

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 651 113**

51 Int. Cl.:

C07K 19/00 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 15/63 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01)
A61K 38/16 (2006.01)
A61P 19/00 (2006.01)
A61P 25/00 (2006.01)
A61P 27/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **25.06.2013 PCT/US2013/047550**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2014 WO14004465**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **25.06.2013 E 13808681 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.09.2017 EP 2864360**

54 Título: **Tratamientos terapéuticos dirigidos**

30 Prioridad:

25.06.2012 US 201261663679 P

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

24.01.2018

73 Titular/es:

**THE BRIGHAM AND WOMEN'S HOSPITAL, INC.
(100.0%)
75 Francis Street
Boston MA 02115, US**

72 Inventor/es:

**LEE, RICHARD, T.;
PATWARI, PARTH;
LOFFREDO, FRANCESCO y
PANCOAST, JAMES**

74 Agente/Representante:

CARPINTERO LÓPEZ, Mario

Observaciones :

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 651 113 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

Tratamientos terapéuticos dirigidos

Campo de la invención

5 La presente invención se refiere en general a procedimientos y composiciones para administrar principios activos, por ejemplo, agentes terapéuticos, mediante conjugación, fusión, o enlace no directo del principio activo a uno o más péptido de unión a heparina (HB). Otros aspectos se refieren a composiciones, procedimientos y kits que comprenden péptidos de unión a heparina (HB) condensados o conjugados con los agentes terapéuticos.

Antecedentes de la invención

10 La administración sistémica o la actividad no específica de agentes terapéuticos, tales como citoquinas recombinantes y moléculas pequeñas, pueden desencadenar secuelas no previstas. De esta forma, sigue existiendo necesidad de una administración dirigida de las moléculas activas al sitio de interés.

El documento US2006/0172931 desvela péptidos de unión a heparina, composiciones y su uso, así como un conjugado que comprende un péptido de unión a heparina conjugado con al menos un principio activo. No obstante, la presente invención se diferencia de dicha solicitud en que los péptidos de unión a heparina son diferentes.

15 El documento WO 2008/023063 desvela un procedimiento para tratar cartilagos y osteoartritis que comprende administrar FGF-18 como principio activo.

El documento US 2007/0081992 desvela una composición para tratar un trastorno neurológico que comprende una proteína de fusión que comprende un BDNF unido covalentemente a una inmunoglobulina.

20 El documento WO 1993/019770 desvela un procedimiento para tratar diferentes inflamaciones que comprende aplicar IL-4 e IL-10 como principios activos.

El documento WO 2011/008773 desvela que ANGPTL3 induce la condriogénesis.

Sumario de la invención

25 Las presentes realizaciones proporcionan la liberación selectiva de proteínas terapéuticas recombinantes o moléculas pequeñas a células o tejidos que expresan proteoglicanos, por ejemplo, aunque no de forma limitativa a cartílago, tejido del cerebro y de la médula espinal, piel y tejido subcutáneo. Más específicamente, algunas realizaciones del presente documento se dirigen a novedosos péptidos de unión a heparina (HB) condensados con una proteína terapéutica o porción de la misma, opcionalmente mediante un péptido enlazador. Algunas realizaciones proporcionan la conjugación o la unión indirecta de moléculas pequeñas a HB novedosos para su administración selectiva. Las composiciones de HB-agente se pueden usar en tándem para la administración de proteínas y agentes terapéuticos a tejidos.

30 Un aspecto de la presente invención proporciona una composición terapéutica selectiva que comprende, por ejemplo, $(\text{HB-enlazador})_n\text{-X}_m\text{-(enlazador-HB)}_o$, donde HB es una proteína de unión a heparina, X es un principio activo tal como una proteína terapéutica o una parte de la misma, o un molécula pequeña terapéutica, y donde n, m, y o son números enteros, y m es al menos uno y n+o es al menos uno. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X es HB-X_n , o $(\text{HB-enlazador})_n\text{-X}_n$, y donde n es un número entero de al menos 1. En algunas realizaciones, la composición es una proteína de fusión recombinante que comprende una HB recombinante y la proteína terapéutica (o fusión de la misma). En una ilustración de la divulgación, los componentes de la composición se pueden colocar en orden, con respecto al extremo N de la parte HB de la composición: HB-X, X-HB, HB-enlazador-X, $(\text{HB-enlazador})_2\text{-X}$, X-enlazador-HB, X-HB-X, $\text{HB}_n\text{-X-HB}_n$, $(\text{HB-enlazador})_n\text{-X-(enlazador-HB)}_n$, HB-X-HB-X, etc.

40 Los componentes de la composición se colocan en orden, con respecto al extremo N de la parte HB de la composición: HB-X, X-HB, HB-enlazador-X, $(\text{HB-enlazador})_2\text{-X}$, X-enlazador-HB, $\text{HB}_n\text{-X-HB}_n$ $(\text{HB-enlazador})_n\text{-X-(enlazador-HB)}_n$, HB-X-HB-X, etc. Adicionalmente, la composición puede comprender una mezcla de construcciones HB-X, en la que X representa diferentes proteínas o moléculas pequeñas (es decir, una composición que comprende HB-X^1 y HB-X^2 , etc.). Un enlazador ilustrativo es un péptido que comprende los aminoácidos GGG. Otros enlazadores habitualmente conocidos en la técnica están abarcados para su uso en el conjugado HB-X, tales como enlazadores peptídicos conocidos y enlazadores químicos.

45 Más específicamente, la parte HB de la composición está cargada positivamente a través de numerosos restos lisina y arginina en el péptido HB, que se unen a proteoglicanos celulares o expresados en tejidos que están cargados negativamente mediante grupos sulfato. En realizaciones particulares, el HB está mutado para potenciar la carga positiva mediante la sustitución del resto cisteína natural por un resto arginina o lisina. Por ejemplo, en una ilustración de la divulgación, se puede seleccionar un HB a partir de los siguientes péptidos que tienen las secuencias de restos de aminoácidos: KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO: 1); KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2) (también denominada como HB C16R); o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO: 3) (también denominada como C16K de HB), o variantes funcionales, análogos o derivados de los mismos. En la invención, HB se puede seleccionar entre las SEQ ID NOS: 2-3.

55 Adicionalmente, la parte HB de la composición se puede repetir, opcionalmente, con un péptido enlazador que conecta los péptidos HB. Por tanto, por ejemplo, usando SEQ ID NO: 2 como una parte HB ilustrativa, una molécula

terapéutica puede comprender o estar unida a los siguientes aminoácidos: KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:4) o KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGGKGLGKK RDPRLRKYK (SEQ ID NO: 5). Los péptidos enlazadores habitualmente conocidos del experto en la materia están abarcados para su uso en la presente invención, por ejemplo, tales como los desvelados en el presente documento. En algunas realizaciones, un péptido enlazador comprende GGG. En algunas realizaciones, un péptido enlazador comprende (GGGS) (SEQ ID NO: 42).

En algunas realizaciones, un principio activo o fusión HB recombinante se puede seleccionar entre factores neurotróficos, incluidas neurotrofinas tales como el factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), o factor neurotrófico de dopamina (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial tales como el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), o persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas tales como interleuquina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, o factor de crecimiento de fibroblastos 2; las citoquinas antiinflamatorias incluyen interleuquina-4 e interleuquina-10; agentes de neuroprotección incluyen neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); u otras proteínas terapéuticas tales como Cerebrolysin® (FPF-1070), factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11), factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1), miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1RA, factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2, también conocida como secuencia 2 del grupo de alta movilidad (HMGB2)); un anticuerpo terapéutico o parte del mismo, tal como REMICADE® (infliximab, anti-TNF- α , Janssen Biotech, Horsham, PA), HUMIRA® (adalimumab, anti-TNF, Abbot Labs., N. Chicago, IL), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF, Amgen, Thousand Oaks, CA), o un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF β , tales como TGF β , TGF β 3, BMP2, o BMP7; angiopoyetina tipo 3 (ANGPTL3), somatostatina (SST) o partes funcionales, variantes, análogos o derivados de cualquiera de estos.

En algunas realizaciones, la porción terapéutica de la proteína de la fusión HB se selecciona de IGF-1, PTH, PTHrP, IL-1RA, FGF-18, o partes funcionales, análogos, o derivados de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o enfermedad) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB-X, donde X es una proteína terapéutica o parte de la misma, en la que la proteína terapéutica se selecciona de IGF-1, PTH, PTHrP, IL-1RA, FGF-18, un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso, FGF-9, factor de crecimiento de hepatocitos, TGF β , TGF β 3, BMP2, BMP7, o partes funcionales, análogos, o derivados de los mismos.

En otra realización particular, HB se fusiona con el receptor glucocorticoideo, lo que facilita la administración dirigida de corticoesteroides al cartílago; cuya administración se puede llevar a cabo simultáneamente o por separado de la administración de un corticoesteroide.

En algunas realizaciones, la dolencia del cartílago es un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, o raquitismo hipofosfatémico vinculado a X, o artritis idiopática juvenil. El tratamiento de la dolencia del cartílago se puede combinar con otros tratamientos como adyuvante de otras intervenciones quirúrgicas par reparación del daño articular, reparación del menisco, o reparación de ligamentos, con el fin tanto de mejorar la reparación como de prevenir el desarrollo de artrosis.

Otro aspecto de la presente invención proporciona el tratamiento de una dolencia neurológica (por ejemplo, una enfermedad o trastorno) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB-X, donde X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neurregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IGF o factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1).

La enfermedad neurodegenerativa se puede seleccionar entre enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, degeneración de nervios periféricos, ictus, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, neuropatía diabética, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewis, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva,

trastornos priónicos, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, paraparesis espástica hereditaria, atrofias espinocerebelares, ataxia de Friedreich, amiloidosis, o síndrome de Charcot Marie Tooth.

- 5 Otra realización proporciona la administración de una composición de HB-X para el tratamiento de enfermedades oculares tales como úlcera de la córnea, abrasión de la córnea, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratoconjuntivitis seca, inflamación coriorretinal, cicatrices coriorretinales, degeneración coroidal, distrofia coroidal hereditaria, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de la retina, degeneración macular, membrana epirretinal, degeneración periférica de la retina, distrofia retinal hereditaria, retinitis pigmentosa, xeroftalmia, o hemorragia retinal.
- 10 Otro aspecto de la presente invención proporciona un procedimiento para tratar, la inflamación que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB-X, donde X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4, o interleuquina-10.
- 15 En otra realización de la invención, el HB-X se proporciona en un vehículo de liberación sostenida, tal como ácido hialurónico, para extender la liberación y el efecto fisiológico de la composición de HB-X.

Descripción de los dibujos

20 La **Figura 1** proporciona datos que muestran la retención a largo plazo de una realización de HB-IGF-1 tras inyección intraarticular. Se llevó a cabo un análisis mediante transferencia Western sobre el IGF-1 o HB-IGF-1 retenido en cartílago articular, menisco, o tendón rotuliano de rata a 2, 4, 6, y 8 días después de la inyección intraarticular de cualquiera de IGF-1, HB-IGF-1, o PBS.

25 La **Figura 2** muestra los niveles séricos de IGF-1 vs. HB-IGF-1 después de la inyección intraarticular. Ratas Lewis macho de 251-275 g (Charles River, Wilmington MA) se asignaron aleatoriamente a uno de tres grupos (n=3 para cada grupo) de HB-IGF-1, IGF-1 o suero salino. Las ratas recibieron inyecciones intraarticulares de 50 µl que contenían bien 100 µg de HB-IGF-1, 100 µg de IGF-1, o suero salino en la articulación de la rodilla derecha. Se extrajo sangre de la vena de la cola a 2, 4, 8, 24, 48, y 96 horas después de la inyección. Los niveles séricos se midieron con un ELISA (R&D Systems, Mineápolis, MN). Los niveles de HB-IGF-1 en suero fueron significativamente inferiores a los niveles de IGF-1 en los tres primeros puntos temporales. los niveles de HB-IGF-1 no fueron significativamente diferentes de los del suero salino después de 2 horas. Esto muestra que la inyección intraarticular de HB-IGF-1 limita la cantidad de IGF-1 no específico en circulación, comparado con el IGF-1 no asociado a HB.

