011-6 (2005); Fuglsang et al., Protein Expr. Purif. 31(2):247-9 (2003); Wu et al., “The Synthetic Gene Designer: a Flexible Web Platform to Explore Sequence Space of Synthetic Genes for Heterologous Expression,” csbw, 2005 IEEE Computational Systems Bioinformatics Conference - Workshops (CSBW'05), págs. 258-259 (2005)).

Las cuestiones que deben tenerse en consideración para una expresión de polipéptidos óptima en procariotas incluyen el sistema de expresión usado, la selección de la cepa hospedadora, la estabilidad del ARNm, el sesgo de codones, la formación de cuerpos de inclusión y la prevención, las proteínas de fusión y la proteólisis de sitio específico, y la secreción dirigida a un compartimento (véase Sorensen et al., Journal of Biotechnology 115 (2005) 113-128).

La expresión se induce normalmente a partir de un plásmido portado por un origen genético con un sistema compatible. Los elementos genéticos del plásmido de expresión incluyen un origen de replicación (ori), un marcador de resistencia a antibióticos, promotores transcripcionales, regiones de inicio de la traducción (TIR), así como terminadores transcripcionales y traduccionales.

Puede usarse cualquier sistema de expresión adecuado, por ejemplo, *Escherichia coli* facilita la expresión de

proteínas por su relativa simplicidad, cultivo a alta densidad, genética bien conocida y el gran número de herramientas compatibles, incluyendo una diversidad de plásmidos disponibles, compañeros de fusión y cepas mutantes, que se encuentran disponibles para la expresión de polipéptidos. La cepa de *E coli* o el origen genético para la expresión recombinante es altamente importante. Las cepas de expresión deben ser deficientes para la mayoría de las proteasas perjudiciales, deben mantener el plásmido de expresión de manera estable y deben conferir los elementos genéticos relevantes para el sistema de expresión (por ejemplo, DE3).

El número de copias del plásmido se controla por el origen de replicación que preferentemente replica de un modo relajado (Baneyx, 1999). El replicón ColE1 presente en los plásmidos de expresión modernos se obtiene del plásmido pBR322 (número de copias 15-20) o de la familia de plásmidos pUC (número de copias 500-700), mientras que el replicón pI5A se obtiene de pAYC184 (número de copias 10-12). Los marcadores de resistencia a fármacos más comunes en los plásmidos de expresión recombinantes confieren resistencia a la ampicilina, la kanamicina, el cloranfenicol o la tetraciclina.

Los sistemas de expresión de *E. coli* incluyen el sistema de expresión pET basado en T7 (comercializado por Novagen), promotor lambda PL/represor cI (por ejemplo, pLEX de Invitrogen), promotor Trc (por ejemplo, pTrc de Amersham Biosciences), promotor Tac (por ejemplo, pGEX de Amersham Biosciences) y lac/T5 híbrido (por ejemplo, pQE de Qiagen) y el promotor BAD (por ejemplo, pBAD de Invitrogen).

El inicio de la traducción a partir de la región de inicio de la traducción (TIR) del ARN mensajero transcrito requiere de un sitio de unión a ribosomas (RBS) que incluye la secuencia de Shine-Dalgarno (SD) y un codón de inicio de la traducción. La secuencia de Shine-Dalgarno se ubica a 7±2 nucleótidos cadena arriba del codón de inicio, que es el AUG canónico en los sistemas de expresión recombinantes eficaces. Se obtiene un inicio de la traducción óptimo a partir de ARNm con la secuencia de SD UAAGGAGG.

El uso de codones en *E. coli* se refleja por el nivel de ARNt amino-acilados afines disponibles en el citoplasma. Los codones mayoritarios aparecen en genes altamente expresados mientras que los codones minoritarios o raros tienden a encontrarse en genes expresados a bajos niveles. Normalmente, los codones raros en *E. coli* son abundantes en genes heterólogos de fuentes tales como eucariotas, arqueobacterias y otros organismos relacionados de manera distante con diferentes preferencias de frecuencia de codones (Kane, 1995). La expresión de genes que contienen codones raros puede dar lugar a errores de traducción a consecuencia del estancamiento ribosómico (ribosomal stalling) en las posiciones que requieren la incorporación de aminoácidos acoplados a ARNt para codones minoritarios (McNulty et al., 2003). Los problemas del sesgo de codones se vuelven altamente prevalentes en los sistemas de expresión recombinantes, cuando se acumulan en grandes cantidades transcritos que contienen codones raros en agrupamientos, tales como dobletes y tripletes.

La actividad de las proteínas requiere su plegamiento en estructuras tridimensionales precisas. Ciertas situaciones de estrés, tales como el choque térmico, impiden el plegamiento *in vivo* y los intermedios de plegamiento tienden a asociarse en gránulos de proteína amorfos denominados cuerpos de inclusión.

Los cuerpos de inclusión son una serie de agregados estructuralmente complejos cuya presencia se percibe con una respuesta a un estrés cuando se expresa una proteína recombinante a altas tasas. La acumulación macromolecular de proteínas a concentraciones de 200-300 mg/ml en el citoplasma de *E. coli* sugiere un ambiente para el plegamiento de proteínas altamente desfavorable, especialmente durante la expresión recombinante de alto nivel (van den Bert et al., 1999). Se desconoce si los cuerpos de inclusión se forman mediante un acontecimiento pasivo que se produce mediante interacción hidrófoba entre partes expuestas sobre cadenas no plegadas o mediante mecanismos de agrupamiento específicos (Villaverde y Carrio, 2003). Los agregados purificados pueden solubilizarse usando detergentes tales como urea y clorhidrato de guanidinio. Las proteínas nativas pueden prepararse mediante replegamiento *in vitro* a partir de cuerpos de inclusión solubilizados mediante métodos de replegamiento por dilución, diálisis o en columna (Middleberg, 2002; Sorensen et al., 2003a).

Las estrategias de replegamiento podrían mejorarse mediante la inclusión de chaperonas moleculares (Mogk et al., 2002). La optimización del procedimiento de replegamiento para una proteína dada requiere, sin embargo, de grandes inversiones de tiempo y no siempre desembocan en altos rendimientos de producto. Una posible estrategia para prevenir la formación de cuerpos de inclusión es la sobreexpresión conjunta de chaperonas moleculares.

Se ha desarrollado una gran variedad de patrones de fusión de proteínas para simplificar la purificación y expresión de proteínas recombinantes (Stevens, 2000). Las proteínas de fusión o las proteínas quiméricas incluyen normalmente un compañero o "marcador" unido a la proteína pasajera o diana a través de un sitio de reconocimiento para una proteasa específica. La mayoría de compañeros de fusión se aprovechan para estrategias específicas de purificación por afinidad. Los compañeros de fusión también son ventajosos *in vivo*, donde pueden proteger a sus pasajeros frente a la proteólisis intracelular (Jacquet et al., 1999; Martinez et al, 1995), potenciar la solubilidad (Davis et al., 1999; Kapust y Waugh, 1999; Sorensen et al., 2003b) o usarse como indicadores específicos de la expresión (Waldo et al., 1999). Normalmente, pueden transferirse altos niveles de expresión desde un compañero de fusión N-terminal a un pasajero con expresión escasa, muy probablemente debido a la estabilización del ARNm (Arechaga et al., 2003). Los marcadores de afinidad comunes son el marcador de polihistidina (marcador His), que es compatible

con la cromatografía de afinidad con metal inmovilizado (IMAC) y el marcador de glutatión S-transferasa (GST) para la purificación sobre resinas basadas en glutatión. Existen diversos marcadores de afinidad diferentes y se han revisado exhaustivamente (Terpe, 2003).

Las proteínas expresadas de forma recombinante pueden dirigirse, en principio, a tres ubicaciones diferentes, a saber, el citoplasma, el periplasma y el medio de cultivo. Hay diversas ventajas y desventajas relacionadas con el direccionamiento de una proteína recombinante a un compartimento celular específico. Normalmente, es preferible la expresión en el citoplasma ya que los rendimientos de producción son elevados. La formación de enlaces disulfuro está segregada en *E. coli* y está catalizada de manera activa en el periplasma mediante el sistema Dsb (Rietsch y Beckwith, 1998). La reducción de las cisteínas en el citoplasma se logra mediante tiorredoxina y glutarredoxina. La tiorredoxina se mantiene reducida por la tiorredoxina reductasa y la glutarredoxina por el glutatión. La molécula de bajo peso molecular del glutatión se reduce por la glutatión reductasa. La alteración de los genes trxB y gor que codifican las dos reductasas permite la formación de enlaces disulfuro en el citoplasma de *E. coli*.

Los sistemas de expresión basados en células tienen inconvenientes en cuanto a la calidad y la cantidad de las proteínas producidas y no siempre son adecuados para la producción de alto rendimiento. Muchos de estos inconvenientes pueden evitarse mediante el uso de sistemas de traducción sin células.

Se han descrito sistemas sin células para la expresión de genes y la síntesis de proteínas *in vitro* para muchos sistemas procariotas y eucariotas (véase Endo y Sawasaki, Curen Opinion in Biotechnology 2006, 17:373-380). Los sistemas eucariotas sin células, tales como el lisado de reticulocitos de conejo y el extracto de germen de trigo, se preparan a partir de un extracto en bruto que contiene todos los componentes necesarios para la traducción de moldes de ARN transcritos *in vitro*. Los sistemas eucariotas sin células usan ARN aislado sintetizado *in vivo* o *in vitro* como molde para la reacción de traducción (por ejemplo, los sistemas de lisado de reticulocitos de conejo o los sistemas de extracto de germen de trigo). Los sistemas eucariotas sin células acoplados combinan una ARN polimerasa de fago procariota con extractos eucariotas y utilizan un ADN exógeno o moldes generados por la PCR con un promotor de fago para la síntesis de proteínas *in vitro* (por ejemplo, Lisado de Reticulocitos Acoplado a TNT®).

Las proteínas traducidas usando los sistemas acoplados TNT® pueden usarse en muchos tipos de estudios funcionales. Las reacciones de transcripción/traducción acopladas a TNT® se han usado tradicionalmente para confirmar fases abiertas de lectura, estudiar mutaciones de proteínas y producir proteínas *in vitro* para estudios de unión de proteína-ADN, ensayos de actividad de proteínas o estudios de interacciones proteína-proteína. Recientemente, también se han usado proteínas expresadas usando el sistema acoplado TNT® en ensayos para confirmar interacciones de dos híbridos de levadura, llevar a cabo clonación de expresión *in vitro* (IVEC) y producir sustratos proteínicos para ensayos de actividad enzimática o de modificación de proteínas. Para un listado de citas recientes que usan los sistemas acoplados TNT® en diversas aplicaciones, visítese: www.promega.com/citations/

La transcripción y la traducción están normalmente acopladas en los sistemas procariotas; es decir, contienen una ARN polimerasa endógena o de fago, que transcribe el ARNm a partir de un molde de ADN exógeno. Después, se usa este ARN como molde para la traducción. El molde de ADN puede ser un gen clonado en un vector plasmídico (ADNc) o un molde generado por PCR(a). Se necesita un sitio de unión a ribosomas (RBS) para los moldes traducidos en sistemas procariotas. Durante la transcripción, el extremo 5' del ARNm queda disponible para su unión al ribosoma e iniciar la traducción, permitiendo que la transcripción y la traducción se produzcan simultáneamente. Hay sistemas procariotas disponibles que emplean moldes de ADN que contienen promotores procariotas (tales como lac o tac; el sistema de extracto S30 de *E. coli* para ADN circular y lineal o un promotor de ARN polimerasa de fago; el sistema de extracto T7 S30 de *E. coli* para ADN circular. La solubilidad de un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico purificado puede mejorarse mediante métodos conocidos en la técnica. Por ejemplo, para aumentar la solubilidad de una proteína expresada (por ejemplo, en *E. coli*), se puede reducir la velocidad de síntesis de la proteína reduciendo la temperatura de cultivo, usando un promotor más débil, usando un plásmido con menor número de copias, disminuyendo la concentración de inductor o cambiando el medio de crecimiento, como se describe en Georgiou y Valax (Current Opinion Biotechnol. 7:190-197(1996)). Esto disminuye la velocidad de síntesis de proteínas y normalmente se obtiene una proteína más soluble. También se pueden añadir grupos prostéticos o cofactores que son esenciales para un plegamiento adecuado o para la estabilidad de la proteína, o añadir un tampón para controlar las fluctuaciones de pH en el medio durante el cultivo, o añadir glucosa al 1 % para reprimir la inducción del promotor lac por la lactosa, que está presente en la mayor parte de los medios ricos (tales como LB, 2xYT). También pueden añadirse polioles (por ejemplo, sorbitol) al medio porque el aumento en la presión osmótica causada por estas adiciones da lugar a la acumulación de osmoprotectores en la célula, que estabilizan la estructura de la proteína nativa. Pueden añadirse etanol, tioles y disulfuros de bajo peso molecular y NaCl. Además, pueden expresarse junto con el polipéptido deseado chaperonas y/o foldasas. Las chaperonas moleculares promueven la isomerización y el direccionamiento celular adecuados, interactuando de manera transitoria con intermedios del plegamiento. Los sistemas de chaperonas de *E. coli* incluyen, pero sin limitación: GroES-GroEL, DnaK-DnaJ-GrpE, ClpB.

Las foldasas aceleran las etapas limitantes de la velocidad a lo largo de la ruta de plegamiento. Tres tipos de foldasas desempeñan un papel importante: las peptidil prolil cis/trans isomerasas (PPI), la disulfuro oxidorreductasa

(DsbA) y la disulfuro isomerasa (DsbC), la proteín disulfuro isomerasa (PDI) que es una proteína de eucariota que cataliza tanto la oxidación de cisteínas de la proteína como la isomerización de enlaces disulfuro. La coexpresión de una o más de estas proteínas con la proteína diana podría dar lugar a mayores niveles de proteína diana soluble.

Puede producirse un polipéptido que contiene domino de ligando peptídico en forma de una proteína de fusión para mejorar su solubilidad y producción. La proteína de fusión comprende un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico y un segundo polipéptido fusionados entre sí en fase. El segundo polipéptido puede ser un compañero de fusión conocido en la técnica que mejora la solubilidad del polipéptido al que está fusionado, por ejemplo, NusA, bacterioferritina (BFR), GrpE, tiorredoxina (TRX) y glutatión-S-transferasa (GST). Novagen Inc. (Madison, WI) proporciona los vectores de la serie pET 43.1 que permiten la formación de una fusión de NusA-diana. DsbA y DsbC también han mostrado efectos positivos sobre los niveles de expresión cuando se usan como compañeros de fusión y, por lo tanto, pueden usarse para fusionarse con un dominio de ligando peptídico para lograr una mayor solubilidad.

En un aspecto de dichas proteínas de fusión, el polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico expresado incluye un polipéptido enlazador que comprende un sitio de escisión de proteasa que comprende un enlace peptídico que puede hidrolizarse por una proteasa. Como resultado, el domino de ligando peptídico en un polipéptido puede separarse por proteólisis del resto del polipéptido después de su expresión. El enlazador puede comprender uno o más aminoácidos adicionales a ambos lados del enlace al que también se une el sitio catalítico de la proteasa (véase, por ejemplo, Schecter y Berger, Biochem. Biophys. Res. Commun. 27.157-62 (1967)). Como alternativa, el sitio de escisión del enlazador puede estar separado del sitio de reconocimiento de la proteasa y el sitio de escisión y el sitio de reconocimiento pueden estar separados por uno o más (por ejemplo, de dos a cuatro) aminoácidos. En un aspecto, el enlazador comprende al menos aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, aproximadamente 10, aproximadamente 20, aproximadamente 30, aproximadamente 40, aproximadamente 50 o más aminoácidos. Más preferentemente, el enlazador tiene de aproximadamente 5 a aproximadamente 25 aminoácidos de longitud y, aún más preferentemente, el enlazador tiene de aproximadamente 8 a aproximadamente 15 aminoácidos de longitud.