30 La **Figura 3** es un gráfico de barras que representa gráficamente la estimulación *ex vivo* sostenida de la biosíntesis y proliferación del cartílago mediante HB-IGF-1 después de la inyección intraarticular en ratas. Las ratas recibieron una sola inyección intraarticular de 50 µl que contenía bien 100 µg de una realización de HB-IGF-1, 100 µg de IGF-1, o PBS en la articulación de la rodilla derecha. Las ratas se sacrificaron 2 y 4 días después de la inyección, y los meniscos se recogieron y se cultivaron con radiomarcas. Los gráficos representan la incorporación de sulfato [³⁵S] en el menisco 2 y 4 días después inyección intraarticular. Los resultados se muestran como promedio ± SEM.

35 La **Figura 4** es un gráfico de barras de un estudio sobre artrosis que compara puntuaciones OARSI de HB-IGF-1, IGF-1, y PBS.

40 La **Figura 5** muestra la expresión superior de HB-IGF-1 soluble que comprende péptidos HB potenciados (HBp): C17K (SEQ ID NO:22) y C17R (SEQ ID NO: 21). La Figura 5 muestra una transferencia Western que utiliza un anticuerpo dirigido contra IGF-1 para detectar la presencia de IGF1 tras la incubación de explantes de cartílago con diferentes variantes de fusión de HB-IGF-1, donde las variantes de HB incluyen C17K (SEQ ID NO:22); C17R (SEQ ID NO: 21), C17S (SEQ ID NO: 41), HB natural (SEQ ID NO: 20). La Figura 5 muestra que las proteínas de fusión IGF-1 que comprenden las variantes C17K (SEQ ID NO:22) o C17R (SEQ ID NO: 21) dan como resultado mayor retención de IGF-1 en el cartílago en comparación con las variantes C17S (SEQ ID NO: 41) y HB natural (SEQ ID NO: 1).

45 La **Figura 6** muestra el superior rendimiento en la purificación de HB-IGF-1 soluble con una proteínas de fusión HB HB-IGF-1 que comprende las variantes C17R (SEQ ID NO: 21) HB. La Figura 6 muestra una transferencia Western usando un anticuerpo dirigido contra IGF-1 derivado de extractos de cartílago purificados mediante cromatografía de exclusión por tamaño para detectar el rendimiento de IGF1 tras incubación de explantes de cartílago con las variantes de fusión de HB-IGF1 que comprenden bien el péptido C17R (SEQ ID NO: 21) o el péptido HB natural (SEQ ID NO: 20). La Figura 6 muestra un rendimiento de IGF-1 significativamente mayor a partir de extractos incubados con proteínas de fusión C17R de HB(C17R)-IGF-1 en comparación con las proteínas de fusión HB(WT)-IGF-1.

50 La **Figura 7** muestra que HB (C17R) permite un rendimiento superior de HB-IGF1 a partir de cuerpos de inclusión. La Figura 7 muestra una transferencia Western usando un anticuerpo dirigido contra IGF-1 derivado de extractos de cartílago purificados a partir de cuerpos de inclusión para detectar el rendimiento de IGF1 tras incubación de explantes de cartílago con las variantes de fusión de HB-IGF1 que comprenden bien el péptido C17R (SEQ ID NO: 21) (al que se hace referencia como HBe) o el péptido HB natural (SEQ ID NO: 20). La Figura 7 muestra un rendimiento significativamente mayor de IGF-1 en cuerpos de inclusión inducidos y no inducidos obtenidos a partir de las proteínas de fusión HB(C17R)-IGF-1 (HBp-IGF-1) en comparación con los

extractos incubados con las proteínas de fusión HB(WT)-IGF-1 (wHB-IGF-1).

La **Figura 8** muestra una transferencia Western de la retención de IGF-1 en médula espinal incubada con HB-IGF-1. Tejido de médula espinal de rata se incubó durante 24 horas en medio sin adiciones (sin IGF-1), 1 ug/ml de IGF-1, o 1 ug/ml de HB-IGF-1. Después de la incubación, el tejido se lavó y bien se congeló inmediatamente ("Día 0") o bien se incubó durante 24 horas más en medio fresco antes de la recogida para eliminar las proteínas por lavado ("Día 1"). A continuación, los tejidos se analizaron mediante transferencia Western con un anticuerpo dirigido contra IGF1 para detectar la presencia de IGF-1 o HB-IGF-1 remanente en el tejido de la espina dorsal.

Las **Figuras 9A-9B** muestran la retención de PTH en discos de cartílago incubados con PTH-HB. Los discos del cartílago se incubaron en el medio sin adición de péptido ("Sin PTH"), hormona paratiroidea 1-34 ("PTH"), o una hormona paratiroidea de fusión 1-34 con un dominio HB ("PTH-HB"). La **Figura 9A** muestra el péptido control de la cantidad de PTH o PTH-HB añadidos a los explantes de disco de cartílago. Después de 24 horas, los discos de cartílago se lavaron y se devolvieron para incubación en medio fresco en ausencia de péptido. La **Figura 9B** muestra una transferencia Western con un anticuerpo dirigido contra PTH en extractos de tejido de cartílago dos días después del lavado, mostrando que PTH solamente está retenido en los discos de cartílago incubados con PTH-HB pero no con el PTH fusionado.

Descripción detallada de la invención

La presente invención se refiere a la conjugación de péptidos de unión a heparina (HB) con un principio activo (por ejemplo, X) para la administración selectiva del principio activo a una célula o tejido que expresan proteoglicanos. En algunas realizaciones, el conjugado HB-principio activo se puede usar para administrar el principio activo a células o tejidos que expresan proteoglicanos, por ejemplo, aunque no de forma limitativa a cartílago, tejido del cerebro y la médula espinal, piel y tejido subcutáneo.

Más específicamente, en una ilustración de la divulgación, algunas de las realizaciones del presente documento se dirigen a péptidos de unión a heparina (HB) de SEQ ID NO: 1-3 o SEQ ID NO: 20-22. En algunas realizaciones de la invención, las SEQ ID NOS: 2-3 o SEQ ID NOS: 21-22 están fusionadas con un principio activo que es una proteína terapéutica o una parte de la misma, opcionalmente mediante un péptido enlazador. En algunas realizaciones de la invención, el principio activo es una molécula pequeña, que permite la administración de la molécula pequeña a células y tejidos que comprenden proteoglicanos, donde un péptido HB de la SEQ ID NO: 2-3 o SEQ ID NO: 21-22 se puede conjugar a la molécula pequeña mediante enlace directo o indirecto (por ejemplo, uso de enlazadores químicos). En algunas realizaciones, las composiciones que comprenden conjugados de HB-X se pueden usar para administrar una o varios múltiples proteínas o agentes terapéuticos diferentes a tejidos y células que expresan proteoglicanos.

Un aspecto ilustrativo de la presente divulgación proporciona una composición terapéutica selectiva que comprende HB- X_n , o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , donde HB es una proteína de unión a heparina, X es un principio activo tal como una proteína terapéutica o una parte de la misma, o un molécula pequeña terapéutica y n es un número entero de al menos 1.

La composición de la invención de uno cualquiera de los párrafos anteriores se pueden ilustrar en los que X es una proteína seleccionado de factores neurotróficos; neurotrofinas; factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); o persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas; interleuquina-6; interleuquina-11; interleuquina-27; factor inhibidor de leucemia; factor neurotrófico ciliar; cardiotrofina 1; neuropoyetina; citoquina de tipo cardiotropina; factor de crecimiento de fibroblastos 2; citoquinas antiinflamatorias; interleuquina-4; interleuquina-10; agentes neuroprotectores; neuregulina-1; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolisin® (FPF 1070), Etanercept (Enbrel®, receptor de TNF recombinante 2 soluble fusionado al componente Fc de la inmunoglobulina humana G1); factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11); factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1); miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); hormona paratiroidea (HPT); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2, también conocida como secuencia 2 del grupo de alta movilidad (HMGB2)); receptor glucocorticoideo; un anticuerpo terapéutico o parte del mismo, tal como Remicade® (infiximab, anti-TNF- α , Janssen Biotech, Horsham, PA), Humira® (adalimumab, anti TNF, Abbot Labs., N. Chicago, IL), o un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF 9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF β , tales como TGF β , TGF β 3, BMP2, o BMP7; u otras proteínas terapéuticas; o partes funcionales, variantes, análogos, o derivados de cualquiera de los anteriores; o principios activos de molécula pequeña.

Un aspecto particular de la presente invención proporciona una composición terapéutica selectiva que comprende HB- X_n , o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , donde HB es una proteína de unión a heparina, seleccionados entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21), KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22); X es un principio activo seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la

familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6; interleuquina-11; interleuquina-27; factor inhibidor de leucemia; factor neurotrófico ciliar; cardiotrofina 1; neuropoyetina; citoquina de tipo cardiotropina; factor de crecimiento de fibroblastos 2; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre interleuquina-4 e interleuquina-10 del receptor 2 de TNF; neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF-1070); factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11); factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1); miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una parte de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos:RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGI HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTA

MEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infliximab, anti-TNF- α), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF- β seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, clorprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluzacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, flucortin butilo, flucortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbat, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona; somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®); un principio activo de molécula pequeña seleccionado entre TR2-01829 o PRO 1, 2-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) o kartogenina y n es un número entero de al menos 1.

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición que comprende además un enlazador, en la que la composición está representada por (HB-enlazador)_n-X_n.

Un aspecto de la presente invención proporciona una composición en la que X es un principio activo seleccionado entre factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una parte de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA, IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos:RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPIEPHALFLGI HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTA

MEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18).

En algunas realizaciones, la composición es una proteína de fusión recombinante que comprende una HB recombinante y la proteína terapéutica (o fusión de la misma). Cualquier combinación de un péptido HB seleccionado del grupo de las SEQ ID NO: 2-3 o 21-22 se puede usar con cualquier combinación de un principio activo, con o sin la presencia de una proteína enlazadora, donde el péptido HB se puede situar en el extremo N y/o C del principio activo, y hay uno o múltiples enlazadores peptídicos HB unidos al extremo N y/o C del principio activo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fusión o conjugado puede comprender (HB-enlazador)_n-X_m-(enlazador-HB)_o, donde n, m, y o son números enteros, y m es al menos uno y n+o es al menos uno. En algunas realizaciones ilustrativas de la invención, el péptido HB se selecciona entre el grupo de la SEQ ID NO: 2-3 o 21-22.

En algunas realizaciones ilustrativas de la divulgación, los componentes de la composición se pueden colocar en orden, con respecto al extremo N de la parte HB de la composición: HB-X, X-HB, HB-enlazador-X, (HB-enlazador)₂-X, X-enlazador-HB, X-HB-X, HB_n-X-HB_n, (HB-enlazador)_n-X-(enlazador-HB)_n, HB-X-HB-X, etc.

En algunas realizaciones, los componentes de la composición se pueden colocar en orden, con respecto al extremo N de la parte HB de la composición: HB-X, X-HB, HB-enlazador-X, (HB-enlazador)₂-X, X-enlazador-HB, HB_n-X-HB_n, (HB-enlazador)_n-X-(enlazador-HB)_n, HB-X-HB-X, etc. Adicionalmente, la composición puede comprender una mezcla de construcciones HB-X, en la que X representa diferentes proteínas o moléculas pequeñas (es decir, una composición que comprende HB-X¹ y HB-X², etc.). Un enlazador ilustrativo es un péptido que tiene los aminoácidos GGG.

Debe entenderse que la presente invención no está limitada a la metodología, protocolos, y reactivos concretos, etc.,

descritos en el presente documento y como tal puede variar. La terminología utilizada en el presente documento tiene como fin únicamente describir realizaciones particulares, y no se pretende que limite el ámbito de la presente invención, que está definido únicamente por las reivindicaciones. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención. Todas las ID génicas se refieren a genes humanos, a menos que se indique de otra manera, disponibles en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI).

Tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones, las formas singulares incluyen las referencias plurales y viceversa, salvo que el contexto indique claramente otra cosa. El término "o" es inclusivo salvo que esté modificado, por ejemplo, por "cualquiera de". Excepto en los ejemplos operativos, o donde se indique lo contrario, todos los números que expresan cantidades de ingredientes o condiciones de reacción utilizados en el presente documento deben entenderse como modificados en todos los casos por el término "aproximadamente". Se debe entender además que todos los tamaños de bases o tamaños de aminoácidos, y todos los valores de pesos moleculares o de masas moleculares, proporcionados para los ácidos nucleicos o para los polipéptidos son aproximados, y se proporcionan como descripción.

Todas las patentes y otras publicaciones identificadas con el fin de describir y desvelar, por ejemplo, las metodologías descritas en dichas publicaciones que deberían utilizarse vinculadas a la presente invención. Estas publicaciones se proporcionan únicamente para su divulgación antes de la fecha de presentación de la presente solicitud. Nada a este respecto debe considerarse como una admisión de que los inventores no tienen el derecho de anteceder dicha divulgación en virtud a una invención anterior, o por cualquier otro motivo. Todas las declaraciones, como la fecha o representación, así como el contenido de dichos documentos está basada en la información disponible para los solicitantes, y no constituye ninguna admisión sobre la exactitud de las fechas o el contenido de estos documentos.

La presente invención proporciona la administración selectiva de principios activos y restos terapéuticos, por ejemplo, proteínas o moléculas pequeñas, a tejidos concretos con los que se asocia la proteína de unión a heparinas. Más específicamente, las presentes realizaciones proporcionan novedosos motivos proteínicos de unión a heparina (HB) que están unidos o fusionados con un resto terapéutico, tal como una molécula pequeña, o una citoquina, o factor de crecimiento, o parte funcional del mismo.

Definiciones

Por comodidad de uso, algunos términos empleados en toda la solicitud (incluida la memoria descriptiva, ejemplos y reivindicaciones adjuntas) se recopilan en este momento. Salvo que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en el presente documento tienen el mismo significado que el que entiende comúnmente una persona normalmente experta en la técnica a la cual pertenece la presente invención.

El término "proteína" se pueden utilizar de forma indistinta con "polipéptido" para referirse a un polímero de restos de aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Normalmente, una proteína o polipéptido tiene una longitud mínima de al menos 25 aminoácidos. El término "polipéptido" y "proteína" puede abarcar una proteína multimérica, por ejemplo, una proteína que contiene más de un dominio o subunidad. El término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere de forma típica a un polímero de aminoácido unido mediante enlaces peptídicos que contiene menos de 25 aminoácidos, por ejemplo, entre aproximadamente 4 aminoácidos y aproximadamente 25 aminoácidos de longitud. Las proteínas y péptidos pueden estar compuestos de aminoácidos linealmente dispuestos unidos mediante enlaces peptídicos, tanto si se producen de forma biológica, recombinante, o sintética, y si están compuestos por aminoácidos de origen natural o no natural, están incluidos dentro de esta definición. Tanto las proteínas de longitud completa como los fragmentos de las mismas de más de 25 aminoácidos están abarcados en la definición de proteína. Los términos también incluyen polipéptidos que tienen modificaciones cotraduccionales (por ejemplo, escisión de péptidos señal) y modificaciones posteriores a la traducción del polipéptido, tales como, por ejemplo, formación de enlaces disulfuro, glicosilación, acetilación, fosforilación, lipidación, escisión proteolítica (por ejemplo, escisión con metaloproteasas), y similares. Por otro lado, tal como se usa en el presente documento, un "polipéptido" se refiere a una proteína que incluye modificaciones, tales como deleciones, adiciones y sustituciones (generalmente de tipo conservativo, como conoce un experto en la materia) en la secuencia natural, siempre que la proteína mantenga la actividad deseada. Estas modificaciones pueden ser deliberadas, tales como la mutagénesis dirigida al sitio, o pueden ser accidentales, tales como mediante mutaciones en hospedadores que producen las proteínas, o errores debidos a amplificación mediante PCR u otros procedimientos de ADN recombinante. Los polipéptidos o proteínas están compuestos por aminoácidos linealmente dispuestos unidos mediante enlaces peptídicos, pero a diferencia de los péptidos, tienen una conformación bien definida. Las proteínas, en oposición a los péptidos, consisten por lo general en cadenas de 25 o más aminoácidos. Para los fines de la presente invención, el término "péptido" tal como se usa en el presente documento se refiere a una secuencia de aminoácidos constituida por una sola cadena de aminoácidos D o L o una mezcla de aminoácidos D y L unidos por enlaces peptídicos. De manera general, los péptidos contienen al menos dos restos de aminoácidos y tienen menos de aproximadamente 25 aminoácidos de longitud.

Se apreciará que las proteínas, polipéptidos, o péptidos contienen frecuentemente aminoácidos diferentes a los 20 aminoácidos habitualmente denominados como los 20 aminoácidos de origen natural (por ejemplo, aminoácidos

sintéticos de origen no natural) y que muchos aminoácidos, incluidos los aminoácidos de los extremos, pueden estar modificados en un polipéptido dado, tanto según procesos naturales tales como glicosilación y otras modificaciones posteriores a la traducción, o según técnicas de modificación química que son bien conocidas en la materia. Las modificaciones conocidas que pueden estar presentes en los polipéptidos de la presente invención incluyen, aunque no de forma limitativa, acetilación, acilación, ADP-ribosilación, amidación, unión covalente de flavina, unión covalente de un resto hemo, unión covalente de un polinucleótido o derivado de polinucleótido, unión covalente de un lípido o de un derivado de lípido, unión covalente de un fosfatidilinositol, reticulación, ciclación, formación de enlaces disulfuro, desmetilación, formación de reticulaciones covalentes, formación de cistina, formación de piroglutamato, formulación, gamma-carboxilación, glicación, glicosilación, formación de anclajes GPI, hidroxilación, yodación, metilación, miristoilación, oxidación, procesamiento proteolítico, fosforilación, prenilación, racemización, selenoilación, sulfatación, adición mediada por el ARN de transferencia desde aminoácidos hasta proteínas tales como arginilación, y ubiquitinación.

La incorporación de aminoácidos no naturales, incluidos aminoácidos sintéticos no naturales, aminoácidos sustituidos, o uno o más aminoácidos D en los péptidos HB y/o los péptidos o proteínas del principio activo (u otros componentes de la composición) es deseable en determinadas situaciones. Los péptidos que contienen aminoácidos D muestran una mayor estabilidad *in vitro* o *in vivo* en comparación con formas que contienen aminoácidos L. Por tanto, la construcción de péptidos que incorporan aminoácidos D puede ser especialmente útil cuando se desea, o se necesita, una mayor estabilidad *in vivo* o intracelular. Más específicamente, los péptidos D son resistentes a las peptidasas y proteasas endógenas, proporcionando de esta forma mejor administración oral transepitelial y transdérmica de fármacos y conjugados unidos, biodisponibilidad mejorada de los complejos permanentes en la membrana (véase más adelante para un análisis detallado) y duraciones intravasculares e intersticiales prolongadas cuando estas propiedades son deseables. El uso de péptidos con isómeros D también puede mejorar la administración transdérmica y transepitelial oral de los fármacos enlazados y otras moléculas de carga. Adicionalmente, los péptidos D no se procesan eficazmente en la mayoría de las presentaciones restringidas al complejo de histocompatibilidad mayor de clase II a linfocitos T auxiliares y, por tanto, es menos probable que induzcan respuestas inmunitarias humorales en el organismo completo. De esta forma, se pueden construir conjugados peptídicos usando, por ejemplo, formas de isómeros D de secuencias de péptidos que penetran en la célula, formas de isómeros L de sitios de escisión, y formas de isómeros D de péptidos terapéuticos. En algunas realizaciones, una proteína de fusión HB comprende restos de aminoácidos D y L, ya que el uso de los restos del aminoácido L de origen natural tiene la ventaja de que cualquier producto de descomposición debería ser relativamente no tóxico para la célula o el organismo.

En otra realización adicional, HB-X pueden ser péptidos retroinvertidos. Un "péptido retroinvertido" se refiere a un péptido con una inversión de la dirección del enlace peptídico en al menos una posición, es decir, una inversión del extremo amino y el extremo carboxi con respecto a la cadena lateral del aminoácido. Por tanto, un análogo retroinverso tiene una inversión de sus extremos, y una dirección invertida de los enlaces peptídicos aunque manteniendo aproximadamente la topología de las cadenas laterales análoga a la secuencia del péptido natural. El péptido retroinvertido puede contener aminoácidos L aminoácidos D, o una mezcla de aminoácidos L y aminoácidos D, incluso todos los aminoácidos pueden ser aminoácidos D. Los análogos de péptidos retroinvertidos son polipéptidos en que solo una parte de la secuencia está invertida y sustituida por restos de aminoácidos enantioméricos. Puesto que la parte retroinvertida de este tipo de análogos tienen extremos amino y carboxilo invertidos, los restos de aminoácidos que flanquean la parte retroinvertida están sustituidos por diaminometanos y malonatos geminales α -sustituidos de cadena secundaria, respectivamente. Se ha descubierto que las formas retroinvertidas de los péptidos que penetran en células funcionan igual de eficazmente que las formas naturales en lo que respecta a la translocación a través de una membrana. Las síntesis de análogos de péptidos retroinvertidos se describe en Bonelli, F. y col., *Int J Pept Protein Res.* 24(6):553-6 (1984); Verdini, A y Viscomi, G. C., *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*:697-701 (1985); y la patente de Estados Unidos n.º 6.261.569. Se han descrito procedimientos para síntesis en fase sólida de análogos de péptidos parcialmente retroinvertidos (EP 97994-B).

El término "variante" se refiere a un polipéptido o ácido nucleico que difiere del polipéptido o ácido nucleico de origen natural en una o más deleciones, adiciones, o modificaciones en la cadena lateral de aminoácidos o ácidos nucleicos, pero que retiene una o más funciones o actividades biológicas específicas de la molécula de origen natural. Las sustituciones de aminoácidos incluyen alteraciones en las que un aminoácido está sustituido por un resto de aminoácido de origen natural o no convencional diferente. Dichas sustituciones se pueden clasificar como "conservativas", en cuyo caso, un resto de aminoácido contenido en un polipéptido se sustituye por otro aminoácido de origen natural de carácter similar, tanto en lo que respecta a la polaridad, funcionalidad de la cadena secundaria, o tamaño. Las sustituciones abarcadas en las variantes descritas en el presente documento, también pueden ser "no conservativas", en las que un resto de aminoácido que está presente en un péptido está sustituido por un aminoácido que tiene diferentes propiedades (por ejemplo, la sustitución de un aminoácido hidrófobo o cargado por alanina) o, como alternativa, en el que un aminoácido de origen natural está sustituido por un aminoácido no convencional. También abarcado en el término "variante" cuando se usar en referencia a un polinucleótido o polipéptido, son variaciones en la estructura primaria, secundaria o terciaria, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de referencia, respectivamente (por ejemplo, en comparación con un polinucleótido o polipéptido de tipo natural).

Las variantes pueden incluir cambios conservativos o no conservativos en los aminoácidos, como se describe a

continuación. Los cambios en los polinucleótidos pueden dar como resultado sustituciones, adiciones, deleciones, fusiones y truncamientos en el polipéptido codificado por la secuencia de referencia. Las variantes también pueden incluir inserciones, deleciones o sustituciones de aminoácidos, incluidas inserciones y sustituciones de aminoácidos y otras moléculas) que normalmente no se producen en la secuencia peptídica que es la base de la variante, por ejemplo, pero sin limitarse a, la inserción de ornitina que no suele aparecer en las proteínas humanas. Las "sustituciones de aminoácidos conservativas" son el resultado de la sustitución de un aminoácido por otro que tienen propiedades estructurales y/o químicas similares. Las tablas de sustituciones conservativas que proporcionan aminoácidos funcionalmente similares son bien conocidas en la técnica. Por ejemplo, cada uno de los seis grupos siguientes contiene aminoácidos que son sustituciones conservativas entre sí: (1) Alanina (A), Serina (S), Treonina (T); (2) Ácido aspártico (D), Ácido glutámico (E); (3) Asparagina (N), Glutamina (Q); (4) Arginina (R), Lisina (K); (5) Isoleucina (I), Leucina (L), Metionina (M), Valina (V); y (6) Fenilalanina (F), Tirosina (Y), Triptófano (W). Véase, por ejemplo, Creighton, PROTEINS (W.H. Freeman & Co., 1984). La selección de aminoácidos conservativos puede realizarse dependiendo de la ubicación del aminoácido a sustituir en el péptido, por ejemplo, si el aminoácido está en el exterior del péptido y expuesto a disolventes, o en el interior y no expuesto a disolventes. En algunas realizaciones, los polipéptidos que incluyen sustituciones de aminoácidos no conservativas también están abarcados por el término "variantes". Tal como se usa en el presente documento, la expresión "sustitución no conservativa" se refiere a la sustitución de un resto de aminoácido por un resto de aminoácido diferente que tiene diferentes propiedades químicas. Los ejemplos no limitantes de sustituciones no conservativas incluyen el ácido aspártico (D) sustituido por glicina (G); asparagina (N) sustituida por lisina (K); y alanina (A) sustituida por arginina (R). La selección de dichas sustituciones de aminoácidos conservativas y no conservativas está comprendida en el nivel de conocimientos del experto en la materia.