En las siguientes referencias se describen algunas proteasas útiles de acuerdo con la invención: Hooper et al, Biochem. J. 321: 265-279 (1997); Werb, Cell 91: 439-442 (1997); Wolfsberg et al., J. Cell Biol. 131: 275-278 (1995); Murakami y Etlinger, Biochem. Biophys. Res. Comm. 146: 1249-1259 (1987); Berg et al, Biochem. J. 307: 313-326 (1995); Smyth y Trapani, Immunology Today 16: 202-206 (1995); Talanian et al., J. Biol. Chem. 272: 9677-9682 (1997); y Thornberry et al, J. Biol. Chem. 272: 17907-17911 (1997). Las proteasas de la superficie celular también pueden usarse con enlazadores escindibles de acuerdo con la invención e incluyen, pero sin limitación: aminopeptidasa N; aminopeptidasa sensible a la puromicina; enzima convertidora de angiotensina; piroglutamil peptidasa II; dipeptidil peptidasa IV; convertasa dibásica de N-arginina; endopeptidasa 24.15; endopeptidasa 24.16; alfa, beta y gamma secretasas de la proteína precursora de amiloide; secretasa de la enzima convertidora de angiotensina; secretasa de TGF alfa; secretasa de TNF alfa; secretasa de ligando FAS; secretasas del receptor I e II de TNF; secretasa de CD30; secretasas de KL1 y KL2; secretasa del receptor de IL6; secretasa de CD43, CD44; secretasas de CD16-I y CD16-II; secretasa de L-selectina; secretasa de receptor de folato; MMP 1, 2, 3, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 y 15; activador de plasminógeno de urocinasa; activador de plasminógeno tisular; plasmina; trombina; BMP-1 (procolágeno C-peptidasa); ADAM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 y 11; y granzimas A, B, C, D, E, F, G y H.

Una alternativa a basarse en proteasas asociadas a células es el uso de un enlazador autoescindible. Por ejemplo, puede usarse como enlazador la proteasa 2A del virus de la fiebre aftosa (FMDV). Este es un polipéptido corto de 17 aminoácidos que escinde la poliproteína de FMDV en la unión 2A/2B. La secuencia del propéptido de FMDV 2A es NFDLLKLAGDVESNPGP. La escisión sucede en el extremo C-terminal del péptido en la pareja de aminoácidos glicina-prolina final y es independiente de la presencia de otras secuencias de FMDV y se escinde incluso en presencia de secuencias heterólogas.

Puede usarse cromatografía de afinidad sola o junto con técnicas cromatográficas de intercambio iónico, de exclusión por tamaños o HPLC en la purificación de polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico. Dicha estrategia cromatográfica puede llevarse a cabo usando columnas o en formatos por lotes. Dichos métodos de purificación cromatográficos se conocen bien en la técnica.

También se describen en el presente documento ácidos nucleicos aislados que codifican polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico con una o más sustituciones de aminoácidos e inserciones o eliminaciones de aproximadamente 1 a aproximadamente 5 aminoácidos, preferentemente de aproximadamente 1 a aproximadamente 3 aminoácidos, más preferentemente, 1 aminoácido, en las secuencias de las SEQ ID NO: 1-117, en donde las propiedades relevantes son sustancialmente similares a las propiedades mostradas por la secuencia original.

Puede llevarse a cabo mutagénesis mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica. Generalmente, la mutagénesis puede llevarse a cabo clonando la secuencia de ácido nucleico en un plásmido o cualquier otro vector para facilitar la manipulación de la secuencia. Después, se identifica o inserta en la secuencia de ácido nucleico un sitio de restricción único en el cual pueden añadirse ácidos nucleicos adicionales en la secuencia de ácido nucleico. Generalmente, se crea un oligonucleótido bicatenario sintético a partir de oligonucleótidos con

sentido y antisentido monocatenarios solapantes sintéticos, de tal forma que el oligonucleótido bicatenario incorpora los sitios de restricción que flanquean a la secuencia diana y, por ejemplo, puede usarse para incorporar ADN de reemplazo. El plásmido u otro vector se escinde con la enzima de restricción y se liga la secuencia de oligonucleótido que tiene extremos adherentes compatibles en el plásmido u otro vector para reemplazar al ADN original.

Los expertos en la materia conocen y pueden llevar a cabo otros medios para la mutagénesis dirigida *in vitro* (en particular, usando una reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de extensión solapada, véase, por ejemplo, Parikh y Guengerich, Biotechniques 24:428-431 (1998)). Pueden usarse cebadores complementarios que solapan con el sitio de cambio para amplificar por la PCR el plásmido completo en una mezcla que contiene dNTP 500 mM, 2 unidades de Pfu polimerasa, 250 ng de cada uno de los cebadores con sentido y antisentido y 200 ng de ADN de plásmido que comprende una secuencia que codifica el polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico. La PCR implica de manera deseable 18 ciclos con un tiempo de extensión de 2,5 minutos por cada Kb de ADN. Los productos de la PCR pueden tratarse con DpnI (que digiere únicamente el ADN de plásmido metilado en adenina) e introducirse en células de *Escherichia coli* DH5α mediante transformación. Los transformantes pueden explorarse por digestión con enzimas de restricción con respecto a la incorporación de los cambios, que después pueden confirmarse por análisis de la secuencia de ADN.

Los métodos adecuados de detección de proteínas y cuantificación de polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico incluyen transferencia de Western, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA), tinción con plata, el ensayo BCA (véase, por ejemplo, Smith et al., Anal. Biochem., 150,76-85 (1985)), el ensayo de proteínas de Lowry (descrito en, por ejemplo, Lowry et al., J. Biol. Chem., 193, 265-275 (1951)) que es un ensayo colorimétrico basado en complejos de proteína-cobre, y el ensayo de proteínas de Bradford (descrito en, por ejemplo, Bradford et al., Anal. Biochem., 72, 248 (1976)) que depende del cambio en la absorbancia del Azul de Coomassie G-250 tras su unión a proteínas. Una vez expresado, los polipéptidos que contienen dominio de ligando peptídico pueden purificarse por métodos de purificación tradicionales, tales como intercambio iónico, exclusión por tamaños o cromatografía de C18.

III. Métodos para el acoplamiento de dominios de ligando peptídico

Los métodos para el "acoplamiento" (o "conjugación" o "reticulación") de agentes activos adecuados tales como, por ejemplo, agentes terapéuticos, agentes quimioterapéuticos, radionúclidos, polipéptidos y similares, a un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico se encuentran bien descritos en la técnica. Al preparar los conjugados proporcionados en el presente documento, el agente activo se liga directa o indirectamente al dominio de ligando peptídico mediante cualquier método conocido en la actualidad en la técnica para unir dos restos, en tanto que la unión del resto de conjugación o acoplamiento al dominio de ligando peptídico no impida sustancialmente la función del dominio de ligando peptídico o impida sustancialmente la función del agente activo. El acoplamiento puede ser por cualquier medio adecuado incluyendo, pero sin limitación, enlaces iónicos y covalentes y cualquier otra asociación suficientemente estable, mediante lo cual se modulará la distribución del agente diana.

Los expertos en esta materia conocen numerosos reactivos de reticulación heterobifuncionales que se usan para formar enlaces covalentes entre grupos amino y grupos tiol y para introducir grupos tiol en las proteínas (véase, por ejemplo, Cumber et al. (1992) Bioconjugate Chem. 3':397 401; Thorpe et al. (1987) Cancer Res. 47:5924 5931; Gordon et al. (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. 84:308 312; Walden et al. (1986) J. Mol. Cell Immunol. 2:191 197; Carlsson et al. (1978) Biochem. J. 173: 723 737; Mahan et al. (1987) Anal. Biochem. 162:163 170; Wawryznaczak et al. (1992) Br. J. Cancer 66:361 366; Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584 589). Estos reactivos pueden usarse para formar enlaces covalentes entre un dominio de ligando peptídico o un polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico y cualquiera de los agentes activos divulgados en el presente documento. Estos reactivos incluyen, pero sin limitación: N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP; enlazador disulfuro); 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SPDP); succinimidiloxicarbonil-α-metil bencil tiosulfato (SMBT, enlazador de disulfato impedido); 6-[3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de succinimidilo (LC-SPDP); 4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato de sulfosuccinimidilo (sulfo-SMCC); 3-(2-piridilditio)butirato de succinimidilo (SPDB; enlazador de enlace disulfuro impedido); etil-1,3-ditiopropionato de sulfosuccinimidil 2-(7-azido-4-metilcoumarin-3-acetamida) (SAED); 7-azido-4-metilecoumarin-3-acetato de sulfo-succinimidilo (SAMCA); 6-[alfa-metil-alfa-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT); 1,4-di-[3'-(2'-piridilditio)propionamido]butano (DPDPB); 4-succinimidiloxicarbonil-α-metil-α.-(2-piridiltio)-tolueno (SMPT, enlazador disulfato impedido); 6[α.-metil-α.-(2-piridilditio)toluamido]hexanoato de sulfosuccinimidilo (sulfo-LC-SMPT); éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida (MBS); éster de m-maleimidobenzoil-N-hidroxisulfosuccinimida (sulfo-MBS); N-succinimidil(4-yodoacetil)aminobenzoato (SIAB; enlazador de tioéter); benzoato de sulfosuccinimidil(4-yodoacetil)amino (sulfo-SIAB); 4(p-maleimidofenil)butirato de succinimidilo (SMPB); sulfosuccinimidil-4-(p-maleimidofenil)butirato (sulfo-SMPB); y azidobenzoil hidrazida (ABH).

Otros gentes de acoplamiento heterobifuncionales escindibles incluyen, (4-yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo; (4-yodoacetil)-aminobenzoato de sulfosuccinimidilo; 4-succinimidil-oxicarbonil-a-(2-piridiltio)-tolueno; sulfosuccinimidil-6-[a-metil-a-(piridiltiol)toluamido]hexanoato; N-succinimidil-3-(2-piridilditio)-propionato; 6[3(-(-2-piridilditio)-propionamido]hexanoato de succinimidilo; 6[3(-(-2-piridilditio)-propionamido]hexanoato de

sulfosuccinimidilo; 3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico, S-(2-tiopiridil)-L-cisteína. Se divulgan compuestos enlazadores bifuncionales ejemplares adicionales en las Patentes de los Estados Unidos n.º 5.349.066, 5.618.528, 4.569.789, 4.952.394 y 5.137.877.

Como alternativa, por ejemplo, pueden usarse para conjugación grupos sulfhidrilo de polipéptidos. Además, los restos de azúcar unidos a glucoproteínas, por ejemplo, anticuerpos, pueden oxidarse para formar grupos aldehído útiles en una serie de procedimientos de acoplamiento conocidos en la técnica. Los conjugados formados pueden ser estables *in vivo* o lábiles, tales como enlaces de tetrapéptido degradables enzimáticamente o enlaces cis-aconitilo o hidrazona lábiles a ácidos.

El polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico está unido opcionalmente al agente activo a través de uno o más enlazadores. El resto enlazador se selecciona dependiendo de las propiedades deseadas. Por ejemplo, puede seleccionarse la longitud del enlazador para optimizar la cinética y la especificidad de la unión al ligando, incluyendo cualquier cambio conformacional inducido por la unión del ligando a un receptor diana. El resto enlazador debe ser lo suficientemente largo y flexible para permitir que el resto de ligando polipeptídico y el receptor de la célula diana interactúen libremente. En caso de que el enlazador sea demasiado corto o demasiado rígido, puede producirse impedimento estérico entre el resto de ligando polipeptídico y la toxina celular. En caso de que el resto enlazador sea demasiado largo, el agente activo puede degradarse en el proceso de producción o puede no proporcionar su efecto deseado a la célula diana de manera eficaz.

En el presente documento puede usarse cualquier enlazador adecuado conocido por los expertos en la materia. Generalmente, en los conjugados que sean proteínas de fusión se usará un conjunto de enlazadores diferente a los enlazadores en los conjugados producidos químicamente. Los enlazadores y los enlaces que son adecuados para conjugados enlazados químicamente incluyen, pero sin limitación, enlaces disulfuro, enlaces tioéter, enlaces disulfuro impedidos y enlaces covalentes entre grupos reactivos libres, tales como grupos amina y tiol. Estos enlaces se producen usando reactivos heterobifuncionales para producir grupos tiol reactivos en uno o ambos polipéptidos y después haciendo reaccionar los grupos tiol en un polipéptido con grupos tiol o grupos amina reactivos a los que pueden unirse grupos maleimido o grupos tiol reactivos en el otro. Otros enlazadores incluyen enlazadores escindibles por ácido, tales como bismaleimidoetoxi propano, conjugados de transferrina lábil a ácidos y dihidrazida del ácido adípico, que podrían escindirse en compartimentos intracelulares más ácidos; reticulantes que se escinden tras su exposición a luz UV o visible y enlazadores. En algunas realizaciones, pueden incluirse varios enlazadores para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador. Pueden insertarse enlazadores químicos y enlazadores peptídicos acoplando covalentemente el enlazador al polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico y el agente diana. Los agentes heterobifuncionales, descritos más adelante, pueden usarse para efectuar dicho acoplamiento covalente. También pueden unirse enlazadores peptídicos expresando ADN que codifica el enlazador y el dominio de ligando peptídico, el enlazador y el agente activo, o el dominio de ligando peptídico, el enlazador y el agente activo en forma de una proteína de fusión. Se contempla el uso de enlazadores flexibles y enlazadores que aumentan la solubilidad de los conjugados, ya sea solos o con otros enlazadores.

Por consiguiente, los enlazadores pueden incluir, pero sin limitación, enlaces peptídicos, enlaces de aminoácidos y péptidos, que contienen típicamente entre uno y aproximadamente 30 aminoácidos, más preferentemente entre aproximadamente 10 y 30 aminoácidos. Como alternativa, enlazadores químicos tales como reticulantes escindibles heterobifuncionales, incluyendo, pero sin limitación, (4-yodoacetil)-aminobenzoato de N-succinimidilo, (4-yodoacetil)-aminobenzoato de sulfosuccinimidilo, 4-succinimidil-oxicarbonil-a-(2-piridilditio)tolueno, sulfosuccinimidil-6-a-metil-a-(piridilditiol)-toluamido)-hexanoato, N-succinimidil-3-(-2-piridilditio)-propionato, 6(3(-(-2-piridilditio)propionamido)hexanoato de succinimidilo, 6(3(-(-2-piridilditio)propionamido)hexanoato de sulfosuccinimidilo, 3-(2-piridilditio)-propionil hidrazida, reactivo de Ellman, ácido diclorotriazínico y S-(2-tiopiridil)-L-cisteína.

Otros enlazadores incluyen enlazadores de tritilo, en particular, grupos tritilo derivatizados para generar un género de conjugados que posibilitan la liberación de agentes terapéuticos a diversos grados de acidez o alcalinidad. La flexibilidad proporcionada de esta manera por la posibilidad de preseleccionar el intervalo de pH al cual se liberará el agente terapéutico, permite la selección de un enlazador basándose en las diferencias fisiológicas conocidas entre los tejidos que necesitan el suministro de un agente terapéutico (véase, por ejemplo, la Patente de los Estados Unidos n.º 5.612.474). Por ejemplo, la acidez de los tejidos tumorales parece ser menor que la de los tejidos normales.

También pueden usarse enlazadores escindibles por ácidos, enlazadores fotoescindibles y sensibles al calor, en particular en los casos donde puede ser necesario escindir el agente diana para permitir que sea más accesible a la reacción. Los enlazadores escindibles por ácidos incluyen, pero sin limitación, bismaleimidoetoxi propano y enlazadores de dihidrazida del ácido adípico (véase, por ejemplo, Fattom et al. (1992) Infection & Immun. 60:584 589) y conjugados de transferrina lábiles a ácidos que contienen una porción suficiente de transferrina para permitir su entrada en la vía de ciclado intracelular de la transferrina (véase, por ejemplo, Welhoner et al. (1991) J. Biol. Chem. 266:4309 4314).

Los enlazadores fotoescindibles son enlazadores que se escinden tras su exposición a la luz (véase, por ejemplo,

Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104 107, liberando de este modo el agente diana tras la exposición a la luz. Se conocen enlazadores fotoescindibles que se escinden tras exponerlos a la luz (véase, por ejemplo, Hazum et al. (1981) en Pept., Proc. Eur. Pept. Symp., 16th, Brunfeldt, K (Ed), págs. 105 110, que describe el uso de un grupo nitrobencilo como grupo protector fotoescindible para la cisteína; Yen et al. (1989) Makromol. Chem 190:69 82, que describe copolímeros fotoescindibles hidrosolubles, incluyendo copolímero de hidroxipropilmetacrilamida, copolímero de glicina, copolímero de fluoresceína y copolímero de metilrodamina; Goldmacher et al. (1992) Bioconj. Chem. 3:104 107, que describe un reticulante y reactivo que sufre degradación fotolítica tras su exposición a luz del UV cercano (350 nm); y Senter et al. (1985) Photochem. Photobiol 42:231 237, que describe reactivos reticulantes de cloruro de nitrobenciloxicarbonilo que producen enlaces fotoescindibles), liberando de este modo el agente diana tras la exposición a la luz. Dichos enlazadores podrían tener un uso concreto en el tratamiento de afecciones dermatológicas u oftálmicas que pueden exponerse a la luz usando fibra óptica. Después de la administración del conjugado, puede exponerse a la luz el ojo o la piel u otra parte del cuerpo, dando como resultado la liberación del resto diana del conjugado. Dichos enlazadores fotoescindibles son útiles junto con protocolos de diagnóstico en los que es deseable retirar el agente de direccionamiento para permitir su rápida eliminación del cuerpo del animal.