El término "derivado" se refiere a proteínas o péptidos que se han modificado químicamente, por ejemplo, mediante ubiquitinación, etiquetado, pegilación (derivación con polietilenglicol) o adición de otras moléculas. Una molécula es también un "derivado" de otra molécula cuando contiene restos químicos adicionales que normalmente no forman parte de la molécula. Dichos restos pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, etc. de la molécula. Los restos pueden, como alternativa, disminuir la toxicidad de la molécula, o eliminar o atenuar un efecto secundario indeseable de la molécula, etc. Los restos capaces de mediar dichos efectos se desvelan en REMINGTON'S PHARMACEUTICAL SCIENCES (21ª ed., Tory, ed., Lippincott Williams & Wilkins, Baltimore, MD, 2006).

El término "funcional" cuando se usa junto con "derivado" o "variante" se refiere a una molécula de proteína que posee una actividad biológica que es prácticamente similar a una actividad biológica de la entidad o molécula de la que es un derivado o variante. "Prácticamente similar" en este contexto significa que la actividad biológica de un polipéptido, es al menos un 50% tan activo como la referencia, por ejemplo, un polipéptido de tipo natural correspondiente, por ejemplo, al menos un 60% tan activo, un 70% tan activo, un 80% tan activo, un 90% tan activo, un 95% tan activo, 100% tan activo o incluso superior (es decir, la variante o derivado tiene una actividad más grande que el tipo natural), por ejemplo, un 110% tan activo, 120% tan activo, o más, inclusive.

La expresión "parte funcional" o "fragmento funcional" se refiere a una porción de la molécula natural (por ejemplo, la proteína natural o resto de unión al receptor de una entidad química) que media el mismo efecto que la molécula de longitud completa, por ejemplo, estimula una respuesta celular tal como el crecimiento o afecta a una señal o cascada de señalización relacionada con un efecto fisiológico deseado.

El término "fragmento de un péptido, polipéptido o molécula tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier subconjunto de polipéptido contiguo de la molécula. La expresión "fragmento de proteína", tal como se usa en el presente documento, incluye secuencias de aminoácidos tanto sintéticas como de origen natural que se pueden derivar de la secuencia de aminoácidos de origen natural, por ejemplo, un principio activo de origen natural que es una proteína, o HB (SEQ ID NO:1) o una variante de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3). Se dice que la proteína se puede "derivar de la secuencia de aminoácidos de origen natural" si se puede obtener mediante la fragmentación de la proteína de origen natural, o si se puede sintetizar basándose en un conocimiento de la secuencia de la secuencia de aminoácidos de origen natural o del material genético (ADN o ARN) que codifica esta secuencia. Por consiguiente, un "fragmento" de una molécula, implica denotar cualquier subconjunto de polipéptido de la molécula. Los fragmentos de HB que tienen la actividad de las variantes del péptido HB de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 se desvelan en el presente documento, y que sean solubles también está abarcado para su uso en la presente invención.

Por ejemplo, los fragmentos funcionales de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 útiles en los procedimientos que se desvelan en el presente documento tienen al menos un 30% de la actividad de un polipéptido de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 *in vivo*. Dicho de otra forma, un fragmento de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 es cualquier fragmento que, solo o fusionado con un principio activo, puede dar como resultado al menos un 30% de la misma actividad en comparación con la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 para retener la proteína de fusión-HB en el tejido después de 24 horas tras el lavado como se desvela en el presente documento, cuando una proteína de fusión-HB que comprende la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 se incubaba con un explante de cartílago o explante de médula espinal (como se desvela en los Ejemplos). Un "fragmento" puede tener al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 300 ácidos nucleicos o aminoácidos, comprendidos todos los números enteros del

intervalo. Los fragmentos ilustrativos incluyen truncamientos en el extremo C, truncamientos en el extremo N, o truncamientos en ambos extremos C y N (por ejemplo, deleciones de, por ejemplo, al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5, al menos 8, al menos 10, al menos 15, al menos 20, al menos 25, al menos 40, al menos 50, al menos 75, al menos 100 o más aminoácidos eliminados de los extremos N, los extremos C, o ambos). Un experto en la materia puede crear dichos fragmentos con un mero análisis de deleción. Dicho fragmento de SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3 puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 aminoácidos o más de 10 aminoácidos, eliminados del extremo N y/o el extremo C de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3, respectivamente. En algunas realizaciones, mediante la deleción secuencial de los aminoácidos del extremo N o C de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3, y evaluar la función del fragmento peptídico resultante, solo o fusionado con un principio activo puede identificar un fragmento funcional de HB para su uso en la presente invención. Se pueden crear fragmentos funcionales con múltiples fragmentos más pequeños. Estos se pueden unir colocando enlazadores peptídicos. Los enlazadores se pueden seleccionar fácilmente para mantener la conformación natural. Un experto en la materia puede evaluar fácilmente evaluar la función de un conjugado HB-X para su retención en el tejido y causar un efecto biológico mediante el principio activo X (según se describe en los Ejemplos) en comparación con una proteína de fusión-HB que comprende la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3. Usando un ensayo *in vivo* tal como el ensayo de cartílago que se desvela en los Ejemplos, si el fragmento peptídico HB tiene al menos un 30% de la actividad biológica del HB correspondiente a la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 como se desvela en el presente documento, entonces, el fragmento peptídico de HB de una proteínas de fusión HB(fragmento)-X se considera un HB-fragmento válido utilizado en las proteínas de fusión y los procedimientos que se desvelan en el presente documento. En algunas realizaciones, un fragmento de la SEQ ID NO: 2 r SEQ ID NO:3 puede tener menos de 20, o menos de 15 o menos de 10, o menos de 5 aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO:3. No obstante, como se ha indicado anteriormente, el fragmento debe tener al menos 4 aminoácidos, al menos aproximadamente 9, al menos aproximadamente 15, al menos aproximadamente 20, al menos aproximadamente 30, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 250, al menos aproximadamente 500 ácidos nucleicos o aminoácidos, comprendido cualquier número entero del intervalo.

El término "tipo natural" se refiere a la secuencia de polinucleótidos normal de origen natural que codifica una proteína, o parte de la misma, o secuencia de proteína, o parte de la misma, respectivamente, que existe de manera normal *in vivo*.

El término "mutante" se refiere a un organismo o célula con cualquier cambio en su material genético, en particular un cambio (es decir, deleción, sustitución, adición o alteración) con respecto a una secuencia de polinucleótidos de tipo natural o cualquier cambio relativo a una secuencia de proteínas de tipo natural. El término "variante" se pueden utilizar de forma indistinta con "mutante". Aunque frecuentemente se asume que un cambio en el material genético da como resultado un cambio en la función de la proteína, los términos "mutante" y "láser" se refieren a un cambio en la secuencia de una proteína de tipo natural independientemente de si este cambio altera la función de la proteína (por ejemplo, aumenta, disminuye, transmite una nueva función) o de si dicho cambio no tiene efectos sobre la función de la proteína (por ejemplo, la mutación o variación es silente).

La expresión "prácticamente similar," cuando se usa en referencia a una variante o proteína o péptido o a un derivado funcional del mismo, en comparación con la proteína original, significa que la secuencia sujeto particular varía de la secuencia del polipéptido en una o más sustituciones, deleciones o adiciones, pero retiene al menos un 50%, o más, por ejemplo, al menos el 60%, 70%, 80%, 90% o más, inclusive, de la función de la proteína. En la determinación de las secuencias polinucleotídicas, todas las secuencias polinucleotídicas sujeto que son capaces de codificar secuencias de aminoácidos prácticamente similares se consideran como prácticamente similares a una secuencia polinucleotídica de referencia, independientemente de las diferencias en la secuencia de codones. Una secuencia de nucleótidos es "prácticamente similar" a una secuencia de nucleótidos dada si: (a) el nucleótido del polinucleótido dado se hibrida con las regiones de codificación del polinucleótido natural, o (b) el polinucleótido dado es capaz de hibridarse con el polinucleótido natural en condiciones moderadamente rigurosas y su proteína codificada tiene una actividad biológica similar a la de la proteína natural; o (c) la secuencia de polinucleótidos está degenerada como resultado del código genético con respecto a las secuencias de nucleótidos definidas en (a) o (b). Las proteínas prácticamente similares tendrán una similitud superior a aproximadamente el 80% a la correspondiente secuencia de la proteína natural.

Los términos "homólogo" u "homólogos" se utilizan indistintamente y, cuando se utilizan para describir un polinucleótido o polipéptido, indican que dos polinucleótidos o polipéptidos, o las secuencias designadas de los mismos, cuando se alinean y se comparan de forma óptima, por ejemplo, usando BLAST, versión 2.2.14 con los parámetros predeterminados para una alineación son idénticos, con las inserciones o deleciones de nucleótidos o las inserciones o deleciones de aminoácidos adecuadas, de forma típica, en al menos un 70% de los nucleótidos para una elevada homología. Para un polipéptido, debería haber al menos un 30% de identidad de aminoácidos en el polipéptido, o al menos un 50% para una homología superior. El término "homólogo" u "homólogos" tal como se usa en el presente documento, también se refiere a la homología con respecto a la estructura. La determinación de homólogos de genes o polipéptidos puede realizarla el experto en la materia con facilidad. Cuando está en el contexto con un porcentaje definido, la homología de porcentaje definido significa al menos el porcentaje de similitud entre aminoácidos. Por ejemplo, un 85% de homología se refiere a al menos un 85% de similitud entre aminoácidos.

Para la comparación de la secuencia, normalmente una secuencia actúa como una secuencia de referencia, con la

cual se comparan las secuencias de prueba. Cuando se utiliza un algoritmo de comparación de secuencias, las secuencias de prueba y de referencia se introducen en un ordenador, se designan las coordenadas de la subsecuencia, en caso necesario, y se designan los parámetros del programa del algoritmo de secuencias. El algoritmo de comparación de secuencias calcula a continuación el porcentaje de identidad de secuencia para la una o varias secuencias de prueba con respecto a la secuencia de referencia, basándose en los parámetros del programa designados. En los casos donde sea necesario o se desee, se puede llevar a cabo la alineación óptima de las secuencias para comparación, usando una variedad de enfoques, que son bien conocidos en la técnica.

El término "heterólogo", en referencia a secuencias de ácidos nucleicos, proteínas o polipéptidos, significa que estas moléculas no se encuentran de forma natural en dicha célula. Por ejemplo, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína de fusión descrita en el presente documento, que se inserta en una célula, por ejemplo, en el contexto de un vector de expresión de proteína, es una secuencia de ácidos nucleicos heteróloga.

El término "agente" o "compuesto" tal como se usa en el presente documento, se refiere a una entidad química o producto biológico, o combinación de entidades químicas o productos biológicos, administrado a un sujeto para tratar o prevenir o controlar una enfermedad o dolencia. La entidad química o producto biológico es, preferentemente, pero no es necesariamente una molécula de bajo peso molecular, sino que también puede ser un compuesto más grande, o cualquier molécula orgánica o inorgánica, incluyendo ácidos nucleicos modificados y no modificados tales como ácidos nucleicos de sentido contrario, ARNi, tales como sARNip o ARNsh, péptidos, peptidomiméticos, receptores, ligandos y anticuerpos, aptámeros, polipéptidos, análogos de ácido nucleico, o variante de los mismos. Por ejemplo, un agente puede ser un oligómero de ácidos nucleicos, aminoácidos, o carbohidratos incluyendo, aunque no de forma limitativa, proteínas, péptidos, oligonucleótidos, ribozimas, ADNzimas, glucoproteínas, Agentes ARNi (por ejemplo, ARNip), lipoproteínas, aptámeros, y modificaciones y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, un principio activo es un ácido nucleico, por ejemplo, ARNm o un derivado o variante del mismo. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X que comprende un agente de ácido nucleico, por ejemplo, un agente de ARNi o ARNm se puede unir (por ejemplo, conjugar) a un péptido HB mediante un resto enlazador que permite que el agente ARNm o ARNi interactúe con el ADN. En algunas realizaciones, el resto enlazador es un resto reversible, por ejemplo, un agente de ARNi o ARNm se puede liberar desde el péptido HB en la ubicación de la célula o tejido diana.

Tal como se usa en el presente documento, el término "fusionado" significa que al menos una proteína o péptido que está físicamente asociado con una segunda proteína o péptido. En algunas realizaciones, la fusión es típicamente un enlace covalente, sin embargo, otros tipos de enlaces abarcados en el término "condensado" incluyen, por ejemplo, la unión mediante interacción electrostática, o una interacción hidrófoba, y similares. El enlace covalente puede abarcar enlaces como proteína de fusión o enlace químicamente acoplado, por ejemplo, mediante un enlace disulfuro formado entre dos restos de cisteína.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "polipéptido de fusión" o "proteína de fusión" significa una proteína creada uniendo dos o más secuencias de polipéptidos entre sí. Los polipéptidos de fusión abarcados en la presente invención incluyen productos de traducción de una construcción de gen quimérico que une las secuencias de ADN que codifican el péptido HB o mutantes del mismo, codificando la secuencia de ADN un segundo polipéptido para formar un único marco de lectura abierto. En otras palabras, un "polipéptido de fusión" o una "proteína de fusión" es una proteína recombinante de dos o más proteínas que están unidas mediante un enlace peptídico o varios enlaces peptídicos. La proteína de fusión también puede comprender un enlazador peptídico entre el péptido HB y el principio activo, por ejemplo, un péptido o polipéptido terapéutico de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión se pueden producir, por ejemplo, mediante una secuencia de ácidos nucleicos que codifica una proteína se une al ácido nucleico que codifica otra proteína de forma que constituyen un único marco de lectura abierto que puede traducirse en las células a un único polipéptido que contiene todas las proteínas previstas. El orden de disposición de las proteínas puede variar. Como ejemplo no limitante, la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido HB está fusionado en marco a un extremo, el extremo tanto 5' como 3', de un gen que codifica un primer ligando (por ejemplo, X), tal como una proteína o un péptido terapéutico. De esta manera, sobre la expresión del gen, el péptido HB se expresa funcionalmente y se fusiona con el extremo N o el extremo C de X (por ejemplo, el péptido o proteína terapéuticos). En determinadas realizaciones, la modificación de la sonda polipeptídica es tal que la funcionalidad del péptido HB sigue quedando prácticamente inalterada en términos de su actividad biológica mediante su fusión con el primer ligando X, tal como el péptido terapéutico. En algunas realizaciones, una construcción de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión HB-X tiene también una secuencia de ácidos nucleicos que codifica un enlazador, que está situado entre ácido nucleico que codifica el péptido HB y la secuencia de ácidos nucleicos que codifica X (por ejemplo, el péptido o proteína terapéuticos). En algunas realizaciones, la proteína de fusión HB-X se configura de tal forma que la funcionalidad del péptido HB o de X (por ejemplo, la proteína o péptido terapéuticos) no se ve significativamente alterada negativamente por la fusión.

Tal como se usa en el presente documento, la expresión "asociado con" significa que una entidad está en asociación o contacto físico con otra. Por tanto, un péptido HB "asociado" con un principio activo puede unir tanto de forma covalente como de forma no covalente el péptido HB con el principio activo. La asociación puede estar mediada por un resto enlazador, especialmente cuando la asociación es covalente. El término "asociación" o "interacción" o

"asociado con" se utilizan indistintamente en el presente documento, en referencia a la asociación o interacción de un péptido HB con el principio activo, tanto mediante una unión indirecta como con una unión directa.

Tal como se usa en el presente documento, el término "conjugado" o "conjugación" o "unido" tal como se usa en el presente documento, se refiere a la unión de dos o más restos para formar una entidad. Un conjugado abarca tanto un conjugado de péptido-molécula pequeña como los conjugados de péptido-proteína/péptido. Por ejemplo, los procedimientos de la presente invención proporcionan la conjugación de un péptido HB unido con otra entidad, por ejemplo un principio activo, por ejemplo, un resto tal como una proteína/péptido terapéutico o molécula pequeña. Tal como se describe en el presente documento, la unión puede ser mediante enlazadores, modificación química, enlazadores peptídicos, enlazadores químicos, enlaces covalentes o no covalentes, o proteínas de fusión o mediante cualquier otro medio conocidos para un experto en la materia. La unión puede ser permanentes o reversible. En algunas realizaciones, algunas moléculas enlazadoras (enlazadores químicos o peptídicos) pueden incluirse para aprovechar las propiedades deseadas de cada enlazador y de cada proteína o molécula del conjugado. Los enlazadores flexibles y los enlazadores que aumentan la solubilidad de los conjugados se contemplan para su uso en solitario o con otros enlazadores que se describe en el presente documento. Los enlazadores peptídicos se pueden unir mediante la expresión del ADN que codifica el enlazador a una o más de las proteínas del conjugado. Los enlazadores se pueden escindir con ácido, fotoescindirse y se enlazadores termolábiles. Las personas expertas en la materia conocen bien los procedimientos de conjugación, y están abarcados para su uso en la presente invención.

Como alternativa, dos o más entidades que se unen pueden estar unidas mediante enlace indirecto. Un enlace indirecto incluye una asociación entre un péptido HB y un principio activo, en el que el péptido HB y el principio activo están unidos mediante un "resto enlazador", por ejemplo, no están unidos directamente. Un enlace directo incluye cualquier enlace en el que no se requiera un resto enlazador. En una realización, un enlace directo incluye una interacción química o física en la que los dos restos, es decir, el resto de direccionamiento y el resto de unión, interactúan de forma que quedan atraídos entre sí. Los ejemplos de interacciones directas incluyen las interacciones covalentes, interacciones no covalentes, hidrófobas/hidrófilas, iónicas (por ejemplo, electrostáticas, atracción coulombica, ion-dipolo, transferencia de carga), Van der Waals, o enlace de hidrógeno, y enlace químico, incluida la formación de un enlace covalente. Por consiguiente, en una realización, un resto de direccionamiento, tal como un anticuerpo o fragmento del mismo y el ligando no están unidos mediante un enlazador, por ejemplo, están unidos directamente. En una realización adicional, un resto de direccionamiento y el ligando están electrostáticamente asociados entre sí.

El término "conjugado" se refiere a la unión de al menos dos entidades unidas entre sí. La unión de las dos entidades puede ser directa (por ejemplo, mediante enlaces covalentes o no covalentes) o indirecta (por ejemplo, mediante enlazadores etc.)

El término "enlazador" se refiere a cualquier medio, entidad o resto usado para unir dos o más entidades. Por ejemplo, un péptido HB como se desvela en el presente documento, se puede unir a un principio activo X (por ejemplo, una proteína terapéutica o péptido) usando un resto enlazador. Un enlazador puede ser un enlazador covalente o un enlazador no covalente. Los ejemplos de enlazadores covalentes incluyen enlaces covalentes o un resto covalente unido a uno o más de las proteínas a enlazar. El enlazador también puede ser un enlace no covalente, por ejemplo un enlace organometálico a través de un centro metálico tal como un átomo de platino. Para enlaces covalentes, se pueden usar varias funcionalidades, tales como grupos amida, incluidos derivados de ácido carbónico, éteres, ésteres, incluidos ésteres orgánicos e inorgánicos, amino, uretano, urea y similares. Para proporcionar el enlace, la molécula efectora y/o la sonda se pueden modificar mediante oxidación, hidroxilación, sustitución, reducción etc. para proporcionar un sitio para acoplamiento. Los enlazadores se pueden escindir con ácido, fotoescindirse y se enlazadores termolábiles. Las personas expertas en la materia conocen bien los procedimientos de conjugación, y están abarcados para su uso en la presente invención. En algunas realizaciones, un resto enlazador para unir un péptido HB a un ácido nucleico es un enlazador cruzado de ciclo-propapirrolindol. Los restos enlazadores incluyen, aunque no de forma limitativa, restos enlazadores químicos, o por ejemplo, un resto enlazador peptídico. En algunas realizaciones, un enlazador entre un péptido HB y un principio activo o un enlazador peptídico se puede formar haciendo reaccionar el polímero y un enlazador seleccionado, por ejemplo, del grupo que consiste en cloroformiato de p-nitrofenilo, carbonildiimidazol (CDI), carbonato de N,N'-disuccinimidilo (DSC), anhídrido cis-aconítico, y mezclas de estos compuestos. Se apreciará que la modificación que no disminuya significativamente la función del péptido HB que se desvela en el presente documento o del principio activo (por ejemplo, proteína o péptido terapéuticos) sea preferida. Un aspecto de la presente invención proporciona una composición en la que el enlazador es un péptido que comprende la secuencia GGG o GGGGS.

El término "recombinante", cuando se usa para describir una molécula de ácido nucleico, significa un polinucleótido de origen genómico, ADNc, vírico, semisintético y/o sintético, que, en virtud de su origen o manipulación, no está asociado con todo o una parte de las secuencias de polinucleótidos con las que están asociados en la naturaleza. El término recombinante, como se usa con respecto a un péptido, polipéptido, proteína o proteína de fusión recombinante, significa un polipéptido producido mediante la expresión procedente de un polinucleótido recombinante. El término recombinante tal como se usa en el presente documento con respecto a una célula hospedadora significa una célula hospedadora en la que se ha introducido un polinucleótido recombinante. En el

presente documento, recombinante también se utiliza para referirse a, con referencia a un material (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína, o un vector) que el material se ha modificado mediante la introducción de un material heterólogo (por ejemplo, una célula, un ácido nucleico, una proteína o un vector).

5 El término "vectores" se refiere a una molécula de ácido nucleico capaz de transportar o mediar la expresión de un ácido nucleico heterólogo al que se ha unido en una célula hospedadora; un plásmido es una especie del género englobada por el término "vector." El término "vector" se refiere, de forma típica, a una secuencia de ácidos nucleicos que contiene un origen de replicación y otras entidades necesarias para la replicación y/o mantenimiento en una célula hospedadora. Los vectores capaces de dirigir la expresión de genes y/o secuencias de ácidos nucleicos, a las que están operativamente unidas se denominan, en el presente documento, como "vectores de expresión". En general, los vectores de expresión de utilidad están frecuentemente en la forma de "plásmidos" que hacen referencia a moléculas de ADN bicatenario que, en su forma de vector no están unidos al cromosoma y que comprenden de forma típica entidades para la expresión estable o transitoria o el ADN codificado. Otros vectores de expresión que se pueden usar en los procedimientos que se desvelan en el presente documento incluyen, pero no se limitan a plásmidos, episomas, cromosomas artificiales de bacterias, cromosomas artificiales de levaduras, bacteriófagos o vectores víricos, y dichos vectores se pueden integrar en el genoma del hospedador o replicarse de forma autónoma en la célula concreta. Un vector puede ser un vector de ADN o ARN. También se pueden usar otras formas de vectores de expresión conocidos para los expertos en la materia que sirven a funciones equivalentes, por ejemplo, vectores extracromosómicos autorreplicantes o vectores que se integran en el genoma de un hospedador. Los vectores preferidos son los capaces de replicación autónoma y/o expresión de los ácidos nucleicos a los que están unidos.

Los términos "sujeto" e "individuo" se usan de forma indistinta en el presente documento, y se refieren a un animal, por ejemplo un ser humano, al cual un tratamiento, incluido un tratamiento profiláctico, con la composición farmacéutica de acuerdo con la presente invención, se proporciona. El término "sujeto", tal como se usa en el presente documento, se refiere a animales no humanos. Las expresiones "animales no humanos" y "mamíferos no humanos", se utilizan indistintamente en el presente documento, e incluyen todos los vertebrados, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos, (especialmente los primates superiores), oveja, perro, roedor (por ejemplo ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejos, vacas, y no mamíferos tales como pollos, anfibios, reptiles etc. En una realización, el sujeto es un ser humano. En otra realización, el sujeto es una animal experimental o un animal sustituto como un modelo de enfermedad. El término no denota una edad o sexo concreto. Por tanto, se pretenden que queden cubiertos sujetos tanto adultos como recién nacidos, tanto varones como hembras. Los ejemplos de sujetos incluyen seres humanos, perros, gatos, vacas, cabras y ratones. Se pretende además que el término sujeto incluya especies transgénicas.

Se pretende que el término "tejido" incluya células intactas, sangre, preparaciones de sangre tales como plasma y suero, huesos, articulaciones, cartílago, tejido neuronal (cerebro, médula espinal, y neuronas), músculos, musculatura lisa y órganos.

Los términos "enfermedad" o "trastorno" se utilizan indistintamente en el presente documento, se refieren a una alternancia en el estado de un organismo o en cualquiera de los órganos, que interrumpe o perturba la realización de las funciones y/o que causa síntomas tales como incomodidad, disfunción, distrés, o incluso la muerte a la persona atacada o aquellas en contacto con una persona. Una enfermedad o trastorno también puede estar relacionado con un moquillo, decadencia, padecimiento, patología, trastorno, mal, afección, lamento, indisposición, afección.