IV. La invención proporciona una pluralidad de agentes activos

Los diversos aspectos de la presente invención contemplan que el polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico esté acoplado a un agente activo, es decir, un agente terapéutico o de diagnóstico.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente terapéutico" se refiere a un compuesto químico, una macromolécula biológica o un extracto producido a partir de materiales biológicos, tales como bacterias, plantas, hongos o células o tejidos animales (en particular de mamífero) que se sospecha que tienen propiedades biológicas, por ejemplo, un agente quimioterapéutico o un agente radioterapéutico. El término "terapéutico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a aliviar los efectos de, curar o prevenir (ilustrado por la prevención o la reducción de probabilidades de padecer una enfermedad concreta, por ejemplo, cáncer u otra enfermedad proliferativa) una enfermedad o afección relacionada que afecta a un sujeto mamífero. La terapia curativa se refiere a aliviar, completa o parcialmente, una enfermedad o afección existente en un mamífero.

El agente puede estar purificado, sustancialmente purificado o parcialmente purificado. Además, dicho agente terapéutico puede estar dentro de o asociado con un liposoma o un inmunoliposoma y la conjugación puede ser directamente al agente o al liposoma/inmunoliposoma. Un "liposoma" es una vesícula pequeña compuesta de varios tipos de lípidos, fosfolípidos y/o tensioactivos, que es útil para la administración de un fármaco (por ejemplo, fármacos, anticuerpos o toxinas). Los componentes del liposoma están dispuestos comúnmente en formación de bicapa, de forma similar a la disposición de lípidos de las membranas biológicas.

Los agentes terapéuticos ilustrativos que pueden acoplarse al polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico del modo contemplado por la presente invención incluyen, sin limitación, agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, docetaxel, paclitaxel, taxanos y compuestos de platino), antifolatos, antimetabolitos, antimitóticos, agentes que dañan al ADN, proapoptóticos, agentes inductores de la diferenciación, agentes antiangiogénicos, antibióticos, hormonas, péptidos, anticuerpos, inhibidores de tirosina cinasa, agentes biológicamente activos, moléculas biológicas, radionúclidos, adriamicina, antibióticos de ansamicina, asparaginasa, bleomicina, busulfán, cisplatino, carboplatino, carmustina, capecitabina, clorambucilo, citarabina, ciclofosfamida, camptotecina, dacarbazina, dactinomicina, daunorrubicina, dexrazoxano, docetaxel, doxorrubicina, etopósido, epotilonas, floxuridina, fludarabina, fluorouracilo, gemcitabina, hidroxiurea, idarrubicina, ifosfamida, irinotecán, lomustina, mecloretamina, mercaptopurina, melfalán, metotrexato, rapamicina (sirolimus), mitomicina, mitotano, mitoxantrona, nitrosourea, paclitaxel, pamidronato, pentostatina, plicamicina, procarbazina, rituximab, estreptozocina, tenipósido, tioguanina, tiotepa, taxanos, vinblastina, vincristina, vinorelbina, taxol, combretastatinas, discodermólidos, transplatino, inhibidores de tirosina cinasa (genisteína) y otros agentes quimioterapéuticos.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "agente quimioterapéutico" se refiere a un agente con actividad contra el cáncer, neoplasias y/o enfermedades proliferativas. Los agentes quimioterapéuticos preferidos incluyen docetaxel y paclitaxel en forma de partículas que comprenden albúmina en donde más del 50% del agente quimioterapéutico se encuentra en forma de nanopartícula. Aún más preferentemente, el agente quimioterapéutico comprende partículas de paclitaxel unido a albúmina, por ejemplo, Abraxane®.

Los agentes terapéuticos adecuados también incluyen, por ejemplo, agentes biológicamente activos (TNF o tTF), radionúclidos (^{131}I, ^{90}Y, ^{111}In, ^{211}At, ^{32}P y otros radionúclidos terapéuticos conocidos), agentes antiangiogénicos (inhibidores de la angiogénesis, por ejemplo, IFN-alfa, fumagilina, angiostatina, endostatina, talidomida y similares), otros polipéptidos biológicamente activos, sensibilizantes a la terapia, anticuerpos, lectinas y toxinas.

Las enfermedades adecuadas para la aplicación de la invención incluyen afecciones malignas y premalignas, así como enfermedades proliferativas, incluyendo, sin limitación, casos donde las enfermedades proliferativas son, por ejemplo, hiperplasia benigna de próstata, endometriosis, hiperplasia de endometrio, aterosclerosis, psoriasis, y una proliferación inmunológica o una glomerulopatía renal proliferativa.

Se entiende que la expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" significa una cantidad que devuelve a la normalidad, ya sea parcial o completamente, parámetros fisiológicos o bioquímicos asociados con o causantes de una enfermedad o afección. Un médico experto en la materia debería ser capaz de determinar la cantidad de la composición farmacéutica que será terapéuticamente eficaz en relación con una enfermedad o afección particular. A modo de ejemplo y de acuerdo con una realización preferida en donde el agente terapéutico es paclitaxel, la dosis de paclitaxel administrada puede variar de aproximadamente 30 mg/m^2 a aproximadamente 1000 mg/m^2 con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas (es decir, administración de la dosis de paclitaxel una vez cada aproximadamente tres semanas), deseablemente, de aproximadamente 50 mg/m^2 a aproximadamente 800 mg/m^2, preferentemente de aproximadamente 80 mg/m^2 a aproximadamente 700 mg/m^2 y, aún más preferentemente, de aproximadamente 250 mg/m^2 a aproximadamente 300 mg/m^2 con un ciclo de dosificación de aproximadamente 3 semanas, preferentemente un ciclo de aproximadamente 2 semanas, más preferentemente ciclos semanales.

La presente invención también tiene aspectos diagnósticos. Por ejemplo, el agente de diagnóstico puede ser un trazador o marcador, incluyendo, sin limitación, agentes radiactivos, agentes de contraste de IRM, agentes de contraste de rayos X, agentes de contraste de ultrasonidos y agentes de contraste de PET. También se contempla por este aspecto de la invención el acoplamiento de estos agentes, descrito en relación con los agentes terapéuticos. Además, la expresión "cantidad eficaz desde el punto de vista del diagnóstico" se refiere a una cantidad de la composición farmacéutica que, en las situaciones clínicas relevantes, permite una determinación razonablemente precisa de la presencia y/o el alcance de una actividad proliferativa, hiperplásica, de remodelación o inflamatoria anormal en tejidos y órganos. Por ejemplo, la afección "diagnosticada" de acuerdo con la invención puede ser un tumor benigno o maligno.

Los agentes de diagnóstico enseñados en el presente documento incluyen polipéptidos, tales como anticuerpos, que pueden marcarse por la unión, ya sea de manera covalente o no covalente, de una sustancia que proporciona una señal detectable. Se conocen y se ha informado exhaustivamente acerca de una gran variedad de marcadores y de técnicas de conjugación en la bibliografía tanto científica como de patentes. Los marcadores adecuados incluyen radionúclidos, enzimas, sustratos, cofactores, inhibidores, restos fluorescentes, restos quimioluminiscentes, partículas magnéticas y similares. Las patentes que enseñan el uso de dichos marcadores incluyen las Patentes de los Estados Unidos n.º 3.817.837; 3.850.752; 3.939.350; 3.996.345; 4.277.437; 4.275.149; y 4.366.241. Asimismo, pueden producirse inmunoglobulinas recombinantes, véase Cabilly, Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567; Moore, et al., Patente de los Estados Unidos n.º 4.642.334; y Queen, et al. (1989) Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 86:10029-10033.

El suministro de agentes terapéuticos o de diagnóstico a un tumor u otro sitio de enfermedad mediante las composiciones y métodos de la invención puede controlarse y medirse mediante cualquier método adecuado, incluyendo, por ejemplo, la adición de un marcador radiactivo o un marcador radio-opaco a la composición y la obtención de imágenes según sea adecuado y de sobra conocido para los expertos en la materia. El secuestro de las composiciones en el compartimento plasmático puede controlarse mediante cualquier método adecuado incluyendo, por ejemplo, venopunción.

Además, y en un aspecto relacionado, se divulga un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor a un agente quimioterapéutico, así como un método para predecir o determinar la respuesta de una enfermedad proliferativa a un agente quimioterapéutico o a un tratamiento para una enfermedad proliferativa, incluyendo, sin limitación, casos donde las enfermedades proliferativas son, por ejemplo, hiperplasia benigna de próstata, endometriosis, hiperplasia de endometrio, aterosclerosis, psoriasis, proliferación inmunológica o una glomerulopatía renal proliferativa.

V. Proteínas de fusión que acoplan dominios de ligando peptídico a agentes activos polipeptídicos

La presente invención contempla además el acoplamiento de dominios de ligando peptídico a agentes activos polipeptídicos en proteínas de fusión. Por ejemplo y sin limitación, pueden fusionarse secuencias de dominio de ligando peptídico cadena arriba o cadena abajo de dominios de proteína con utilidad diagnóstica (tales como hapteno, GFP), un sensibilizante a la terapia, dominios activos de proteína (por ejemplo, sin limitación, tTF, TNF, péptido p44 derivado de Smar1, interferón, TRAIL, Smac, VHL, procaspasa, caspasa e IL-2) o toxina (por ejemplo, sin limitación, ricina, PAP, toxina diftérica, exotoxina de pseudomonas).

Una "proteína de fusión" y un "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido que tiene al menos dos porciones unidas covalentemente entre sí, donde cada una de las porciones es un polipéptido que tiene una propiedad diferente. La propiedad puede ser una propiedad biológica, tal como actividad *in vitro* o *in vivo*. La propiedad también puede ser una propiedad química o física sencilla, tal como unión a una molécula diana, catálisis de una reacción y similares. Las porciones pueden unirse directamente mediante un solo enlace peptídico o a través de un enlazador peptídico que contiene uno o más restos de aminoácidos. Generalmente, las porciones y el enlazador se encontrarán en la misma fase de lectura.

VI. Agentes activos de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos

En un aspecto particular de la invención, el agente terapéutico puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo que media uno o más de activación de complemento, citotoxicidad mediada por células, apoptosis, muerte celular necrótica y opsonización.

El término "anticuerpo" en el presente documento incluye, sin limitación, anticuerpos monoclonales, anticuerpos policlonales, dímeros, multímeros, anticuerpos multiespecíficos (por ejemplo, anticuerpos biespecíficos). Los anticuerpos pueden ser murinos, humanos, humanizados, quiméricos o derivados de otras especies. Un anticuerpo es una proteína generada por el sistema inmunitario que es capaz de reconocer y unirse a un antígeno específico. Un antígeno diana generalmente tiene numerosos sitios de unión, también llamados epítopos, reconocidos por las CDR en múltiples anticuerpos. Cada anticuerpo que se une específicamente a un epítopo diferente tiene una estructura diferente. Por lo tanto, un antígeno puede tener más de un anticuerpo correspondiente. Un anticuerpo incluye una molécula de inmunoglobulina de longitud completa o una porción inmunológicamente activa de una molécula de inmunoglobulina de longitud completa, es decir, una molécula que contiene un sitio de unión a antígeno que se une inmunoespecíficamente a un antígeno de una diana de interés o parte de la misma, dichas dianas incluyen, pero sin limitación, células cancerosas que producen anticuerpos autoinmunitarios asociados con una enfermedad autoinmunitaria. La inmunoglobulina divulgada en el presente documento puede ser de cualquier clase (por ejemplo, IgG, IgE, IgM, IgD e IgA) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 e IgA2) de moléculas de inmunoglobulina. Las inmunoglobulinas pueden proceder de cualquier especie.

Los "fragmentos de anticuerpo" comprenden una parte de un anticuerpo de longitud completa, que mantiene la actividad biológica deseada. Normalmente, los "fragmentos de anticuerpo" son la región de unión a antígeno o variable de los mismos. Los ejemplos de fragmentos de anticuerpo incluyen fragmentos Fab, Fab', F(ab')2 y Fv; diacuerpos; anticuerpos lineales; fragmentos producidos por una biblioteca de expresión de Fab, anticuerpos anti-idiotípicos (anti-Id), CDR (región determinante de la complementariedad) y fragmentos de unión a epítopo de cualquiera de los anteriores que se unen inmunoespecíficamente a antígenos de células cancerosas, antígenos víricos o antígenos microbianos, moléculas de anticuerpo monocatenarias; y anticuerpos multiespecíficos formados a partir de fragmentos de anticuerpo. Sin embargo, otras porciones que no se unen al antígeno de los anticuerpos pueden ser "fragmentos de anticuerpo" según se entiende en el presente documento, por ejemplo, sin limitación, un fragmento de anticuerpo puede ser un dominio Fc completo o parcial.

Los anticuerpos monoclonales del presente documento incluyen específicamente anticuerpos "quiméricos" en los que una porción de la cadena pesada y/o ligera es idéntica u homóloga a secuencias correspondientes en anticuerpos procedentes de una especie concreta o que pertenecen a una clase o subclase concreta de anticuerpos, mientras que la cadena o cadenas restantes son idénticas u homólogas a secuencias correspondientes presentes en anticuerpos procedentes de otras especies o que pertenecen a otra clase o subclase de anticuerpos, así como fragmentos de dichos anticuerpos, siempre que muestren la actividad biológica deseada (Patente de los Estados Unidos n.º 4.816.567). Los anticuerpos quiméricos de interés en el presente documento incluyen anticuerpos "primatizados" que comprenden secuencias de unión a antígeno de dominio variable procedentes de un primate no humano (por ejemplo, monos del viejo mundo o simios) y secuencias de región constante humanas.

La "citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo" y "ADCC" se refieren a una reacción mediada por células en la que células citotóxicas no específicas que expresan receptores de Fc (FcR) (por ejemplo, linfocitos citolíticos naturales (NK), neutrófilos y macrófagos) reconocen al anticuerpo unido sobre una célula diana y posteriormente causan la lisis de la célula diana. Las células principales para mediar la ADCC, las células NK, solo expresan FcγRIII, mientras que los monocitos expresan FcγRI, FcγRII y FcγRIII. Para evaluar la actividad de ADCC de una molécula de interés, puede llevarse a cabo un ensayo de ADCC *in vitro* (Patente de los Estados Unidos n.º 55.003.621; Patente de los Estados Unidos n.º 5.821.337). Las células efectoras útiles para dichos ensayos incluyen células mononucleares de sangre periférica (PBMC) y linfocitos citolíticos naturales (NK). Como alternativa o, además, la actividad de ADCC de la molécula de interés puede evaluarse *in vivo*, por ejemplo, en un modelo animal, tal como el divulgado en Clynes et al. PNAS (USA), 95:652-656(1998).

Un anticuerpo que "induce la muerte celular" es uno que hace que una célula viable se convierta en no viable. La muerte celular *in vitro* puede determinarse en ausencia de complemento y células inmunitarias efectoras para distinguir la muerte celular inducida por citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpo (ADCC) o citotoxicidad dependiente de complemento (CDC). Por lo tanto, el ensayo de muerte celular puede llevarse a cabo usando suero inactivado por calor (es decir, en ausencia de complemento) y en ausencia de células inmunitarias efectoras. Para determinar si el anticuerpo es capaz de inducir muerte celular, puede evaluarse la pérdida de integridad de la membrana, evaluada por la captación de yoduro de propidio (PI), azul de tripano o 7AAD en relación con las células no tratadas. Los anticuerpos que inducen la muerte celular son aquellos que inducen la captación de PI en el ensayo de captación de PI en células BT474.

Un anticuerpo que "induce la apoptosis" es uno que induce la muerte programada, según se determina por la unión de anexina V, fragmentación de ADN, disminución del volumen celular, dilatación del retículo endoplasmático, fragmentación y/o formación de vesículas de membrana (denominadas cuerpos apoptóticos).

VII. Método para modular la distribución de agentes activos

Otro aspecto aprovecha las propiedades de los conjugados que contienen dominio de ligando peptídico divulgados en el presente documento, para proporcionar métodos para modular la distribución de un agente activo dentro de los tejidos de un animal que comprenden administrar al animal una composición que comprende una molécula conjugada que comprende un dominio de ligando peptídico conjugado con un agente activo, en donde el dominio de ligando peptídico comprende un péptido de las SEQ ID NO: 1-137, 139 o 140 o 141-143 u homólogos de las mismas, y en donde la administración de la composición a un animal da como resultado una distribución en el tejido del agente activo que es diferente de la distribución en el tejido obtenida tras la administración del agente activo solo.

Las composiciones y métodos proporcionan de manera deseable la distribución tisular modulada del agente activo en un sitio de enfermedad. Esto se manifiesta de manera deseable proporcionando una concentración del agente activo en un sitio de enfermedad y/o un nivel en sangre aumentado o prolongado (semivida) del agente activo, que es mayor del que se obtendría en caso de que se administrarse el agente activo (en forma no conjugada) al animal. Esta modulación también puede manifestarse potenciando la tasa de captación tisular de la molécula de péptido conjugada, aumentando la retención de la molécula en su sitio diana, es decir, en el tumor, potenciando la tasa de difusión de la molécula de péptido conjugada en el tejido y/o potenciando la distribución de la molécula de péptido conjugada a través del tejido e igualando la velocidad de captación tisular de la molécula de péptido conjugada a la velocidad de internalización de uno o más receptores tisulares. Dichas mejoras pueden medirse mediante cualquier método adecuado conocido en la técnica incluyendo, sin limitación, la detección, localización y cuantificación relativa del agente activo marcado de manera adecuada, por ejemplo, usando técnicas radiográficas, microscópicas, químicas, inmunológicas o de IRM.

Por "potenciar la tasa" se entiende una tasa que es al menos aproximadamente un 33% mayor, preferentemente al menos aproximadamente un 25% mayor, más preferentemente al menos aproximadamente un 15% mayor y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 10% mayor. Por una "mayor concentración en un sitio de enfermedad" se entiende una concentración del agente activo en el conjugado en un sitio de enfermedad que es al menos aproximadamente un 33% mayor, preferentemente al menos aproximadamente un 25% mayor, más preferentemente al menos aproximadamente un 15% mayor y, aún más preferentemente, al menos aproximadamente un 10% mayor que la concentración del agente activo no conjugado en un sitio de enfermedad comparable.

Los sitios de enfermedad adecuados incluyen, sin limitación, los sitios de afecciones de proliferación anormal, remodelación de tejidos, hiperplasia, curación exagerada de heridas en cualquier tejido corporal, incluyendo tejidos blandos, tejido conectivo, hueso, órganos sólidos, vasos sanguíneos y similares. Los ejemplos más específicos de dichas enfermedades incluyen cáncer, retinopatía diabética o de otro tipo, inflamación, fibrosis, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos o injertos de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares y similares, cataratas y degeneración macular, osteoporosis y otras enfermedades óseas, aterosclerosis y otras enfermedades donde se observa con frecuencia calcificación.

En un aspecto preferido, la invención proporciona medios para tratar un tumor, en donde el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en tumores de la cavidad oral, tumores faríngeos, tumores del sistema digestivo, tumores del sistema respiratorio, tumores óseos, tumores cartilaginosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de piel, melanoma, tumores de mama, tumores del sistema genital, tumores del tracto urinario, tumores orbitales, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores esofágicos, tumores gástricos, tumores de intestino delgado, tumores colónicos, tumores rectales, tumores anales, tumores hepáticos, tumores de la vesícula biliar, tumores pancreáticos, tumores de laringe, tumores de pulmón, tumores bronquiales, carcinoma no microcítico de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, tumores de cuello de útero, tumores del cuerpo uterino, tumores de ovarios, tumores de vulva, tumores vaginales, tumores de próstata, carcinoma prostático, tumores testiculares, tumores de pene, tumores de la vejiga urinaria, tumores de riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de uréter, tumores de cabeza y cuello, cáncer paratiroideo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica. Además, la invención proporciona un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor a un agente quimioterapéutico, métodos para tratar un tumor y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico, en donde el tumor es un sarcoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma microcítico, carcinoma de células basales, carcinoma de células claras, oncocitoma o combinaciones de los mismos.

En otro aspecto, la invención proporciona composiciones y métodos de uso de dichas composiciones, en donde la administración de la composición a un animal da como resultado un nivel en sangre del agente activo que es mayor que el nivel en sangre obtenido tras la administración del agente activo solo. Puede usarse cualquier medida adecuada del nivel en sangre del agente activo, incluyendo, sin limitación, $C_{máx}$, $C_{mín}$ y ABC. Por "mayor que el nivel en sangre obtenido tras la administración del agente activo solo" se entiende un nivel en sangre que es al menos aproximadamente un 33% mayor, preferentemente al menos aproximadamente un 25% mayor, más preferentemente al menos aproximadamente un 15% mayor y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 10% mayor.

En otro aspecto más, la invención proporciona composiciones y métodos de uso de dichas composiciones, en donde la administración de la composición a un animal da como resultado una semivida en sangre del agente activo que es mayor que la semivida en sangre obtenida tras la administración del agente activo solo. Por "mayor que la semivida en sangre obtenida tras la administración del agente activo solo" se entiende una semivida que es al menos aproximadamente un 33% mayor, preferentemente al menos aproximadamente un 25% mayor, más preferentemente al menos aproximadamente un 15% mayor y aún más preferentemente al menos aproximadamente un 10% mayor.

VIII. Formulaciones y administración

Para su uso *in vivo*, el agente activo acoplado a un dominio de ligando peptídico, tal como las SEQ ID NO: 1 o 2, se formula deseablemente en una composición farmacéutica que comprende un vehículo fisiológicamente aceptable. Dentro del contexto de la invención, puede usarse cualquier vehículo fisiológicamente aceptable, dependiendo de la vía de administración. Los expertos en la materia apreciarán los vehículos que pueden usarse para proporcionar una composición farmacéutica adecuada para el método de administración deseado.

La administración de las composiciones farmacéuticas de la presente invención puede lograrse mediante cualquier vía adecuada incluyendo, pero sin limitación, administración intravenosa, subcutánea, intramuscular, intraperitoneal, intratumoral, oral, rectal, vaginal, intravesical e inhalatoria, prefiriéndose especialmente la administración intravenosa e intratumoral. La composición puede comprender además cualquier otro componente adecuado, especialmente para potenciar la estabilidad de la composición y/o su uso final. Por consiguiente, existe una gran variedad de formulaciones adecuadas de la composición de la invención. Las siguientes formulaciones y métodos son únicamente ilustrativos y no son limitantes del modo alguno.

Las composiciones farmacéuticas también pueden incluir, si se desea, agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, pueden estar presente factores terapéuticos útiles para el tratamiento de una indicación concreta. Pueden formar parte de la composición factores que controlan la inflamación, tales como ibuprofeno o esteroides, para reducir la hinchazón y la inflamación asociada con la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y el malestar fisiológico.

El vehículo será típicamente líquido, pero también puede ser sólido o una combinación de componentes líquidos y sólidos. El vehículo es deseablemente un vehículo (por ejemplo, excipiente o diluyente) fisiológicamente aceptable (por ejemplo, farmacéutica o farmacológicamente aceptable). Los vehículos fisiológicamente aceptables se conocen bien y se pueden adquirir fácilmente. La selección del vehículo se determinará, al menos en parte, por la ubicación del tejido y/o las células diana y el método particular empleado para administrar la composición.

Típicamente, dichas composiciones pueden prepararse como inyectables, como soluciones o suspensiones líquidas; también pueden prepararse formas sólidas adecuadas para su uso en la preparación de soluciones o suspensiones tras la adición de un líquido antes de su inyección; y las preparaciones también pueden emulsionarse. Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles; formulaciones que contienen estabilizantes de proteínas conocidos y lioprotectores, formulaciones que incluyen aceite de sésamo, aceite de cacahuete o propilenglicol acuoso, y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. En todos los casos, la formulación ha de ser estéril y fluida hasta el punto de que pueda inyectarse fácilmente. Tiene que ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y tiene que conservarse contra la acción contaminante de microorganismos, tales como bacterias y hongos. Pueden prepararse soluciones de los compuestos activos en forma de base libre o de sales farmacológicamente aceptables en agua mezclados idealmente con un tensioactivo, tal como hidroxicelulosa. También pueden prepararse dispersiones en glicerol, polietilenglicoles líquidos y mezclas de los mismos y en aceites. En condiciones ordinarias de almacenamiento y uso, estas preparaciones contienen un conservante para evitar el crecimiento de microorganismos.

El conjugado que contiene dominio de ligando peptídico puede formularse en una composición en una forma neutra o de sal. Las sales farmacéuticamente aceptables incluyen las sales de adición de ácido (formadas con los grupos amino libre de la proteína) y que se forman con ácidos inorgánicos, tales como, por ejemplo, ácido clorhídrico o fosfórico, o ácidos orgánicos, tales como ácido acético, oxálico, tartárico, mandélico y similares. También pueden obtenerse sales formadas con los grupos carboxilo libres a partir de bases inorgánicas, tales como, por ejemplo, hidróxido de sodio, de potasio, de amonio, de calcio o férrico y bases orgánicas tales como isopropilamina, trimetilamina, histidina, procaína y similares.

Las formulaciones adecuadas para administración parenteral incluyen soluciones para inyección acuosas y no acuosas, isotónicas y estériles, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos y solutos que hacen que la formulación sea isotónica con la sangre del receptor previsto, y suspensiones acuosas y no acuosas estériles que pueden incluir agentes de suspensión, solubilizantes, agentes espesantes, estabilizantes y conservantes. Las formulaciones pueden presentarse en recipientes sellados monodosis o multidosis, tales como ampollas y viales, y pueden almacenarse en estado criodesecado (liofilizado), requiriendo únicamente la adición de un excipiente líquido estéril, por ejemplo, agua para inyección, inmediatamente antes de su uso. Pueden prepararse soluciones y

suspensiones para inyección extemporánea a partir de polvos estériles, gránulos y comprimidos del tipo descrito previamente. En una realización preferida de la invención, el conjugado que contiene dominio de ligando peptídico se formula para inyección (por ejemplo, administración parenteral). En este sentido, la formulación deseablemente es adecuada para administración intratumoral, pero también puede formularse para inyección intravenosa, inyección intraperitoneal, inyección subcutánea y similares.

La invención también proporciona, en caso de que se desee, realizaciones en las que el conjugado que contiene dominio de ligando peptídico (es decir, el polipéptido que contiene dominio de ligando peptídico conjugado con un agente activo) está conjugado además con polietilenglicol (PEG). La conjugación con PEG puede aumentar la semivida en circulación de estos polipéptidos, reducir la inmunogenicidad y antigenicidad de los polipéptidos y mejorar su bioactividad. En caso de usarse, puede emplearse cualquier método de conjugación con PEG adecuado incluyendo, pero sin limitación, la reacción de metoxi-PEG con uno o más grupos amino disponibles de un péptido u otros sitios reactivos, tales como, por ejemplo, histidinas o cisteínas. Además, pueden usarse estrategias de ADN recombinante para añadir aminoácidos con grupos reactivos con PEG al conjugado que contiene dominio de ligando peptídico. Además, de acuerdo con los aspectos de la presente invención, pueden usarse estrategias liberables y de PEGilación híbrida, tal como la PEGilación del polipéptido, en donde las moléculas de PEG añadidas a determinados sitios en la molécula de conjugado que contiene dominio de ligando peptídico se liberan *in vivo*. En la técnica se conocen ejemplos de métodos de conjugación con PEG. Véase, por ejemplo, Greenwald et al., Adv. Drug Delivery Rev. 55:217-250 (2003).

Las formulaciones adecuadas para administración por inhalación incluyen formulaciones de aerosol. Las formulaciones de aerosol pueden colocarse en propulsores aceptables presurizados, tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares. También pueden formularse en forma de preparaciones no presurizadas, para su suministro a través de un nebulizador o un atomizador.

Las formulaciones adecuadas para administración anal pueden prepararse en forma de supositorios mezclando el principio activo con una diversidad de bases, tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Las formulaciones adecuadas para administración vaginal pueden presentarse en forma de supositorios vaginales, tampones, cremas, geles, pastas, espumas o fórmulas en pulverizador que contienen, además del principio activo, vehículos tales como los considerados adecuados en la técnica.

Además, la composición de la invención puede comprender agentes terapéuticos o biológicamente activos adicionales. Por ejemplo, pueden estar presente factores terapéuticos útiles para el tratamiento de una indicación concreta. Pueden formar parte de la composición factores que controlan la inflamación, tales como ibuprofeno o esteroides, para reducir la hinchazón y la inflamación asociada con la administración *in vivo* de la composición farmacéutica y el malestar fisiológico.

En el caso de terapia inhalatoria, la composición farmacéutica de la presente invención se encuentra deseablemente en forma de un aerosol. Se dispone de generadores de aerosol y pulverización para administrar el agente en caso de encontrarse en forma sólida. Estos generadores proporcionan partículas que son respirables o inhalables y generan un volumen de aerosol que contiene una dosis medida predeterminada de un medicamento a una tasa adecuada para administración a seres humanos. Los ejemplos de dichos generadores de aerosol y de pulverización incluyen inhaladores e insufladores de dosis medida conocidos en la técnica. En caso de que se encuentren en forma líquida, las composiciones farmacéuticas de la invención pueden convertirse en aerosol mediante cualquier dispositivo adecuado.

Cuando se usa en relación con la administración intravenosa, intraperitoneal o intratumoral, la composición farmacéutica de la invención puede comprender soluciones, suspensiones o emulsiones estériles acuosas y no acuosas del compuesto activo, siendo dichas preparaciones preferentemente isotónicas con la sangre del receptor previsto. Estas preparaciones pueden contener uno o más antioxidantes, tampones, tensioactivos, codisolventes, bacteriostáticos, solutos que hacen que las composiciones sean isotónicas con la sangre del receptor previsto, y otros componentes de formulación conocidos en la técnica. Las suspensiones estériles acuosas y no acuosas pueden incluir agentes de suspensión y agentes espesantes. Las composiciones pueden presentarse en recipientes monodosis o multidosis, por ejemplo, viales y ampollas selladas.

Los métodos de la presente invención también pueden formar parte de una terapia combinada. La expresión "terapia combinada" se refiere a la administración de un agente terapéutico de acuerdo con la invención junto con otra composición terapéutica de manera secuencial o concurrente, de tal forma que se producen los efectos beneficiosos de esta combinación en el mamífero que se somete a la terapia.

XI. La invención es aplicable a muchas afecciones

Las composiciones de la invención son adecuadas para su uso en el diagnóstico o tratamiento de varias enfermedades que incluyen, pero sin limitación, afecciones de proliferación anormal, remodelación de tejidos, hiperplasia, curación exagerada de heridas en cualquier tejido corporal, incluyendo tejidos blandos, tejido conectivo, hueso, órganos sólidos, vasos sanguíneos y similares. Los ejemplos más específicos de dichas enfermedades

incluyen cáncer, retinopatía diabética o de otro tipo, inflamación, fibrosis, artritis, reestenosis en vasos sanguíneos o injertos de vasos sanguíneos artificiales o dispositivos intravasculares y similares, cataratas y degeneración macular, osteoporosis y otras enfermedades óseas, aterosclerosis y otras enfermedades donde se observa con frecuencia calcificación.

En un aspecto preferido, la invención proporciona medios para tratar un tumor, en donde el tumor se selecciona entre el grupo que consiste en tumores de la cavidad oral, tumores faríngeos, tumores del sistema digestivo, tumores del sistema respiratorio, tumores óseos, tumores cartilaginosos, metástasis óseas, sarcomas, tumores de piel, melanoma, tumores de mama, tumores del sistema genital, tumores del tracto urinario, tumores orbitales, tumores cerebrales y del sistema nervioso central, gliomas, tumores del sistema endocrino, tumores de tiroides, tumores esofágicos, tumores gástricos, tumores de intestino delgado, tumores colónicos, tumores rectales, tumores anales, tumores hepáticos, tumores de la vesícula biliar, tumores pancreáticos, tumores de laringe, tumores de pulmón, tumores bronquiales, carcinoma no microcítico de pulmón, carcinoma microcítico de pulmón, tumores de cuello de útero, tumores del cuerpo uterino, tumores de ovarios, tumores de vulva, tumores vaginales, tumores de próstata, carcinoma prostático, tumores testiculares, tumores de pene, tumores de la vejiga urinaria, tumores de riñón, tumores de la pelvis renal, tumores de uréter, tumores de cabeza y cuello, cáncer paratiroideo, enfermedad de Hodgkin, linfoma no Hodgkin, mieloma múltiple, leucemia, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, leucemia mieloide aguda, leucemia mieloide crónica. Además, la invención proporciona un método para predecir o determinar la respuesta de un tumor a un agente quimioterapéutico, métodos para tratar un tumor y kits para predecir la respuesta de un tumor de mamífero a un agente quimioterapéutico, en donde el tumor es un sarcoma, adenocarcinoma, carcinoma de células escamosas, carcinoma de células grandes, carcinoma microcítico, carcinoma de células basales, carcinoma de células claras, oncocitoma o combinaciones de los mismos.

La invención proporciona realizaciones en donde la enfermedad se encuentra en un mamífero, incluyendo, pero sin limitación, un ser humano.