La expresión "dolencia relacionada con el cartílago" o "dolencia clínica relacionada con el cartílago" se refiere a cualquier defecto en el cartílago articular. El término abarca, aunque no de forma limitativa, una ruptura o desprendimiento del cartílago, un defecto en el menisco que incluye un desgarramiento parcial o completo, daño o lesión que afecta el menisco y/o rótula, artrosis (citada en el presente documento como "OA"), incluida la artrosis de rodilla, dedo, muñeca, cadera, tobillos, codo, dedos del pie, hombro y dorsal, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide (AR), lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, condropatía, condrosarcoma, condromalacia, policondritis, policondritis con recaída, epifisiolisis, osteocondritis disecante, condrodysplasia, costocondritis, raquitismo hipofosfatémico vinculado a X, osteocondroma, condrosarcoma (maligno), susceptibilidad a artrosis (tipos 1-6), espondilosis, osteocondrosis, condrosarcoma primario, condrodysplasia, síndrome de Tietze, distrofia dermocondrocorneal de Francois, displasia de la epífisis, múltiple, (tipos 1-5), cartílagos auricular osificado con deficiencia mental, degeneración progresiva del músculo y carga ósea, osteocondromatosis carpotarsal, acondroplasia, condrocalcinosis (tipos 1-2), genocondromatosis, condrodysplasia (trastorno del desarrollo sexual), condroma, Acondrogénesis (tipos 1A, 1B, 2, 3, 4, tipo Langer-Saldino), tipo II Acondrogénesis-hipocondrogénesis, Atelosteogénesis, (tipo 1, 2 y III), Piknoacondrogénesis, pseudoacondroplasia, artrosis de los dedos, familia, displasia sitrífica, discondrosteosis - nefritis, cartílagos de coloboma de ala nasal con telecantos, hipoplasia del cartílago del ala --coloboma -telecanto, síndrome de Pierre Robin --condrodysplasia fetal, dispondilocondromatosis, acondroplasia regional --displasia del músculo abdominal, osteocondritis disecante, condrocalcinosis articular familiar, traceobroncomalacia, condritis, discondrosteosis, síndrome de Maffucci, displasia de Jequier-Kozlowski esquelética, condrodistrofia, osteoartropatía craneal, síndrome de Tietze, displasia de cadera --encondromata -econdromata, enfermedad de Bessel-Hagen, condromatosis (benigna), encondromatosis (benigna), condrocalcinosis debida a la deposición de cristales de apatito, síndrome de Meyenburg-Altherr-Uehlinger, encondromatosis-enanismo-hipoacusia, síndrome de Astley-

Kendall, osteocondromatosis sinovial, condrocalcinosis familiar articular, acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans, condrocalcinosis, síndrome de Keutel, síndrome de Stanescu, fibrocondrogénesis, hipocondroplasia,

5 Una "composición" o "composición farmacéutica" se utilizan indistintamente en el presente documento y se refieren a una composición que normalmente contienen un excipiente, tal como un transportador farmacéuticamente aceptable que es habitual en la técnica y que es adecuado para su administración a un conjugado HB-X para un tejido o un sujeto. De forma adicional, las composiciones para administración tópica (por ejemplo, mucosa oral, mucosa respiratoria) y/o para administración oral pueden formar soluciones, suspensiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, formulaciones de liberación continua, enjuagues orales, o polvos, como es sabido en la materia y como se describe
10 en el presente documento. Las composiciones también pueden incluir estabilizantes y conservantes. Para ejemplos de transportadores, estabilizantes y adyuvantes, University of the Sciences in Philadelphia (2005) Remington: The Science and Practice of Pharmacy with Facts and Comparisons, 21ª Ed.

15 Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "que trata", y "tratamiento" se refieren a la reducción o disminución mensurable de uno o más síntomas o marcadores mensurables de una enfermedad o trastorno; aunque no se pretende limitarse a estos, las enfermedades o trastornos de especial interés incluyen enfermedades autoinmunitarias y miositis. La disminución mensurable incluye cualquier reducción estadísticamente significativa en un marcador o síntoma mensurable. En algunas realizaciones, el tratamiento es un tratamiento profiláctico.

20 La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico deseado, por ejemplo, una disminución o prevención de los efectos asociados con varias patologías o dolencias, tal como una reducción en un síntoma de una enfermedad autoinmunitaria en el sujeto. La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un conjugado HB-X tal como se desvela en el presente documento, para tratar o prevenir una enfermedad o trastorno en un mamífero, preferentemente un ser humano. Una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado HB-X
25 puede variar de acuerdo con factores tales como la patología, edad, sexo, y peso del sujeto, y la capacidad del compuesto terapéutico X para desencadenar una respuesta deseada en el sujeto. Una cantidad terapéuticamente eficaz es aquella en la que los efectos tóxicos o perjudiciales del agente terapéutico se compensan con los efectos terapéuticos beneficiosos. En algunas realizaciones, una cantidad terapéuticamente eficaz es una "cantidad eficaz", que tal como se usa en el presente documento, se refiere a la cantidad de agente terapéutico de la composición farmacéutica para aliviar al menos uno o algunos de los síntomas de la enfermedad o trastorno. Una "cantidad eficaz" para los fines del presente documento está determinada, por tanto, por consideraciones tales que son conocidos en la técnica y es la cantidad para conseguir una mejora que incluye, pero sin limitaciones, una mejora en la tasa de supervivencia o una recuperación más rápida, o una mejora o eliminación de al menos un síntoma y otro indicador de la enfermedad que se está tratando que sean medidas adecuadas para el experto en la materia. Se
35 debe tener en cuenta que la proteína de fusión HB-X tal como se desvela en el presente documento se puede administrar en forma de una sal farmacéuticamente aceptable y que se puede administrar sola o como un principio activo combinado con transportadores, diluyentes, adyuvantes y vehículos farmacéuticamente aceptables.

40 La expresión "cantidad profilácticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un conjugado HB-X que es eficaz, a dosis y durante periodos de tiempo necesarios, para conseguir el resultado terapéutico o profiláctico deseado. Normalmente, puesto que una dosis profiláctica de conjugado HB-X se administra al sujeto antes de, o en un estado anterior de la enfermedad y, en algunas realizaciones, una cantidad profilácticamente eficaz es menor que la cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad profilácticamente eficaz de un conjugado HB-X es también aquella en que cualesquiera efectos tóxicos o perjudiciales del compuestos se compensan con los efectos terapéuticos beneficiosos.

45 Tal como se usa en el presente documento, los términos "prevenir", "que previene" y "prevención" se refieren a la evitación o retraso en la manifestación de uno o más síntomas o marcadores mensurables de una enfermedad o trastorno, por ejemplo, de una enfermedad autoinmunitaria. Un retraso en la manifestación de un síntoma o marcador es un retraso relativo al momento en el que dicho síntoma o marcador se manifiesta en un sujeto de control o no tratado con una posibilidad o susceptibilidad equivalente a desarrollar la enfermedad o el trastorno. Los
50 términos "prevenir", "que previene" y "prevención" incluyen no solamente la evitación o prevención de un síntoma o un marcador de la enfermedad, sino también una severidad o grado reducido en uno cualquiera de los síntomas o marcadores de la enfermedad, con respecto a los síntomas o marcadores en un individuo de control o no tratado con una posibilidad o susceptibilidad equivalente a desarrollar la enfermedad o el trastorno, o con respecto a síntomas o marcadores que puedan aparecer según los antecedentes o mediciones estadísticas de las poblaciones afectadas por la enfermedad o trastorno. Por "severidad reducida" se entiende al menos un 10% de reducción en la severidad o grado de un síntoma o marcador de la enfermedad mensurable, con respecto al control o la referencia, por ejemplo, al menos el 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 99% o incluso 100% (es decir, sin
55 síntomas o marcadores mensurables).

60 Tal como se usa en el presente documento, los términos "que administra", y "que introduce" se utilizan indistintamente en el presente documento, y se refieren a la colocación del conjugado HB-X de la presente invención en un sujeto por un procedimiento o vía que da como resultado la localización al menos parcial del conjugado HB-X

en un sitio deseado. Los compuestos de la presente invención se pueden administrar mediante cualquier vía adecuada que dé como resultado un tratamiento eficaz en el sujeto.

Las expresiones "administración parenteral" y "administrado por vía parenteral" tal como se usan en el presente documento significan modos de administración diferentes a la administración enteral y tópica, normalmente mediante inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intraventricular, intracapsular, intraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, intracerebroespinal, e intrasternal. Las expresiones "administración sistémica", "administrado de forma sistémica", "administración periférica" y "administrado de forma periférica" tal como se usa en el presente documento, significa la administración de HB-X de forma que penetre en el sistema del animal y, por tanto, esté sometido al metabolismo y otros procesos similares, por ejemplo, administración subcutánea.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se utiliza en el presente documento para referirse a aquellos compuestos, materiales, composiciones y/o formas farmacéuticas que son, según el criterio médico establecido, adecuadas para su uso en contacto con los tejidos de seres humanos y animales sin excesiva toxicidad, irritación, respuesta alérgica, u otro problema o complicación, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable.

La expresión "transportador farmacéuticamente aceptable" tal como se usa en el presente documento, significa un material, composición o vehículo farmacéuticamente aceptable, tal como un líquido o una carga sólida, diluyente, excipiente, disolvente o material encapsulante, implicado en el arrastre o transporte de los agentes sujeto desde un órgano, o parte del cuerpo, hasta otro órgano o parte del cuerpo. Cada transportador debe ser "aceptable" en el sentido de ser compatible con el resto de ingredientes de la formulación.

El término "reducido" o "reduce" o "disminuye" tal como se usa en el presente documento significa de manera general una disminución en una cantidad estadísticamente significativa con respecto a una referencia. Para evitar dudas, "reducido" significa una disminución estadísticamente significativa de al menos un 10% en comparación con un nivel de referencia, por ejemplo una disminución en al menos un 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos 50%, o al menos 60%, o al menos 70%, o al menos 80%, al menos 90% o más, hasta e incluyendo un 100% de disminución (es decir, nivel ausente en comparación con una muestra de referencia), o cualquier disminución entre 10-100% en comparación con un nivel de referencia, como se define este término en el presente documento.

Los términos "aumentado" o "aumento" tal como se usa en el presente documento significan se manera general un aumento en una cantidad estadísticamente significativa; tal como un aumento estadísticamente significativo de al menos un 10% en comparación con un nivel de referencia, incluido un aumento de al menos un 20%, al menos el 30%, al menos el 40%, al menos el 50%, al menos el 60%, al menos el 70%, al menos el 80%, al menos el 90%, al menos 100% o más, inclusive, incluido, por ejemplo, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10 veces de aumento o más en comparación con un nivel de referencia, como se define este término en el presente documento.

El término "alto" tal como se usa en el presente documento, significa de manera general más alto en una cantidad estadísticamente significativa con respecto a una referencia; tal como un valor estadísticamente significativo al menos un 10% superior al de un nivel de referencia, por ejemplo al menos un 20% superior, al menos un 30% superior, al menos un 40% superior, al menos un 50% superior, al menos un 60% superior, al menos un 70% superior, al menos un 80% superior, al menos un 90% superior, al menos un 100% superior, inclusive, tal como al menos 2 veces superior, al menos 3 veces superior, al menos 4 veces superior, al menos 5 veces superior, al menos 10 veces superior o más, en comparación con un nivel de referencia.

El término "sujeto" tal como se usa en el presente documento, se refiere a cualquier animal en el que es útil modular una respuesta en un tejido al que se dirige el resto HB de la composición. El sujeto puede ser un animal salvaje, doméstico, comercial o de compañía tal como un ave o un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano. Aunque, en una realización de la invención, se contempla que las composiciones terapéuticas que se desvelan el presente documento, también son adecuadas para el tratamiento terapéutico de seres humanos, es también aplicable a vertebrados de sangre caliente, por ejemplo, mamíferos, tales como primates no humanos, (especialmente los primates superiores), oveja, perro, roedores (por ejemplo, ratón o rata), cobaya, cabra, cerdo, gato, conejos, vacas, y no mamíferos tales como pollos, patos o pavos. En algunas realizaciones, el sujeto es una animal experimental o un animal sustituto como un modelo de enfermedad.