X. Kits

También se divulgan kits para el tratamiento de tumores que comprenden una formulación farmacéutica e instrucciones para el uso de la formulación en el tratamiento de tumores, en donde la formulación farmacéutica comprende una molécula conjugada que comprende un dominio de ligando peptídico conjugado con un agente activo y en donde el dominio de ligando peptídico comprende un péptido de las SEQ ID NO: 1-137, 139 o 140 o 141-143 o un homólogo de las mismas, en donde el dominio de ligando peptídico tiene una afinidad por la albúmina de suero humana caracterizada por una constante de disociación en el equilibrio (Kd) de aproximadamente 700 μM o menor y, opcionalmente, en donde la molécula conjugada comprende además un segundo dominio de ligando peptídico e instrucciones para el uso de dichos kits (por ejemplo, prospectos aprobados por la FDA).

Los siguientes ejemplos ilustran adicionalmente la invención, aunque, por supuesto, no deben interpretarse en modo alguno como limitantes de su alcance.

Ejemplo 1

Este ejemplo demuestra la identificación de péptidos de unión a SPARC usando la tecnología de presentación en fagos y la incorporación de dichos péptidos de unión a SPARC en moléculas para el tratamiento de tumores.

Específicamente, un objetivo principal fue crear una molécula con un péptido de unión a SPARC conjugado con un agente terapéutico o de diagnóstico. En particular, el objetivo era generar una proteína de fusión de péptido de unión a SPARC-Fc (FIG. 1), donde el dominio Fc del anticuerpo actúa como agente terapéutico estimulando funciones inmunitarias, tales como, por ejemplo, citotoxicidad dependiente de anticuerpo (ADC) o citotoxicidad dependiente de células (CDC).

El principio general de las metodologías de presentación es unir un ligando (péptido, proteína) al gen que codifica este ligando (véase la FIG. 2). En la técnica de presentación en fagos, esto se consigue fusionando el gen del ligando al gen que codifica una proteína de envuelta de un fago filamentoso. El genoma de fago recombinante se introduce a continuación en *Escherichia coli*, donde se expresará la proteína híbrida junto con todas las demás proteínas del fago. Después, se incorporará la proteína de fusión en la envuelta del fago que contiene el genoma del fago (que contiene el gen del ligando). La partícula de fago secretada que presenta el ligando puede seleccionarse sobre una diana inmovilizada mientras que todos los fagos que no se unen se eliminan por lavado. Después de una etapa de elución, se usa el fago recuperado para infectar a *E. coli* para permitir la amplificación de este fago para un nuevo ciclo de selección y, en última instancia, para el análisis de unión.

Por consiguiente, se exploró una biblioteca comercial de presentación de péptidos en fagos (péptidos 12-meros en M13) respecto de péptidos que se unen a SPARC. La diana, SPARC, es una glucoproteína ácida con un PI de 4,6. Mediante inmovilización sobre placas de 96 pocillos con tampón de recubrimiento a pH 9,6, se exploró la biblioteca de péptido Ph.D.-12 durante cuatro ciclos para seleccionar moléculas de unión peptídicas usando la tecnología de presentación en fagos. Específicamente, los fagos unidos se eluyeron con una solución de elución ácida en el primer

ciclo de exploración. Después, se aumentó gradualmente la rigurosidad de la exploración reduciendo la concentración de la proteína diana y aumentando el porcentaje de Tween-20 en el tampón de lavado. Al mismo tiempo, se adoptó una elución competitiva con exceso de diana para mejorar la especificidad de la exploración. Finalmente, después de cuatro ciclos de exploración, se sometió el ADN monocatenario de los clones seleccionados a secuenciación de ADN. Al mismo tiempo, se validó la unión de los fagos positivos a la proteína diana usando ELISA de fago.

Los resultados de esta exploración de una biblioteca de presentación de péptidos en fagos respecto de péptidos de unión a SPARC se muestran en las FIG. 3 y 4. La unión a SPARC puede cuantificarse por el número de clones de fago aislados que codifican péptidos con la misma secuencia (FIG. 3) o por la avidez de la unión a SPARC medida por la unión del fago que expresa el péptido a los pocillos de una placa de microtitulación recubierta de SPARC (FIG. 4). Dos de los péptidos identificados por presentación en fagos, PD 15 (SEQ ID NO: 1) y PD 21 (SEQ ID NO: 2) se caracterizaron adicionalmente.

Después, se clonaron PD 15 y PD 21 en el vector de expresión pFUSE-hIgI-Fc2 (FIG. 5), dando como resultado plásmidos que codifican proteínas de fusión PD 15-Fc y PD 21-Fc (FIG. 6). Estas proteínas de fusión se expresaron y purificaron satisfactoriamente como se demostró por electroforesis en gel de poliacrilamida (FIG. 7).

El análisis de micromatriz de proteínas (véase la FIG. 8) de PD 15 y PD 21 demostró solo una reactividad cruzada mínima con las proteínas no SPARC en 5.000 proteínas sobre la matriz ensayada (Invitrogen, ProtoArray v.3).

Los ensayos ELISA de unión dependiente de la concentración demostraron que la unión de PD 15 y PD 21 a SPARC era solo ligeramente más débil que la de un anticuerpo anti-SPARC (FIG. 9). La Kd de unión a SPARC de PD 15 es de $4{,}1 \pm 0{,}6 \times 10^{-8}$ M y la de PD 21 es de $1{,}0 \pm 0{,}7 \times 10^{-7}$ M. (El anticuerpo anti-SPARC probado tiene una Kd de unión a SPARC de $6{,}2 \pm 3{,}4 \times 10^{-9}$ M, es decir, el anticuerpo se une a SPACR con una avidez solo ligeramente mayor).

Las FIG. 10 y 11 muestran la colocalización de SPARC (indicada por la tinción inmunohistoquímica (IHC) con un anticuerpo anti-SPARC) y la unión de PD 15 y PD 21 en secciones de un tumor cerebral humano (que se había marcado epitópicamente para la tinción IHC). Tal como se muestra en la figura 10, no se verificó lo comunicado en la bibliografía acerca de la unión de estabilina 1 a SPARC, ya que stab-Fc no se unió al tejido tumoral mientras que sí lo hicieron PD15 y PD21 (figura 11).

El análisis de homología de secuencia de los péptidos de unión a SPARC aislados mediante presentación en fagos demostró que una serie de las secuencias de péptidos de unión a SPARC aisladas tenían identidad de secuencia con una región de la elastina, mostrada en la FIG. 12.

Por lo tanto, este ejemplo demuestra que pueden identificarse péptidos de unión a SPARC por presentación en fagos y cómo caracterizar adicionalmente los péptidos aislados. De los dos clones elaborados, PD 15 y PD 21, PD 15 mostró una mayor afinidad por SPARC que PD 21 en los experimentos de ELISA e IHC.

Ejemplo 2

Se ensayó la actividad antitumoral de las proteínas de fusión PD 15 y PD 21-FC en un modelo murino de xenoinjerto de carcinoma de próstata PC3 humano. Las proteínas de fusión tanto PD 15 como PD 21-Fc mostraron una inhibición del crecimiento tumoral estadísticamente significativa (FIG. 13). PD15 mostró una mejor actividad antitumoral que PD21 contra el xenoinjerto de PC3. En un modelo de ratón de xenoinjerto de colon HT29 humano, PD21 mostró una mejor actividad antitumoral que PD15, con una actividad prácticamente equivalente a la de Abraxane (FIG. 14).

Ejemplo 3

Este ejemplo demuestra la inmunogenicidad potencial de los péptidos de unión a SPARC.

ProPred es una herramienta web gráfica para predecir regiones de unión al CMH de clase II en secuencias de proteína antigénica (véase Singh et al.: ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. Bioinformatics 2001, 17(12):1236-7). El servidor incorpora un algoritmo de predicción basado en una matriz, que emplea una tabla de coeficientes de aminoácido/posición deducida a partir de la bibliografía. Las moléculas de unión previstas pueden visualizarse como picos en la interfaz gráfica o como restos coloreados en la interfaz HTML. Este servidor podría ser una herramienta útil para localizar regiones de unión promiscuas que puedan unirse a varios alelos de HLA-DR.

Los resultados de un análisis ProPred de los péptidos de unión a SPARC identificados con presentación en fagos, incluyendo PD 21 y PD 15, indican que solamente unas pocas moléculas de HLA-DR presentarán estos péptidos y sugieren que los péptidos no serán muy inmunogénicos.

Cualquier péptido divulgado en el presente documento, incluyendo, por ejemplo, las SEQ ID NO: 1-112 o 117, que

muestre una alta afinidad puede analizarse de manera similar respecto de una inmunogenicidad baja o nula.

Ejemplo 4

También pueden presentarse fragmentos de anticuerpo sobre fagos usando diferentes formatos. Un fragmento monocatenario variable (scFv) es una fusión de las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de inmunoglobulinas, unidas entre sí por un enlazador corto (normalmente serina o glicina). Esta molécula quimérica retiene la especificidad de la inmunoglobulina original, a pesar de la eliminación de las regiones constantes y de la introducción de un enlazador peptídico. Los formatos más comunes para la presentación de anticuerpos en fagos incluyen el uso de bibliotecas de scFv. Por lo tanto, pueden explorarse grandes colecciones de variantes de anticuerpo respecto de la presencia de un clon de unión a antígeno.

La estrategia general fue, en primer lugar, explorar una biblioteca de presentación de anticuerpos en fagos mediante ELISA con SPARC como antígeno.

Al comienzo, se realizaron cuatro ciclos de exploración de HuScL-3® (tres ciclos con elución ácida y un ciclo con elución competitiva) y se seleccionaron 17 clones positivos mediante ELISA de fago. La secuenciación del ADN de estos clones reveló dos secuencias de anticuerpo únicas, entre las cuales la 1ª secuencia era compartida por 15 clones positivos y la 2ª era compartida por los dos clones positivos restantes. Después de esto, se validó la especificidad de unión de los dos anticuerpos únicos mediante ELISA de scFv soluble.

A continuación, se realizaron tres ciclos de exploración de HuScL-2® (dos ciclos con elución de digestión con tripsina y un ciclo con elución competitiva). Al final, se seleccionaron 30 clones positivos mediante ELISA de fago. De acuerdo con los resultados de la secuenciación, 29 clones compartían una secuencia de anticuerpo y el clon restante codificaba otro anticuerpo único. Después de esto, se validó la especificidad de unión de estos dos anticuerpos también mediante ELISA de scFv soluble.

Se identificaron cuatro scFv únicos contra SPARC, ScFv 3-1, ScFv 3-2, ScFv 2-1 y ScFv 2-2 (SEQ ID NO: 113-116).

El uso de los términos "un", "una", "uno" y "el" o "la" y referentes similares en el contexto de la descripción de la invención (en especial en el contexto de las reivindicaciones siguientes) debe interpretarse como incluyente tanto del singular como del plural, a menos que se indique ora cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. Los términos "comprende", "tiene", "incluye" y "contiene" deben interpretarse como términos abiertos (es decir, con el significado de "incluye, pero sin limitación"), a menos que se indique otra cosa. La cita de intervalos de valores en el presente documento pretende simplemente servir como método abreviado para referirse individualmente a cada valor separado que se encuentre dentro del intervalo, a menos que se indique otra cosa en el presente documento, y cada valor por separado se incorpora en la memoria descriptiva como si se hubiese citado individualmente en el presente documento. Todos los métodos descritos en el presente documento pueden efectuarse en cualquier orden adecuado a menos que se indique otra cosa en el presente documento o se contradiga claramente por el contexto. El uso de todos y cada uno de los ejemplos o de expresiones ejemplares (por ejemplo, "tal como") proporcionados en el presente documento, tiene por objeto únicamente aclarar adicionalmente la invención. Ninguna expresión en la memoria descriptiva debe interpretarse como indicativa de que ningún elemento no reivindicado sea esencial para la puesta en práctica de la invención.

En el presente documento se describen realizaciones preferidas de la presente invención, que incluyen el mejor modo conocido por los inventores para llevar a cabo la invención. Pueden ser evidentes para los expertos en la materia variaciones de estas realizaciones preferidas tras la lectura de la descripción anterior. Los inventores esperan que los expertos en la materia empleen dichas variaciones cuando sea adecuado y los inventores pretenden que la invención se ponga en práctica de otro modo al descrito específicamente en el presente documento.

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> ABRAXIS BIOSCIENCE, LLC

<120> PÉPTIDOS DE UNIÓN A SPARC Y USOS DE LOS MISMOS

<130> EP76465IFZSEpau

<140> aún sin asignar
<141> 07-12-2009

<150> 09831264,8
<151> 07-12-2009

<150> PCT/US2009/066986

<151> 07-12-2009

<150> 61/120.228
<151> 05-12-2008

<160> 144

<170> PatentIn versión 3.4

<210> 1
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 1

Tyr Thr Arg Leu His His Trp Ile Pro Pro Gln Arg
1 5 10

<210> 2
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 2

Val Thr Pro Leu Leu Lys Phe Arg Ala Leu Ser Ser
1 5 10

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 3

Ala His Pro Trp Arg Tyr Thr Glu Pro Trp Ser Trp
1 5 10

<210> 4
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 4

Ala Leu Ser Arg His His His Pro Ile Phe Pro Arg
1 5 10

<210> 5
<211> 12

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 5

Asn Glu Val Val Pro Phe Ser Tyr Ala Arg Gln Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 6

His Val Pro His Leu Ala Ser Ile Met Ala Ser Asn
1 5 10

<210> 7
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 7

His Trp Gly Leu His Leu Ser Ala Trp Ser Gln Met
1 5 10

<210> 8
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 8

His Trp Lys Pro Trp Thr Ser Pro Ser Arg His Ser
1 5 10

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 9

Ile Asp Lys Pro Leu His Val Val Leu Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 10

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 10

Ser Pro Cys Ala Tyr Thr Ser Thr Cys Asp Ala Leu
1 5 10

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 11

Ser Tyr Ser Pro Asn Leu Lys Ser Ala Tyr Asn
1 5 10

<210> 12
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 12

Thr His His Pro Thr Glu Tyr Leu Thr Arg Ala Pro
1 5 10

<210> 13
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 13

Thr Pro His Gln Asn Pro Trp Phe Phe Glu Ile Thr
1 5 10

<210> 14
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 14

Thr Gln Trp His Asp Asp Ser Thr Phe Tyr Trp Leu
1 5 10

<210> 15
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 15

Thr Val Asn Thr Tyr Tyr Asn Tyr Gly Met Ser Pro
1 5 10

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 16

Thr Trp His Ala Ser Ala Pro Arg Pro Pro Leu Leu
1 5 10

<210> 17
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 17

Val Thr Pro Leu Leu Lys Phe Arg Ala Leu Ser Ser
1 5 10

<210> 18
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 18

Ala Ala Ala Pro Leu Asn Leu Ser Met Thr Phe Pro
1 5 10

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 19

Ala Ala Leu Thr Phe Pro Ala Pro Gln Ser Ala Ser
1 5 10

<210> 20
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 20

Ala Leu Val Pro Lys Asn Leu Thr Pro Pro Gln His
1 5 10

<210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 21

Ala Asn Trp Ser Pro Trp His His Tyr His His Lys
1 5 10

<210> 22
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 22

Ala Pro Ala His Pro His Thr Ala Tyr Pro Ser Gly
1 5 10

<210> 23
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 23

Ala Thr Trp His Ser Phe Phe Tyr His Asn His Ser
1 5 10

<210> 24
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 24

Ala Tyr Ser His Ser Thr Pro Ser Ser Leu Thr Glu
1 5 10

<210> 25
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 25

Asp Asp Asn Asn Leu Phe Trp Trp Asn Asn Ala Gln
1 5 10

<210> 26
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 26

Asp Gly Met Phe Asn Tyr Arg Ala Ser Leu Asp Pro
1 5 10

<210> 27
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 27

Asp Leu His Gly Arg Thr Ser Ser Thr Pro Pro Asp
1 5 10

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 28

Asp Pro Leu Gln Pro Pro Asp Asn Val Thr Tyr Phe
1 5 10

<210> 29
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 29

Asp Gln Ala Ala Ser Arg Ser His Ser Phe Pro Leu
1 5 10

<210> 30
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 30

Glu His Gly Ser Ala Leu Phe Arg Trp Ser Gln Thr
1 5 10

<210> 31
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 31

Glu Val Phe His Trp Thr Ala Gly Thr Pro Arg Glu
1 5 10

<210> 32
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 32

Phe His Ser Ser Glu Ser Arg Pro Met Ser Pro Thr
1 5 10

<210> 33
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 33

Phe Gln Ser Val Pro Ser Lys Asn Ile Ala Thr His
1 5 10

<210> 34
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 34

Gly His His His Pro Ser Ala Thr Phe Asn Ala Arg
1 5 10

<210> 35
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 35

Gly His Ser Ala Ser Phe Ala Leu His Ser Ser Asp
1 5 10

<210> 36
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 36

Gly Leu Thr Ser Val Lys His His His Asn Ala His
1 5 10

<210> 37
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 37

Gly Met Asp Phe Arg Thr Leu Ile Trp Pro His Lys
1 5 10

<210> 38
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 38

Gly Met His Val Pro Gln Ile Pro Gly His Phe Leu
1 5 10

<210> 39
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 39

Gly Thr Ile Gly Pro Phe Pro Glu Thr Leu Arg Leu
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 40

His Gly Pro His Asp Met Thr Ile Val Gly Met Gly
1 5 10

<210> 41
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 41

His His Leu Phe Gln Ile His Pro Asp Ser Trp Pro
1 5 10

<210> 42
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 42

His His Tyr Lys Thr Asp Leu His Arg Thr Pro Arg
1 5 10

<210> 43
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 43

His Leu Lys His Leu Asn Trp Thr Ala Ser Lys Leu
1 5 10

<210> 44
<211> 7

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 44

His Leu Pro Lys Ser Leu Ser
1 5

<210> 45
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 45

His Met Lys Ser Gln Thr Asp Thr Pro Phe Tyr Gly
1 5 10

<210> 46
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 46

His Gln Met Phe Leu Ile Gly Thr Gly His Trp Gly
1 5 10

<210> 47
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 47

His Thr Leu His His Met Thr Thr Ser Pro Phe Ala
1 5 10

<210> 48
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 48

His Thr Asn Leu Met Gln Thr Thr Arg Pro Leu Val
1 5 10

<210> 49
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 49

His Val His Gln His Arg His Leu Val Glu Val Ile
1 5 10

<210> 50
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 50

His Trp Leu Pro Leu Leu Gly Gly Glu Leu Ser Ala
1 5 10

<210> 51
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 51

His Tyr Phe Ser Arg Thr Gln Thr Leu Ser Thr Leu
1 5 10

<210> 52
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 52

His Tyr Gln Phe His Trp Arg Ser Leu Ser Gly Pro
1 5 10

<210> 53
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 53

Ile His Arg Ala Pro Thr Pro Phe Asn Leu Gly Thr
1 5 10

<210> 54
<211> 12
<212> PRT

<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 54

Ile Ile Pro Leu Arg Met Asn Thr Ala Tyr Pro Tyr
1 5 10

<210> 55
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 55

Ile Pro Phe Ala Thr Ala Ala Tyr Asn Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 56

Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Ile Thr Pro Arg
1 5 10

<210> 57
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 57

Lys Val Thr Thr Asn Tyr Ala Leu His Leu Ala Ser
1 5 10

<210> 58
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 58

Leu Pro Phe Pro Leu Ser Tyr Asn Ile Gly Pro Ala
1 5 10

<210> 59
<211> 12

<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 59

Leu Pro Pro Pro Pro His Leu Pro Thr Phe Leu Pro
1 5 10

<210> 60
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 60

Leu Pro Thr Phe Asn Phe Ser Leu Pro Gly Ile Ile
1 5 10

<210> 61
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 61

Leu Ser Thr His Lys Leu Phe His Ser His Ser Gln
1 5 10

<210> 62
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 62

Met Asp Thr Pro Gly His Leu His Leu Ser Arg Ser
1 5 10

<210> 63
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 63

Met Lys Glu Ala Pro His Asp Gly Ser Cys Leu
1 5 10

<210> 64

<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 64

Asn Phe Ala Gln Asn Leu Ser Ser Asn Thr Tyr Trp
1 5 10

<210> 65
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 65

Asn Gly Tyr Leu Gly Leu Arg Pro Gln Leu His Phe
1 5 10

<210> 66
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 66

Asn His Leu Asn Ser Met Ser Ser Val Glu Ala Leu
1 5 10

<210> 67
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 67

Asn His Gln Leu His Gln Asn His Phe Pro Arg Met
1 5 10

<210> 68
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 68

Asn Leu Thr His Pro Leu Trp Gly Pro Asp Leu Phe
1 5 10

<210> 69
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 69

Asn Thr Leu Ser Gln Pro Arg Val Gly Gly Leu Asn
1 5 10

<210> 70
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 70

Asn Thr Pro Pro Met Ser His Gln Asn Pro Val Arg
1 5 10

<210> 71
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 71

Gln Asp Ala Leu Thr Pro Arg Arg Leu Trp Pro Thr
1 5 10

<210> 72
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 72

Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Thr Asn Leu Gly Pro Phe
1 5 10

<210> 73
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 73

Gln Tyr Asp Thr His Arg Gly Ser Asp Asn Lys Gln
1 5 10

<210> 74
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 74

Arg His Leu Glu Ile Asn His Val Thr Leu Leu Val
1 5 10

<210> 75
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 75

Ser Ala His Thr Leu Ala Ala Trp Phe Ala Lys Pro
1 5 10

<210> 76
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 76

Ser Glu Thr Leu Gln Val Tyr Lys Pro Ile Leu Val
1 5 10

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 77

Ser His Val Leu Ser Ser Pro Ser Arg Gly Val
1 5 10

<210> 78
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 78

Ser His Ser Thr Gln Asp Arg Phe Val His Pro Ala
1 5 10

<210> 79
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 79

Ser His Tyr Pro Thr Ala Arg Gln Leu Thr Asn Ser
1 5 10

<210> 80
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 80

Ser Ile Ala Pro His Ser Gln Arg Leu Ser Leu Ser
1 5 10

<210> 81
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 81

Ser Leu Pro Asp Ile Ser Thr Arg Gly Leu Ala Ala
1 5 10

<210> 82
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 82

Ser Pro Pro His Pro Ala Arg Tyr Tyr Ser Pro Leu
1 5 10

<210> 83
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 83

Ser Pro Pro Thr Thr Met Thr Pro Asn Asn Met Pro
1 5 10

<210> 84
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 84

Ser Ser His Pro Ile Pro Tyr Asn Ala Ser Gln Met
1 5 10

<210> 85
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 85

Ser Thr Tyr Lys Asp Ser Trp Asn Glu Tyr Gly Pro
1 5 10

<210> 86
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 86

Ser Tyr Gln Gln Pro Met Gly Leu Tyr Arg Gln Phe
1 5 10

<210> 87
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 87

Thr Gly Leu Leu Gln Glu Pro Thr Phe Arg Gly Met
1 5 10

<210> 88
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 88

Thr His Gly His Tyr Tyr Pro Ser Ile Ala Leu Ser
1 5 10

<210> 89
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 89

Thr Leu Pro Ala Ala Ala Leu Pro Trp Leu Tyr Leu
1 5 10

<210> 90
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 90

Thr Met Ile Pro Leu Ile Tyr Pro Pro Gln Ala Asn
1 5 10

<210> 91
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 91

Thr Pro Asp Leu Ser Gln Ser Ser Pro His Ser Phe
1 5 10

<210> 92
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 92

Thr Pro His Leu Pro Pro Thr Arg Ala Gly Ser Pro
1 5 10

<210> 93
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 93

Thr Pro Asn Pro Leu Gly Thr Gln Cys Met Thr Cys
1 5 10

<210> 94
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 94

Thr Gln Tyr Ile His Thr Asp Leu Ser Ser Thr Ser
1 5 10

<210> 95
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 95

Thr Ser His Gln Ile Tyr Pro Val Ser Trp Met Arg
1 5 10

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 96

Thr Ser Ser Ala Ser His Thr Asn Leu Thr Thr Arg
1 5 10

<210> 97
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 97

Thr Ser Thr Arg Asp Ile Trp Ser Thr His Asp Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>

<223> Sintético

<400> 98

Thr Ser Tyr Leu Asn Ser Gly Met Ile Pro Ala Arg
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 99

Thr Thr His Ser Glu Leu Ser Gly Tyr Val Glu Leu
1 5 10

<210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 100

Val Glu Ala Glu Asn Asp Ser Gly Met Asn Ser Gln
1 5 10

<210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 101

Val Phe Asp Leu Asn Gly Tyr Asn Arg Asn Pro Ile
1 5 10

<210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 102

Val Gly Asn Met Pro Phe Val His Pro His Gln Trp
1 5 10

<210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 103

Val Pro Ala Thr Arg Val Ser Pro Thr Pro Tyr Ala
1 5 10

<210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 104

Val Ser His Pro Pro Arg Phe Pro Gly Trp Pro Gln
1 5 10

<210> 105
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 105

Trp His Glu Pro Ser Thr Trp Leu Val Asn Pro Arg
1 5 10

<210> 106
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 106

Trp Pro Ala His Pro His Thr Ala Tyr Pro Ser Gly
1 5 10

<210> 107
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 107

Trp Pro Ile Asn Gln Gln Arg Gln Leu Tyr Thr Ser
1 5 10

<210> 108
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 108

Trp Ser Asp Pro Arg Ala Val Thr Trp Arg Ala His
1 5 10

<210> 109
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 109

Trp Ser Leu Thr Pro Thr Ala Leu Leu Thr Ser Phe
1 5 10

<210> 110
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 110

Trp Ser Val Pro Leu Pro Pro Gly Asp Pro Lys Pro
1 5 10

<210> 111
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 111

Tyr Met Ala Pro His Val Pro Leu Thr Asn Ala Ser
1 5 10

<210> 112
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 112

Tyr Pro Asn Pro Trp His Glu Ser Ser Phe Met Ser
1 5 10

<210> 113
<211> 251
<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 113

```
Ala Ile Arg Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1               5                   10                  15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
            20                  25                  30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr Pro Tyr
                85                  90                  95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Asp Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser
            100                 105                 110

Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly
        115                 120                 125

Thr Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
    130                 135                 140
```

Ser Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Met Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Ala Asn Tyr Ala Gln Lys
180 185 190

Phe Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Ser Thr Ala
195 200 205

Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Arg Asp Pro Glu Asp Asn Trp Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly
225 230 235 240

Gln Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
245 250

<210> 114
<211> 250
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 114

Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Asp Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Gly Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Ala
65 70 75 80

Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Ser Thr Leu Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Gly Gly Ser
100 105 110

Thr Ile Thr Ser Tyr Asn Val Tyr Tyr Thr Lys Leu Ser Ser Ser Gly
115 120 125

Thr Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly
130 135 140

Arg Pro Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
165 170 175

Val Ala Val Ile Ser Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser
180 185 190

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

Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
210 215 220

Cys Ala Arg Asp Leu Ser Trp Asn Asp Ala Phe Asp Ile Trp Gly Gln
225 230 235 240

Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser Ala Ser
245 250

<210> 115
<211> 240
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 115

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                   10                  15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45

Ser Met Ile Thr Pro Leu Gly Ser Thr Thr Ala Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
```

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Arg Ala Gly Val Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
130 135 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
195 200 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asp
210 215 220

Ser Phe Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
225 230 235 240

<210> 116
<211> 239
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 116

Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

35 40 45

Ser His Ile Gln Gly Gln Gly Arg Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Thr His Gly Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
115 120 125

Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
130 135 140

Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
145 150 155 160

Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
165 170 175

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
180 185 190

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
195 200 205

Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Pro Ser
210 215 220

Gly Val Pro Thr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
225 230 235

<210> 117
<211> 52
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 117

Gln Gly Gly Cys Gln Ser Pro Ala Pro Ser Cys Ser Trp Ala Trp Cys
1 5 10 15

Trp His Pro Trp Thr Trp Ser Trp Cys Arg Arg Pro Trp Thr Trp Ser
20 25 30

Trp Cys Trp Cys Ser Trp Thr Trp Ser Trp Cys Trp Cys Ser Trp Leu
35 40 45

Arg Gly Ser Thr
50

<210> 118
<211> 227
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 118

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Pro Gly Lys
225

<210> 119
<211> 15
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 119

Met Tyr Ile Phe Pro Val His Trp Gln Phe Gly Gln Leu Asp Gln
1 5 10 15

<210> 120
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 120

Lys Asn His Gly Ala Thr Arg Thr Thr Arg Ala Ser
1 5 10

<210> 121
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 121

Tyr Thr Arg Leu His His Trp Ile Pro Pro Gln Arg
1 5 10

<210> 122
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 122

Val Thr Pro Leu Leu Lys Phe Arg Ala Leu Ser Ser
1 5 10

<210> 123
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 123

Val Ser His Pro Pro Arg Phe Pro Gly Trp Pro Gln
1 5 10

<210> 124
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 124

Lys Ala Tyr Leu Asp Ser Ile Pro Ile Thr Pro Arg
1 5 10

<210> 125
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 125

Thr Ser Tyr Leu Asn Ser Gly Met Ile Pro Ala Arg
1 5 10

<210> 126
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 126

Ala His Pro Trp Arg Tyr Thr Glu Pro Trp Ser Trp
1 5 10

<210> 127
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 127

Val Pro Ala Thr Arg Val Ser Pro Thr Pro Tyr Ala
1 5 10

<210> 128
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 128

Gln Ile Leu Gly Tyr Pro Thr Asn Leu Gly Pro Phe
1 5 10

<210> 129
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 129

Ala His Pro Trp Arg Tyr Thr Glu Pro Trp Ser Trp
1 5 10

<210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 130

Leu Ser Thr His Lys Leu Phe His Ser His Ser Gln
1 5 10

<210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 131

Ala Ala Ala Pro Leu Asn Leu Ser Met Thr Phe Pro
1 5 10

<210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 132

Ile Asp Lys Pro Leu His Val Val Leu Ala Leu Gly
1 5 10

<210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 133

Thr Gln Trp His Asp Asp Ser Thr Phe Tyr Trp Leu
1 5 10

<210> 134
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 134

Thr Thr His Ser Glu Leu Ser Gly Tyr Val Glu Leu
1 5 10

<210> 135
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 135

Ile Pro Phe Ala Thr Ala Ala Tyr Asn Ala Pro Gly
1 5 10

<210> 136
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 136

Val Gly Asn Met Pro Phe Val His Pro His Gln Trp
1 5 10

<210> 137
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 137

```
His Tyr Phe Ser Arg Thr Gln Thr Leu Ser Thr Leu
1               5                   10
```

<210> 138
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 138

```
Ser Ala His Thr Leu Ala Ala Trp Phe Ala Lys Pro
1               5                   10
```

<210> 139
<211> 12
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 139

```
Tyr Ser Ala His Ile Gly Ser Arg His Thr His Tyr
1               5                   10
```

<210> 140
<211> 52
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 140

```
Gln Gly Gly Cys Gln Ser Pro Ala Pro Ser Cys Ser Trp Ala Trp Cys
1               5                   10                  15

Trp His Pro Trp Thr Trp Ser Trp Cys Arg Arg Pro Trp Thr Trp Ser
            20                  25                  30

Trp Cys Trp Cys Ser Trp Thr Trp Ser Trp Cys Trp Cys Ser Trp Leu
        35                  40                  45