La expresión "farmacéuticamente aceptable" se refiere a compuestos y composiciones que se pueden administrar a mamíferos sin excesiva toxicidad. La expresión "transportadores farmacéuticamente aceptables" excluye medios de cultivo de tejidos. Las sales farmacéuticamente aceptables ilustrativas incluyen, pero no se limitan a, sales de ácidos minerales tales como clorhidratos, bromhidratos, fosfatos, sulfatos, y similares, y las sales de ácidos orgánicos tales como acetatos, propionatos, malonatos, benzoatos y similares. Los transportadores farmacéuticamente aceptables son bien conocidos en la técnica. Algunos transportadores farmacéuticamente aceptables se pueden utilizar para proporcionar la liberación sostenida de las composiciones descritas en el presente documento. Por ejemplo, el ácido hialurónico y las formas de gel de ácido hialurónico se utilizan en inyecciones intraarticulares, y se pueden utilizar para proporcionar liberación continua de las composiciones de HB-X.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "tratar", "tratamiento" y "para tratar" se utilizan para indicar la producción de resultados beneficiosos o deseados, tales como para aliviar los síntomas, o eliminar la causa de una enfermedad o trastorno ya sea de manera temporal o permanente, ralentizar la aparición de síntomas y/o la evolución del trastorno, o prevenir la evolución de la enfermedad. Los términos "tratar" o "tratamiento" se refieren tanto a un tratamiento terapéutico y profiláctico como a medidas preventivas. Los beneficios o resultados clínicos deseados incluyen, aunque no de forma limitativa, alivio de síntomas, disminución de la extensión del autismo, estado estabilizado (es decir, que no empeora) de la patología implicada, retraso o ralentización en la evolución de la enfermedad, mejora o alivio de la patología. Se administra un "régimen eficaz" durante un ciclo eficaz (un tratamiento suficiente o una cantidad durante un periodo de tiempo suficiente) para conseguir un nivel de los resultados deseados. El seguimiento de la eficacia se puede realizar por procedimientos conocidos en la técnica para la enfermedad o sus síntomas particulares.

Conjugados HB-X

Un aspecto ilustrativo de la presente divulgación tal como se desvela en el presente documento comprende una composición terapéutica que comprende, por ejemplo, (HB-enlazador)_n-X_m-(enlazador-HB)_o, donde HB es una proteína de unión a heparina, X es un principio activo tal como una proteína terapéutica o una parte de la misma, o un molécula pequeña terapéutica, y donde n, m, y o son números enteros, y m es al menos uno y n+o es al menos uno.

Un aspecto particular de la presente invención tal como se desvela en el presente documento proporciona una composición terapéutica selectiva que comprende, por ejemplo, (HB-enlazador)_n-X_m-(enlazador-HB)_o, donde HB es una proteína de unión a heparina seleccionada entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2); MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21); KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22), X es un principio activo seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6; interleuquina-11; interleuquina-27; factor inhibidor de leucemia; factor neurotrófico ciliar; cardiotrofina 1; neuropoyetina; citoquina de tipo cardiotropina; factor de crecimiento de fibroblastos 2; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre interleuquina-4 e interleuquina-10 del receptor 2 de TNF; neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF-1070); factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11); factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1); miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una parte de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos:RPSGRKSSKMQAfriwDvNqkTFyLRNLVAGyLQgPnVnLEEKIDVvPIEPHALFLGI HGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENRKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTA MEADQPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infiximab, anti-TNF-a), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF-beta seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, clorprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, flucortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortol, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbat, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona; somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionada entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®); un principio activo de molécula pequeña seleccionada entre TR2-01829 o PRO 1, 2-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) o kartogenina y donde n, m, y o son números enteros, y m es al menos uno y n+o es al menos uno.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X es HB-X_n, o (HB-enlazador)_n-X_n, y donde n es un n es un número entero de al menos 1. El HB se puede unir al extremo N o C, o tanto el extremo N como el extremo C, del principio activo X. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X es una proteína de fusión recombinante que comprende un

HB recombinante y la proteína terapéutica. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X comprende un péptido HB como se describe en el presente documento y una molécula pequeña. En ambos casos, el péptido HB puede estar unido (por ejemplo, conjugado) con un principio activo con o sin un enlazador.

5 En algunas realizaciones, los componentes de un conjugado HB-X se pueden colocar en orden, con respecto al extremo N de la parte HB de la composición: HB-X, X-HB, HB-enlazador-X, (HB-enlazador)_n-X, X-(enlazador-HB)_n, HB_n-X-HB_n, (HB-enlazador)_n-X_m-(enlazador-HB)_n, HB_n-X_m-HB_n-X_m, etc.

10 En algunas realizaciones de la divulgación, un conjugado HB-X puede comprender al menos 1, o al menos 2, o al menos 3, o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 7, o al menos aproximadamente 8, o al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10, o más de 10 péptidos HB de la SEQ ID NO: 1-3 o 20-22. Un conjugado HB-X con más de un péptido HB puede tener todos los péptidos HB del mismo tipo (por ejemplo, todos los péptidos HB comprenden la SEQ ID NO: 2) o pueden comprender cualquier combinación de diferentes péptidos de la SEQ ID N: 1-3, o 20-22. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X puede comprender al menos un enlazador asociado con un péptido HB, por ejemplo, cada HB presente en un conjugado HB-X puede estar asociado a un enlazador. Como alternativa, en algunas realizaciones, cuando un conjugado HB-X comprende más de un péptido HB, no todos los péptidos HB de un conjugado HB-X tienen que estar asociados a un enlazador. Los péptidos HB pueden estar intercalados aleatoriamente o no aleatoriamente entre una secuencia de principios activos en un conjugado HB-X, por ejemplo, como ejemplo ilustrativo, HB-X-X-X-HB-X-X-X-HB, o X-X-HB-X-HB-X-HB-X-X-X-HB-etc. Dicha intercalación aleatoria o no aleatoria de péptidos HB entre X entidades activas puede producirse con o sin enlazadores, tal como se desvela en el presente documento.

20 Adicionalmente, la composición puede comprender una mezcla de construcciones HB-X, en la que X representa diferentes proteínas o moléculas pequeñas (es decir, una composición que comprende HB-X¹ y HB-X², etc.).

25 En algunas realizaciones, un conjugado HB-X puede comprender al menos 1, o al menos 2, o al menos 3, o al menos aproximadamente 4, o al menos aproximadamente 6, o al menos aproximadamente 7, o al menos aproximadamente 8, o al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10, o más de 10 principios activos (X). Los principios activos pueden ser una proteína o péptido terapéutico tal como se desvela en el presente documento, o una molécula pequeña.

Proteínas de unión a heparina (HB)

30 La presente invención se ilustra por motivos de unión a heparina proteínicos (HB) que están unidos o fusionados con un resto terapéutico o principio activo, tal como una molécula pequeña, o una citoquina, o factor de crecimiento, o parte funcional del mismo. En algunas realizaciones de la divulgación, el péptido HB se puede seleccionar entre péptidos que tienen las secuencias de restos de aminoácidos: KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1); KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2) (C16R); o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) (C16K). En algunas realizaciones, el péptido HB se puede seleccionar entre péptidos que tienen las secuencias de restos de aminoácidos: MKRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:20); MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21) (C17R); o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22) (C17K).

35 La presente invención se refiere a motivos de unión a heparina proteínicos (HB) que están unidos o fusionados con un resto terapéutico o principio activo, tal como una molécula pequeña, o una citoquina, o factor de crecimiento, o parte funcional del mismo. En algunas realizaciones, el péptido HB se puede seleccionar entre péptidos que tienen los restos de aminoácidos KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2) (C16R); o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) (C16K). En algunas realizaciones, el péptido HB se puede seleccionar entre péptidos que tienen las secuencias de restos de aminoácidos: MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21) (C17R); o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22) (C17K).

40 En algunas realizaciones de la divulgación, una parte HB de la composición está cargada positivamente a través de numerosos restos lisina y arginina; y se une a proteoglicanos celulares o tisulares que están cargados negativamente mediante grupos sulfato. En realizaciones particulares de la invención, un HB está mutado para potenciar la carga positiva, sustituyendo el restos de cisteína natural que se encuentra en la posición 16 del HB que tienen los restos de la SEQ ID NO:1 por una arginina (SEQ ID NO:2) (C16R) o lisina (SEQ ID NO:3) (C16K). El HB se puede repetir con o sin la inclusión de un péptido enlazador. Los ejemplos de construcciones de péptidos HB en tándem con enlazadores se puede representar como HB-enlazador-HB-X, en la que HB-enlazador-HB comprende la variante de HB de la SEQ ID NO: 2 y tiene los aminoácidos:

45 KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:4); o HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X, en la que HB-enlazador-HB-enlazador-HB tiene los restos: KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:5). En algunas realizaciones, las construcciones de péptidos HB en tándem con enlazadores se puede representar como HB-enlazador-HB-X, en la que una construcción HB-enlazador-HB que comprende la variante de HB de la SEQ ID NO: 3 tiene los aminoácidos:

50 KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:23); o HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X, en la que el HB-enlazador-HB-enlazador-HB que comprende la variante de HB de la SEQ ID

NO: 3 tiene los restos:

KRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGGKRKKKGGKGLGKK
 RDPKLRKYK (SEQ ID NO:24). En algunas realizaciones, las construcciones de HB en tándem
 comprenden la misma construcción de HB. En realizaciones alternativas, se pretende que las
 5 construcciones de péptido HB en tándem puedan comprender diferentes combinaciones de péptidos HB,
 por ejemplo, cualquier combinación de SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, en cualquier orden.
 Como ejemplo ilustrativo, una construcción de péptido HB en tándem puede comprender la SEQ ID NO:
 2-enlazador-SEQ ID NO:3-enlazador-SEQ ID NO:3-X. En algunas realizaciones, una construcción de
 10 péptido HB en tándem comprende una combinación de péptidos HB de la SEQ ID NO: 2 y SEQ ID NO: 3
 solamente.

Enlazadores

La unión entre un péptido HB y se puede ser mediante enlazadores, tales como, pero sin limitarse a, modificación
 química, enlazadores peptídicos, enlazadores químicos, enlaces covalentes o no covalentes, o proteínas de fusión o
 mediante cualquier otro medio conocidos para un experto en la materia. La unión puede ser permanentes o
 15 reversible. En algunas realizaciones, se pueden incluir varios enlazadores para aprovechar las propiedades
 deseadas de cada enlazador y de cada proteína del conjugado. Los enlazadores flexibles y los enlazadores que
 aumentan la solubilidad de los conjugados se contemplan para su uso en solitario o con otros enlazadores que se
 describe en el presente documento. Los enlazadores peptídicos se pueden unir mediante la expresión del ADN que
 20 codifica el enlazador a una o más de las proteínas del conjugado. Los enlazadores se pueden escindir con ácido,
 fotoescindir y se enlazadores termolábiles. Las personas expertas en la materia conocen bien los procedimientos
 de conjugación, y están abarcados para su uso en la presente invención.

En algunas realizaciones, un péptido HB se puede unir a un principio activo X, cuando el principio activo es un
 péptido o proteína terapéutica mediante un enlazador peptídico. Los enlazadores peptídicos se pueden unir
 mediante la expresión del ADN que codifica el enlazador a una o más de las proteínas del conjugado. En algunas
 25 realizaciones, un enlazador peptídico es GGG. Opcionalmente, el enlazador peptídico se unirá en uno o ambos del
 extremo amino y el extremo carboxi del péptido HB con un enlazador corto flexible, por ejemplo que comprende al
 menos aproximadamente 2, 3, 4 o más restos glicina, serina y/o alanina. En algunas realizaciones, uno de estos
 enlazadores comprende el motivo (GGGS) (SEQ ID NO: 42), y puede estar presente en una o más copias. En
 algunas realizaciones, el enlazador comprende restos de aminoácidos cargados positivamente.

De acuerdo con la presente invención, el péptido HB puede estar unido a un principio activo mediante cualquier
 medio adecuado, como se conoce en la materia, véanse por ejemplo, las patentes de Estados Unidos con números
 30 4.625.014, 5.057.301 y 5,514.363.

Una gran variedad de procedimientos para la conjugación de un péptido HB como se desvela en el presente
 documento con X, por ejemplo, un primer ligando (por ejemplo una proteína o péptido terapéuticos) son conocidos
 35 en la técnica. Dichos procedimientos se describen, por ejemplo, en Hermanson (1996, Bioconjugate Techniques,
 Academic Press), en el documento US 6.180.084 y el documento US 6.264.914 e incluyen, por ejemplo
 procedimientos usados para unir haptenos a proteínas transportadoras como se utiliza de forma rutinaria en
 inmunología aplicada (véase Harlow y Lane, 1988, "Antibodies: A laboratory manual", Cold Spring Harbor Laboratory
 Press, Cold Spring Harbor, NY). Se reconoce que, en algunos casos, un péptido HB y/o una proteína o péptido
 40 terapéuticos pueden perder eficacia o funcionalidad después de la conjugación dependiendo, por ejemplo, del
 procedimiento de conjugación o del grupo químico utilizado en el mismo. No obstante, dada la gran variedad de
 procedimientos de conjugación, el experto pueden encontrar un procedimiento de conjugación que no afecte o afecte
 poco a la eficacia o funcionalidad de las entidades, tales como un péptido HB y el péptido terapéutico con el que se
 va a conjugar.