Arg Gly Ser Thr
    50
```

<210> 141
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 141

tatacccgcc tgcatcattg gattccgccg cagcgcgaca aaactcacac atgcccaccg 60

tgcccagcac ctgaactcct ggg 83

<210> 142
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 142

Tyr Thr Arg Leu His His Trp Ile Pro Pro Gln Arg Asp Lys Thr His
1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
20 25

<210> 143
<211> 83
<212> ADN
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 143

gtgaccccgc tgctgaaatt tcgcgcgctg agcagcgaca aaactcacac atgcccaccg 60

tgcccagcac ctgaactcct ggg 83

<210> 144
<211> 27
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sintético

<400> 144

Val Thr Pro Leu Leu Lys Phe Arg Ala Leu Ser Ser Asp Lys Thr His
1 5 10 15

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
20 25

REIVINDICACIONES

1. Un agente terapéutico acoplado a un polipéptido de unión a SPARC (SBP), en donde el SBP comprende la SEQ ID NO: 1 o la SEQ ID NO: 2 o combinaciones de las mismas para su uso en el tratamiento del cáncer en un mamífero.

2. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1, en donde el agente se usa en combinación con un vehículo farmacéuticamente aceptable.

3. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 1 o 2, en donde el agente terapéutico es un compuesto de platino, un inhibidor de la polarización de microtúbulos, un antifolato, un antimetabolito, un antimitótico, un inhibidor de cinasas, un fragmento de anticuerpo, un agente que daña al ADN, un proapoptótico, un factor antiangiogénico, una toxina o combinaciones de los mismos.

4. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 3, en donde el fragmento de anticuerpo comprende un dominio Fc funcional.

5. Un agente para su uso de acuerdo con la reivindicación 4, en donde el dominio Fc funcional del fragmento de anticuerpo tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 118.

FIG. 1

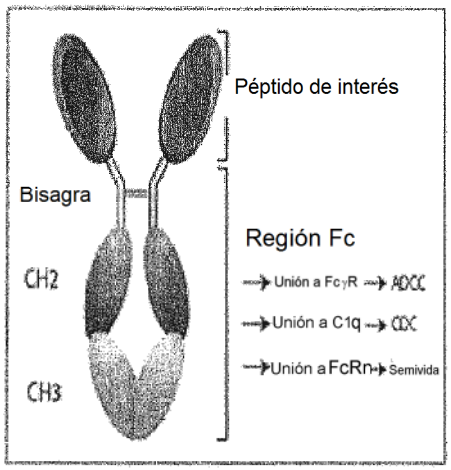

Péptido de interés
Bisagra
Región Fc
CH2
Unión a FcγR
ADCC
Unión a C1q
CDC
Unión a FcRn
Semivida
CH3

FIG. 2

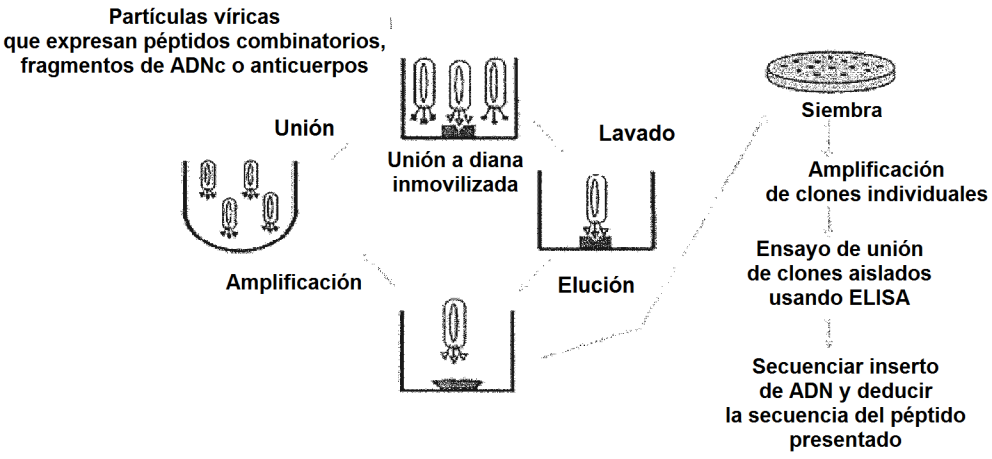

Partículas víricas
que expresan péptidos combinatorios,
fragmentos de ADNc o anticuerpos
Unión
Unión a diana
inmovilizada
Lavado
Siembra
Amplificación
de clones individuales
Ensayo de unión
de clones aislados
usando ELISA
Secuenciar inserto
de ADN y deducir
la secuencia del péptido
presentado
Amplificación
Elución

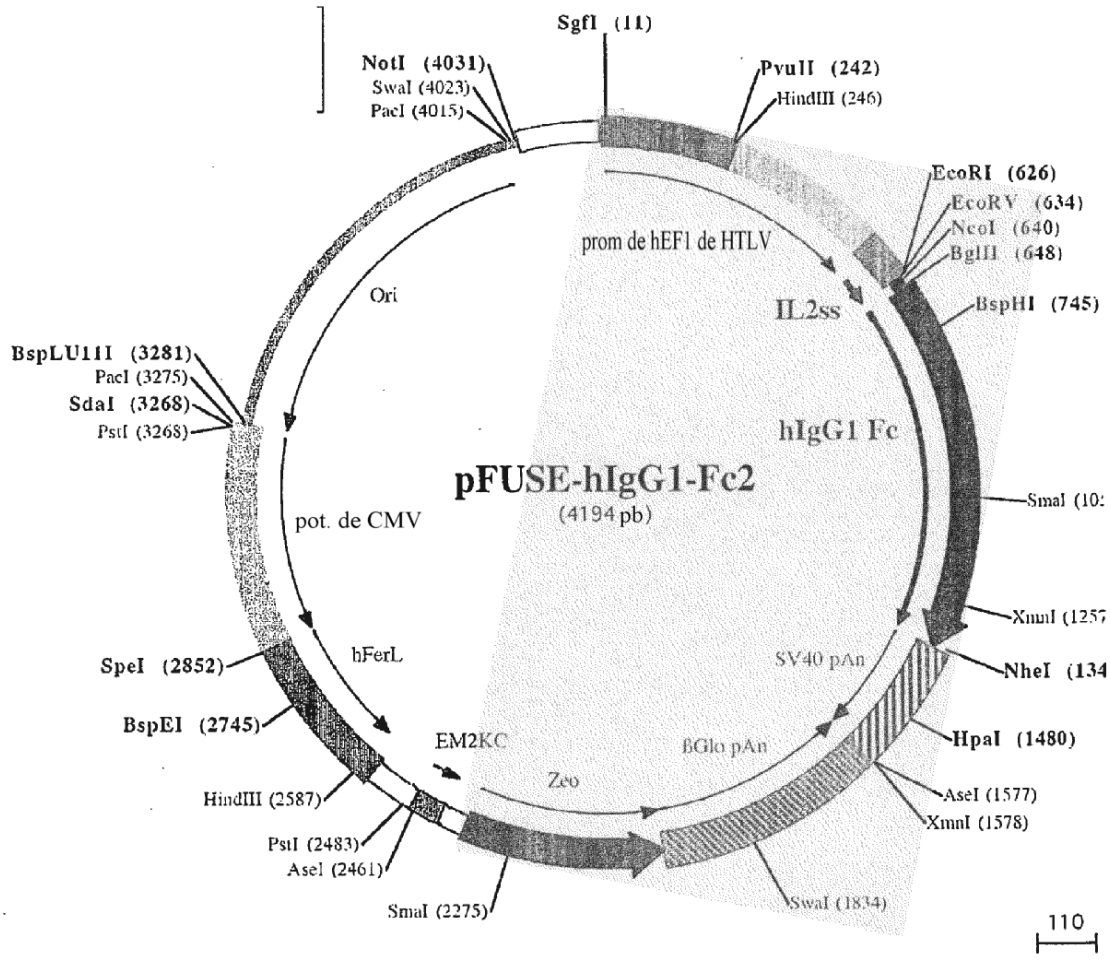
FIG. 3

Secuencia	Recuento	Secuencia	Recuento	Secuencia	Recuento
Total	134	HGPHDMTIVGMG	1	SIHSTQDRFVHPA	1
AHPWRYTEPWSW	6	HHLFQIHPDSWP	1	SIHYPTARQLTMS	1
ALSRHHHPIFPR	4	HHYKTDLHRTPR	1	SIAPHSQRLSLS	1
NEVVPFSYARQS	3	HLKHLNWTASKL	1	SILPDISTRGLAA	1
HVPHLASIMASN	2	HLPKSLS	1	SIPPHPARYYSPL	1
HWGLHLSAWSQM	2	HMKSQTDTPFYG	1	SIPPTTMTPNNMP	1
HWKPWTSPSRHS	2	HQMELIGTGHWG	1	SSHPIPYNASQM	1
IDKPLHVVLALG	2	HTLHHMTTSPFA	1	STYKDSWNEYGP	1
SPCAYTSTCDAL	2	HTNLMQTTRPLV	1	SYQQPMGLYRQF	1
SYSYPNLKSAYN	2	HVHQHRHLVEVI	1	TGLLQEPTFRGM	1
THHPTFYLTRAP	2	HWLPLLGGFLSA	1	THGHYYPSIALS	1
TPHQNPWFFEIT	2	HYFSRTQTLSTL	1	TLPAAALPWLYL	1
TQWHDDSTFYWL	2	HYQFHWRSLSGP	1	TMIPLIYPPQAN	1
TVNTYYNYGMSP	2	IHRAPTPFNLGT	1	TPDLSQSSPHSF	1
TWHASAPRPPLL	2	HPLRMNTAYPY	1	TPHLPPTRAGSP	1
VTPLLKFRALSS-21	2	IPFATAAYNAPG	1	TPNPLGTQCMTC	1
AAAPLNLSMTFP	1	KAYLDSIPITPR	1	TQYIHTDLSSTS	1
AALTFFAPQSAS	1	KVTTNYALHLAS	1	TSHQIYPVSWMR	1
ALVPKNLTPPQH	1	LPFPLSYNIGPA	1	TSSASHTNLTTR	1
ANWSPWHHYHHK	1	LPPPPHLPTFLP	1	TSTRQIWSTHDL	1
APAHPHTAYPSG	1	LPTFNFSLPGI	1	TSYLNSGMIPAR	1
ATWHSFFYHNHS	1	LSTHKLFHSHSQ	1	TTHSELSGYVEL	1
AYSHSTPSSLTE	1	MDTPGHLHLSRS	1	VEAENDSGMNSQ	1
DDNNLFWWNNAQ	1	MKEAPIDGSCL	1	VFDLNGYNRNPI	1
DGMFNYRASLDP	1	NFAQNLSSNTYW	1	VGNMPFVHPHQW	1
DLHGRTSSTPPD	1	NGYLGLRPQLHF	1	VPATRVSPTPYA	1
DPLQPPDNVTYF	1	NHLNSMSSVEAL	1	VSHPPRFPGWPQ	1
DQAASRSHSFPL	1	NHQLHQPIHFPRM	1	WHEPSTWLVNPR	1
EHGSALFRWSQT	1	NLTHPLWGPDLF	1	WPAHPHTAYPSG	1
EVFHWTAGTPRE	1	NTLSQPRVGGLN	1	WPINQQRQLYTS	1
THSSESRRMSPT	1	NTPPMSHQNPVR	1	WSDPRAVTWRAP	1
FQSVPSKNIATH	1	QDALTPRRLWPT	1	WSLTPTALLTSF	1
GHHHPSATFNAR	1	QILGYPTNLGPF	1	WSVPLPPGDPKP	1
GHSASFALHSSD	1	QYDTHRGSDNKQ	1	YMAPHVPLTNAS	1
GLTSVKHHHNAH	1	RHLEINHVTLLV	1	YPNPWHESSFMS	1
GMDFRTLIWPHK	1	SAHTLAAWFAKP	1	YSAHIGSRHTHY	1
GMHVPQIPGHFL	1	SETLQVYKPILY	1	YTRLHHWIPPQR- 15	1
GTIGPFPETLRL	1	SHLILSSPSRGV	1		

FIG. 4

Clon	DO			Secuencias	SEQ ID NO:
15	0,597	0,516	0,576	YTRLHHWIPPQR	121
21	0,450	0,443	0,438	VTPLLKFRALSS	122
59	0,737	0,628	0,733	VSHPPRFPGWPQ	123
60	0,619	0,611	0,605	KAYLDSIPITPR	124
63	0,686	0,664	0,602	TSYLNSGMIPAR	125
101	0,592	0,551	0,607	AHPWRYTEPWSW	126
133	0,545	0,554	0,5	VPATRVSPTPYA	127
135	0,626	0,652	0,66	QILGYPTNLGPF	128
154	0,612	0,665	0,674	AHPWRYTEPWSW	129
180	1,211	1,281	1,135	LSTHKLFHSHSQ	130
182	0,756	0,782	0,643	AAAPLNLSMTFP	131
184	0,634	0,635	0,554	IDKPLHVVLALG	132
186	0,903	0,985	0,882	TQWHDDSTFYWL	133
188	0,716	0,682	0,685	TTHSELSGYVEL	134
191	0,564	0,567	0,58	IPFATAAYNAPG	135
192	0,567	0,5	0.539	VGNMPFVHPHQW	136
194	0,494	0,514	0,521	HYFSRTQTLSTL	137
204	0,8	0,748	0,779	SAHTLAAWFAKP	138

FIG. 5



YTRLHHWIPPQR (N.º 15) – SEQ ID NO: 1
VTPLLKFRALSS (N.º 21) – SEQ ID NO: 2

FIG. 6

PD15

```
tatacccgcc tgcatcattg gattccgccg cagcgcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggg     SEQ ID NO: 141
  y  t  r   l  h  h   w  i  p  p   q  r  d   k  t  h   t  c  p  p   c  p  a   p  e  l   l
>>................15................>>                                                          SEQ ID NO: 142
                                    >>.................Fc de IgG1 humana.................>>
```

PD21

```
gtgaccccgc tgctgaaatt tcgcgcgctg agcagcgaca aaactcacac atgcccaccg tgcccagcac ctgaactcct ggg     SEQ ID NO: 143
  v  t  p   l  l  k   f  r  a  l   s  s  d   k  t  h   t  c  p  p   c  p  a   p  e  l   l
>>................21................>>                                                          SEQ ID NO: 144
                                    >>.................Fc de IgG1 humana.................>>
```

FIG. 7

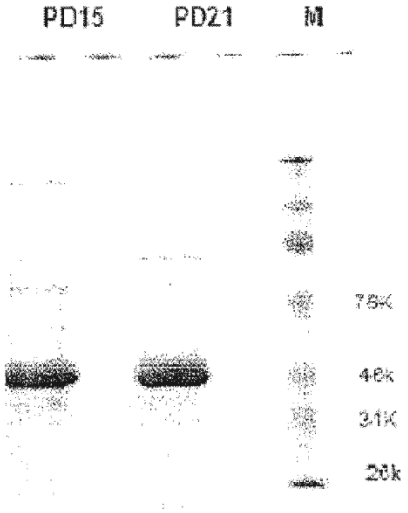


FIG. 8

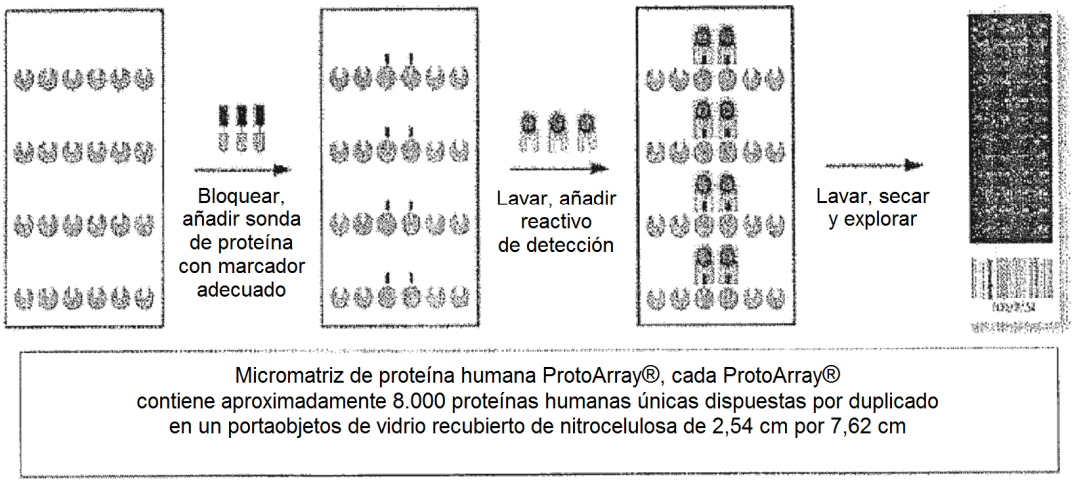
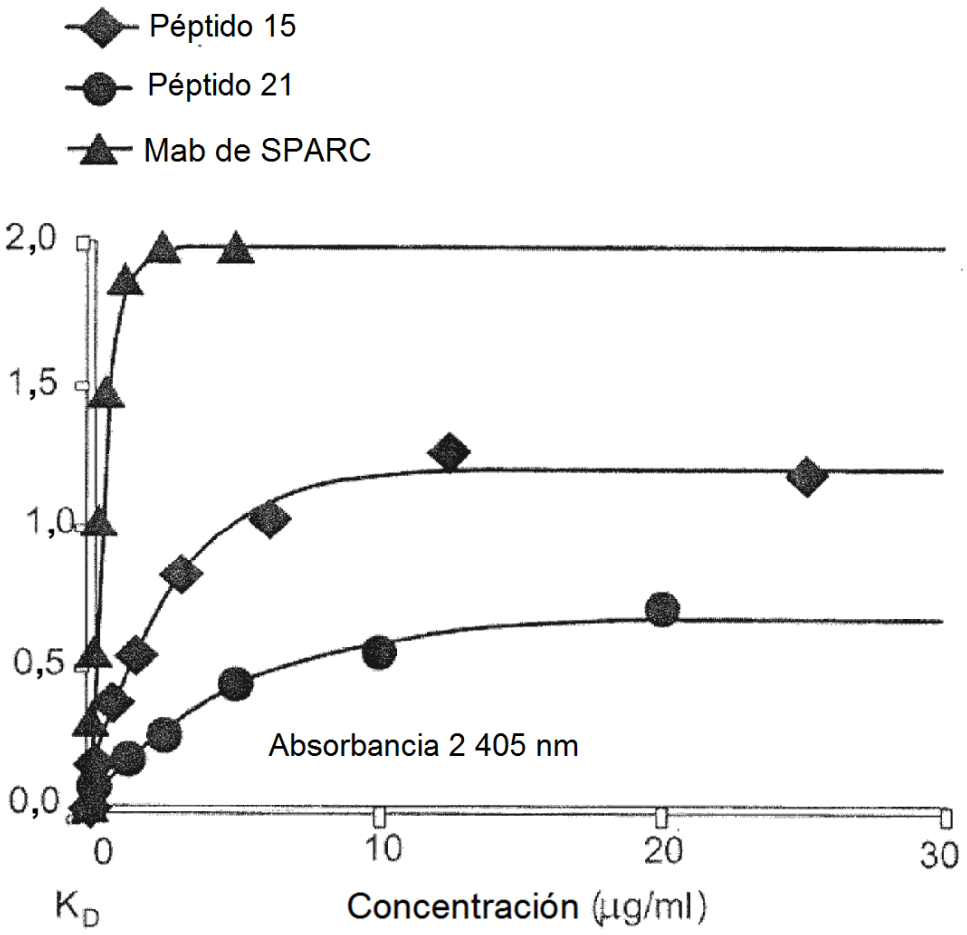

Bloquear, añadir sonda de proteína con marcador adecuado
Lavar, añadir reactivo de detección
Lavar, secar y explorar
Micromatriz de proteína humana ProtoArray®, cada ProtoArray® contiene aproximadamente 8.000 proteínas humanas únicas dispuestas por duplicado en un portaobjetos de vidrio recubierto de nitrocelulosa de 2,54 cm por 7,62 cm

FIG. 9



PD15 = 4,1÷0,8 X 10^{-7} M . N = 3
PD21 = 1,0÷0,7 X 10^{-9} M . N = 3
mAb = 6,2÷3,4 X 10^{-8} M . N = 3

FIG. 10

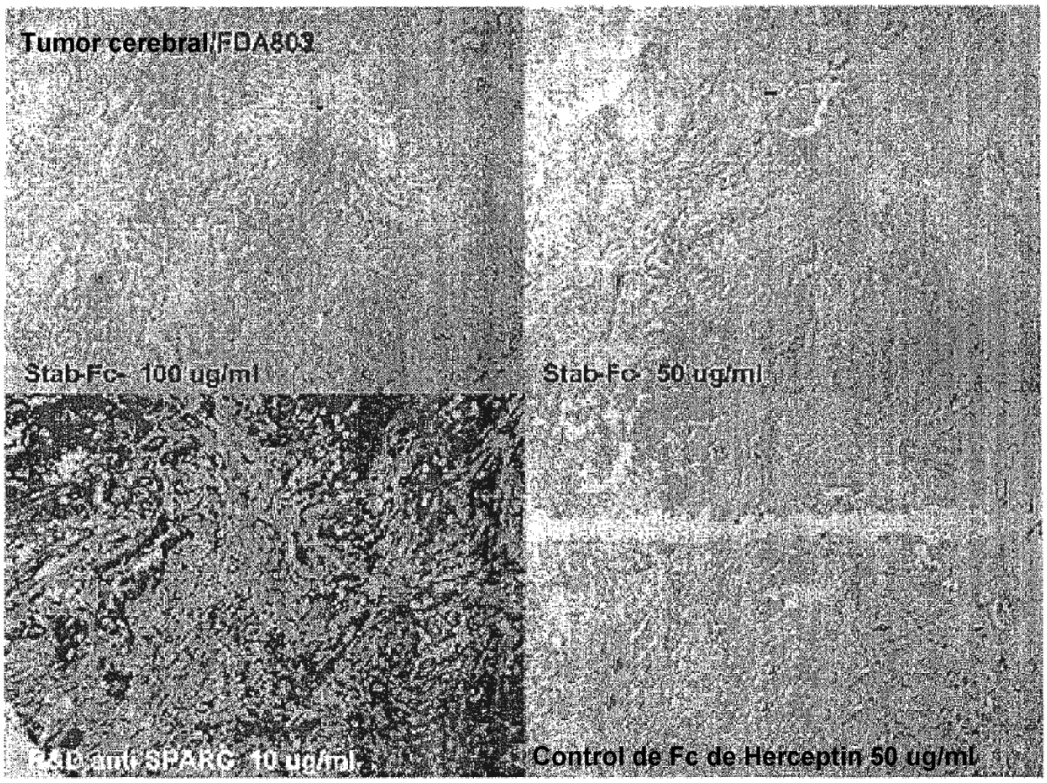

Tumor cerebral/FDA803
Stab-Fc- 100 ug/ml
Stab-Fc- 50 ug/ml
R&D anti-SPARC 10 ug/ml
Control de Fc de Herceptin 50 ug/ml

FIG. 11

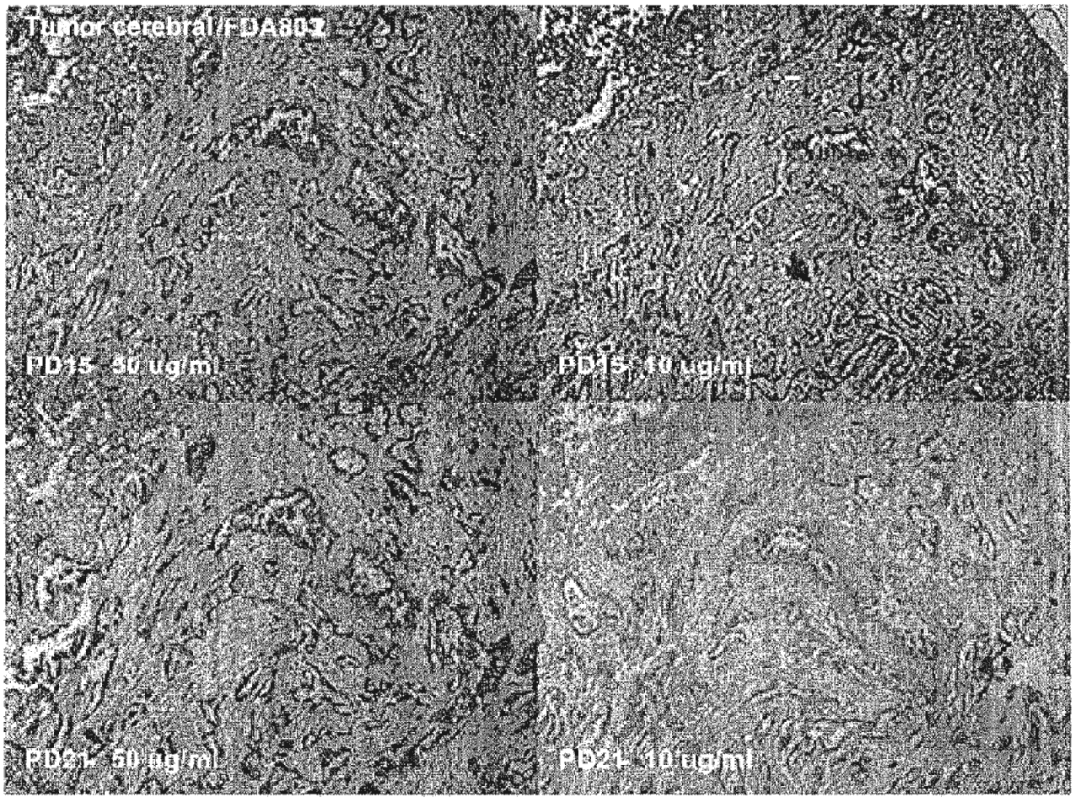

Tumor cerebral/FDA803
PD15 50 ug/ml
PD15 10 ug/ml
PD21 50 ug/ml
PD21 10 ug/ml

FIG. 12

Sitio 2 de Elastina

QGGCQSPAPSCSWAWCWHPWTWSWCRRPWTWSWCWCSWTWSWCWCSWLRGST
SEQ ID NO:145

FIG. 13

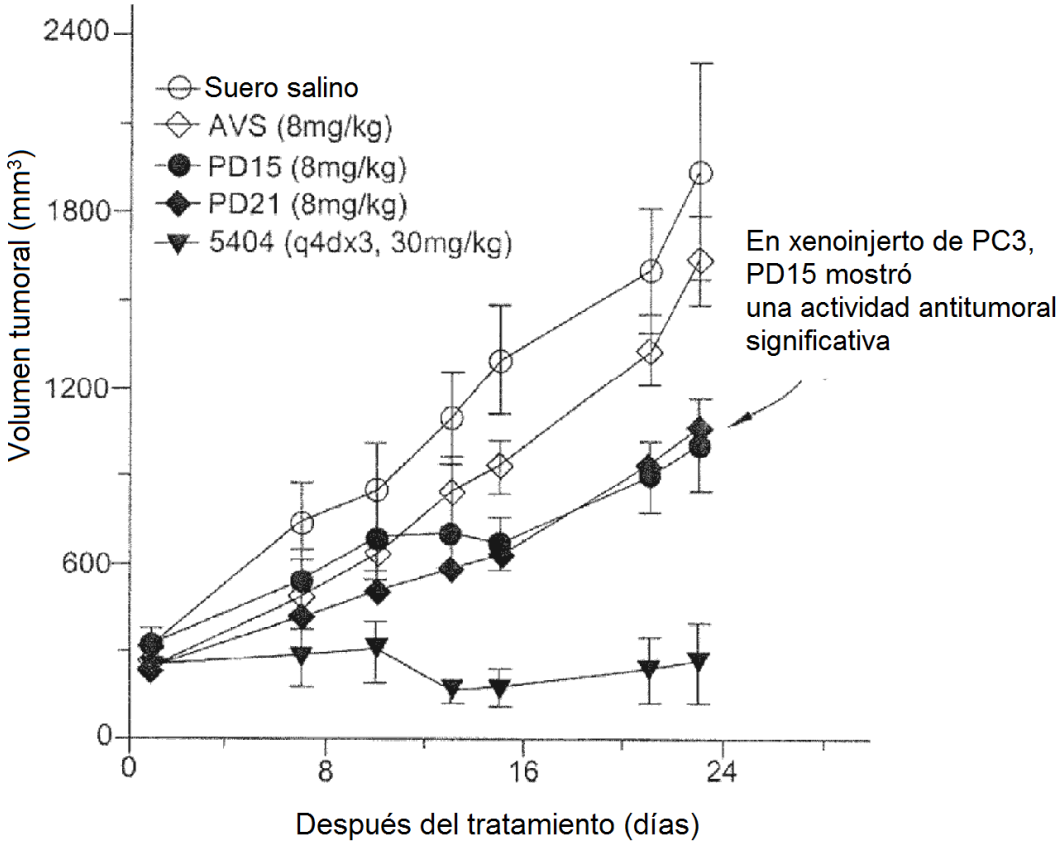

2400
1800
1200
600
0
Volumen tumoral (mm³)
Suero salino
AVS (8mg/kg)
PD15 (8mg/kg)
PD21 (8mg/kg)
5404 (q4dx3, 30mg/kg)
En xenoinjerto de PC3, PD15 mostró una actividad antitumoral significativa
0
8
16
24
Después del tratamiento (días)

FIG. 14

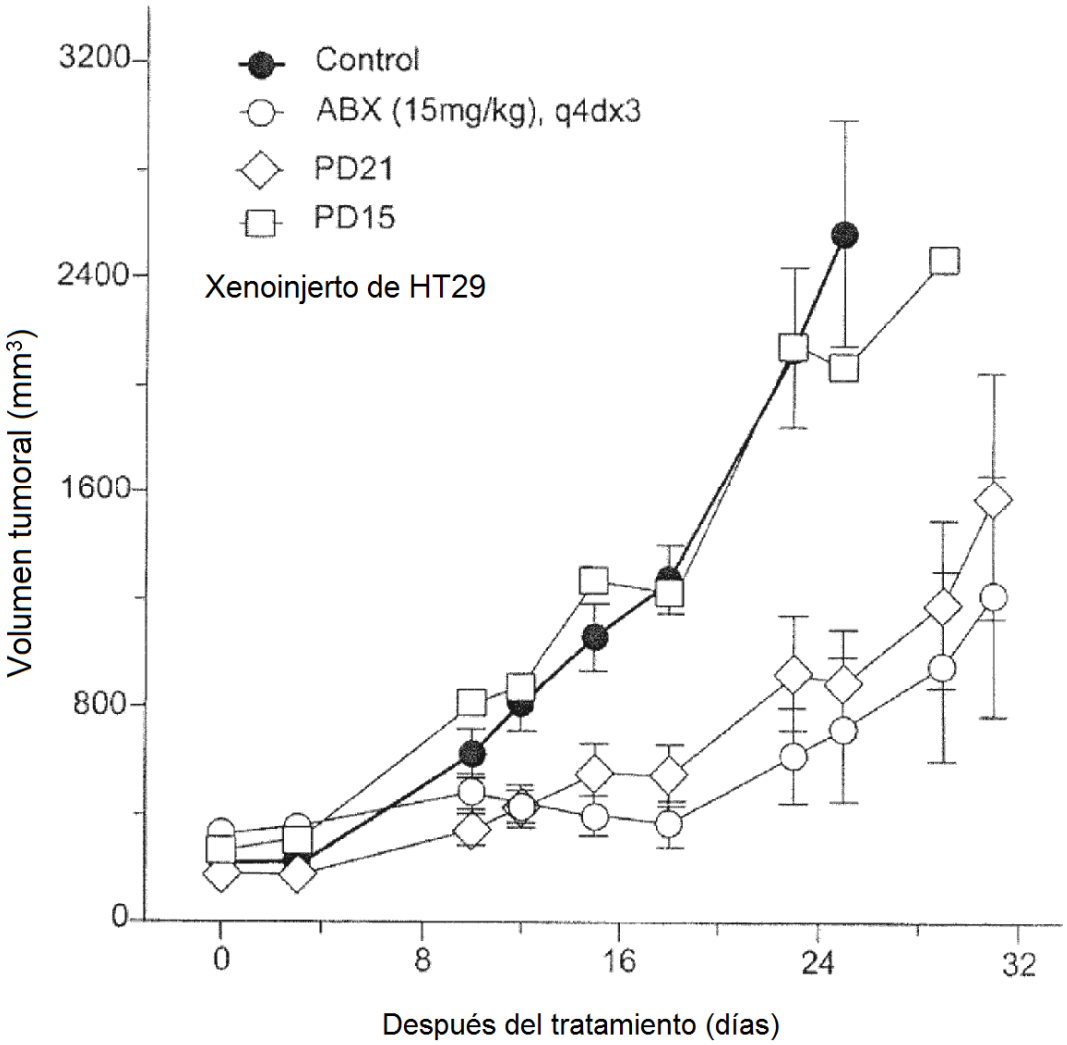

Control
ABX (15mg/kg), q4dx3
PD21
PD15
Xenoinjerto de HT29
Volumen tumoral (mm³)
3200
2400
1600
800
0
0
8
16
24
32
Después del tratamiento (días)

FIG. 15

ScFv 3-1 = SEQ NO: 113

Secuencia 1 (Clon 5)
Secuencia de aminoácidos:

AIRMTQSPSSLSASVGDRVTITCDASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLETGVPSRFSGSGSGTDFTLTI

L1 L2

Pesada Ligera

SSLQPEDFATYYCDQSYSTPYTFGQGTKLDIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTEVQLVQSGAEVKKPGSSVKVS

L3

CKASGGTFSEYAISWVRQAPGQGLEWMGEIIPIFGTANYAQKFQGRVTITADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC

H1 H2

ARDPEDNWGAFDIWGQGTMVTVSSAS

H3

ScFv 3-1

Secuencia 2 (Clon 17)
Secuencia de aminoácidos:

EIVMTQSPGTLSLSPGDRATLSCRASQSVSGYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSGTDFTLTI

L1 L2

Pesada Ligera

SSLQAEDVAVYYCQQYYSTLPTFGQGTKLEIKRSGGSTITSYNVYYTKLSSSGTQVQLVQSGGGVVQPGRPLKLS

L3

CAASGFTFSEYAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC

H1 H2

ARDLSWNDAFDIWGQGTMVTVSSAS

H3

ScFv 3-2

ScFv 3-2 = SEQ NO: 114

FIG. 16

ScFv 2-1 = SEQ NO: 115

Secuencia 1 (Clon 25)
Secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSMITPLGSTTAYADSVKGRFTISRDNSK

H1 H2

Pesada Ligera

NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKRAGVFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVT

H3

ScFv 2-1

TCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASTLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNDSFPT

L1 L2 L3

TFGQGTKVEIKR

Secuencia 2 (Clon 16)
Secuencia de aminoácidos:

EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGKGLEWVSHIQGQGRATYYADSVKGRFTISRDNSK

H1 H2

Pesada Ligera

NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKTHGKFDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSTDIQMTQSPSSLSASVGDRVT

H3

ScFv 2-2

ITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRASRLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQPSGVPT

L1 L2 L3

TFGQGTKVEIK

ScFv 2-2 = SEQ NO: 116