En algunas realizaciones, un péptido HB se puede conjugar con un principio activo (X) mediante reticulación. Los
 reactivos de reticulación incluyen glutaraldehído (GAD), oxirano bifuncional (OXR), etilenglicol diglicidil éter (EGDE),
 N-hidroxisuccinimida (NHS), y una carbodiimida soluble en agua, preferentemente 1-etil-3-(3-dimetilaminopropil)
 carbodiimida (EDC). Como conoce el experto en la materia, se puede utilizar cualquier química de reticulación,
 incluido, pero sin limitaciones, tioéter, tioéster, malimida y tiol, amina-carboxilo, amina-amina, y otros relacionados en
 50 los manuales de química orgánica, tales como, Elements of Organic Chemistry, Isaak y Henry Zimmerman
 Macmillan Publishing Co., Inc. 866 Third Avenue, Nueva York, N.Y. 10022.

Otros enfoques de unión para conjugar el péptido HB con el principio activo, incluyen pero no se limitan a la
 peroxidasa de rábano picante (HRP) aminocaproico o un reticulador bifuncional, por ejemplo, reticulante reactivo con
 carbonilo y reactivo con sulfhidrilo. Los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen normalmente dos
 55 grupos reactivos que se pueden acoplar a dos dianas funcionales diferentes de proteínas y otras macromoléculas en
 un procedimiento en dos o tres etapas, lo que puede limitar el grado de polimerización frecuentemente asociado con
 los reticulantes homobifuncionales. Dichos protocolos multietapa pueden ofrecer un gran control del tamaño del
 conjugado y de la relación molar de los componentes.

En algunas realizaciones, un péptido HB se conjuga con un principio activo ácido nucleico, por ejemplo, un agente ARNi o ARNm usando un enlazador de protamina, como se desvela en las publicaciones de solicitud de patente de Estados Unidos con números US2002/0132990 y US2004/0023902. En particular, cuando un enlazador es una protamina o agente análogo a protamina, los procedimientos, reactivos y referencias que describen la preparación de la protamina asociada con un péptido HB se describen en el documento US 2011/0177155 y en las solicitudes de patente de Estados Unidos US2007/012152 y US 2010/0209440. En algunas realizaciones, un enlazador de protamina abarcado para su uso en la presente invención comprende la SEQ ID NO: 1-6 desvelada en el documento US 2010/0209440.

Los procedimientos adecuados para la conjugación de un péptido HB como se desvela en el presente documento con X (por ejemplo, un primer ligando (por ejemplo una proteína o péptido terapéuticos) incluyen, por ejemplo, conjugación con carbodiimida (Bauminger y Wilchek, 1980, Meth. Enzymol. 70: 151-159). Como alternativa, un resto se puede acoplar a un agente de direccionamiento como se describe en Nagy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93:7269-7273 (1996), y Nagy y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:1794-1799 (1998). Otro procedimiento de conjugación que se puede usar es, por ejemplo, la oxidación con peryodato sódico seguido por alquilación reductora de los reactivos adecuados y reticulación con glutaraldehído.

Se puede usar una variedad de diferentes enlazadores para conjugar un péptido HB como se describe en el presente documento con X (por ejemplo, un primer ligando (por ejemplo una proteína o péptido terapéuticos), por ejemplo, aunque no de forma limitativa, la peroxidasa de rábano picante (HRP) aminocaproico o un reticulante bifuncional, por ejemplo, reticulante reactivo con carbonilo y reactivo con sulfhidrilo. Los reactivos de reticulación heterobifuncionales contienen normalmente dos grupos reactivos que se pueden acoplar a dos dianas funcionales diferentes de proteínas y otras macromoléculas en un procedimiento en dos o tres etapas, lo que puede limitar el grado de polimerización frecuentemente asociado con los reticulantes homobifuncionales. Dichos protocolos multietapa pueden ofrecer un gran control del tamaño del conjugado y de la relación molar de los componentes.

En algunas realizaciones, un enlazador es un enlazador de la región bisagra de la inmunoglobulina, como se desvela en las patentes de Estados Unidos 6.165.476, 5.856.456, las solicitudes estadounidense 2010/0063258 y la solicitud internacional WO2012/142515.

En algunas realizaciones, se pueden producir una proteína de fusión HB-X en un sistema no celular como se desvela en la solicitud estadounidense 2010/0063258,

Las secuencias enlazadoras ilustrativas incluyen, por ejemplo: (i) la región de la cola de la isoforma larga de la membrana de IgA 1 (ma1L): SCSVADWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN (SEQ ID NO: 43), (ii) la región de la cola de la isoforma larga de la variante de membrana de IgA 1 (ma 1L con cys adicionales): SCCVADWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN (SEQ ID NO: 44), (iii) la región de la cola de la isoforma corta de la membrana de IgA 1 (m1c con una delección en el extremo N de 6 aminoácidos):

DWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN (SEQ ID NO: 45), (iv) la región de la cola de la forma unida a membrana de IgA2: SCCVADWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN (SEQ ID NO: 46), (v) la región de la cola de la forma unida a membrana de IgD: YLAMTPLIPQSKDENSDDYTTFFDDVGS (SEQ ID NO: 47), (vi) la región de la cola de la forma unida a membrana de IgE: ELDVCVEEAEGEAPW (SEQ ID NO: 48), (vii) la región de la cola de la forma unida a membrana IgG:

ELQLEESCAEAQDGELDG (SEQ ID NO: 49), y (viii) la región de la cola de la forma unida a membrana de IgM EGEVSADEEGFEN (SEQ ID NO: 50).

En otras realizaciones, una secuencia enlazadora se deriva del segmento de la cola de una forma secretora o soluble de una inmunoglobulina. Las secuencias enlazadoras ilustrativas incluyen, por ejemplo: (i) la región de la cola de la forma soluble de IgA1: KPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO: 51), (ii) la región de la cola de la forma soluble de IgA2: KPTHVNVSVVMAEVDGTCY (SEQ ID NO: 52), (iii) la región de la cola de la forma soluble de IgD: YVTDHGPMK (SEQ ID NO: 53), y (iv): la región de la cola de la forma soluble de IgM: PTLNVSLVMSDAGTCY (SEQ ID NO: 54).

En determinadas realizaciones, puede ser deseable tener una secuencia enlazadora que contenga un resto cisteína libre para permitir la formación de un enlace disulfuro entre enlazadores, formando de esta forma proteínas de fusión de HB. En otras realizaciones, puede ser deseable alterar las secuencias enlazadoras para eliminar los restos cisteína libres, por ejemplo, mutando uno o más restos de cisteína en un enlazador a otro resto, tal como serina, alanina o glicina. Los ejemplos de secuencias enlazadoras derivadas de las regiones de la cola de las de las inmunoglobulinas unidas a membrana que se han alterado para eliminar los restos de cisteína libres incluyen:

(i) SXSVDWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 55), (ii) SXXVADWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN, en la que cada X se selecciona independientemente entre serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 56), (iii) SXXVADWQMPPPYVVLDPQETLEEETPGAN, en la que cada X se selecciona independientemente entre serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 57), (iv) ELDVXVEEAEGEAPW, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 58), y (v) ELQLEESXAEAQDGELDG, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 59). Los ejemplos de secuencias enlazadoras derivadas de las regiones de la cola

de formas secretoras de inmunoglobulinas que se han alterado para eliminar los restos de cisteína libres incluyen: (i) KPTHVNVSVMMAEVDGTXY, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 60), (ii) KPTHVNVSVMMAEVDGTXY, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 61), y (iii) PTLYNVSLVMSDTAGTXY, en la que X es serina, alanina o glicina (SEQ ID NO: 62).

5 **Principios activos - proteínas terapéuticas para conjugar con un péptido HB**

La importancia y utilidad de las composiciones descritas en el presente documento se ilustran mediante la aplicación de la composición a la reparación de cartílagos, en la que la proteína de fusión es HB-IGF-1. Las lesiones traumáticas en la articulación, tales como las que implican la rotura del ligamento cruzado anterior (LCA) llevan a un aumento en el riesgo de desarrollar artrosis. Por otro lado, es posible que este riesgo no se resuelva mediante la restauración quirúrgica de la función (Lohmander y col., 35 Am. J. Sports Med. 1756 (2007)), que puede estar relacionada con una respuesta inflamatoria y catabólica inicial después de la lesión en la articulación. Lohmander y col., 42 Arthritis Rheum. 534 (1999); Lohmander y col., 48 Arthritis Rheum. 3130 (2003); Irie y col., 10 Knee 93 (2003). Las intervenciones terapéuticas en este período de tiempo pueden ser especialmente importantes para oponerse a estos procesos catabólicos y estimular la reparación del cartílago.

15 IGF-1 es el factor prototipo en circulación que estimula la biosíntesis del cartílago. Daughaday y col., 19 J. Clin. Endocrinol. Metab. 743 (1959); McQuillan y col., 240 Biochem. J. 423 (1986); Jones & Clemmons, 16 Endocrine Rev. 3 (1995). También actúa para oponerse a estímulos catabólicos. Luyten y col., 267 Arch. Biochem. Biophys. 416 (1988); Tyler, 260 Biochem. J. 543 (1989). Como resultado, los investigadores han deseado durante mucho tiempo usar IGF-1 como terapia para la reparación del cartílago. Trippel, 43 J. Rheumatol. Suppl. 129 (1995). La administración de IGF-1 y otros factores de crecimiento es muy limitada, sin embargo, debido a su corta semivida en la articulación. los investigadores han desarrollado opciones para la terapia génica con IGF-1 y para IGF-1 encapsulado en hidrogeles para permitir la liberación controlada a largo plazo al cartílago de la articulación. Aunque prometedoros, se ha demostrado en ensayos clínicos que estas técnicas son de ámbito lento. Evans y col., 7 Nat. Rev. Rheum. 244 (2011).

25 Un ejemplo de proteína IGF-1 de rata tiene los restos de aminoácidos:

GPETLCGAELVDALQFVCGPRGFYFNKPTGYGSSIRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLK PTKSA (SEQ ID NO:6). Véase, por ejemplo, Tokunou y col., 22 FASEB J. 1886 (2008).

Un ejemplo de IGF-1 humana tiene los restos de aminoácidos:

30 GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPL
KPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:7). Véase también ID génica: 3489 (IGF1 humano). Otro ejemplo de IGF-1 humano (variante) tiene la secuencia de restos de aminoácidos:
GPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEM YCAPLKPAKSA.
(SEQ ID NO:8). Una variante del IGF-1 humano que tiene actividad biológica (véase el documento WO 92/03477; GenBank: CAA01451.1) tiene los restos de aminoácidos:
35 megpetlpgaeldalqfvcdrgfyfnkptgygssrrapqtgivdeccfrscdlrrlemycaplkpaks (SEQ ID NO:9).

Se sabe que el truncamiento del extremo N del IGF-1 retiene la actividad biológica, por ejemplo, la delección de los aminoácidos del extremo N GPE. Por consiguiente, en algunas realizaciones, un IGF-1 humano (variante) abarcado para su uso en la presente invención tiene la secuencia de restos de aminoácidos:

TLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYC
APLKPAKSA. (SEQ ID NO: 63).

40 Por tanto, en algunas realizaciones un HB-enlazador-proteína de fusión HB-X recombinante, en la que HB es una variante C16R, el enlazador es GGG, y X es una variante del IGF-1 humano de la SEQ ID NO: 7, tiene la secuencia de aminoácidos:

45 KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDA
LQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQR
HTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO: 10); otro HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X recombinante, en la que HB es una variante C16R, el enlazador es GGG, y X es una variante del IGF-1 humano (SEQ ID NO: 7) se puede representar gráficamente:

KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGGKGL

**GKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQTGIVDECCFRS
CDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:11).**

5 En algunas realizaciones, una variante del IGF-1 de la SEQ ID NO:7 se puede sustituir por la SEQ ID NO: 8 o SEQ ID NO: 9. En algunas realizaciones, la C16R de HB (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) se puede sustituir por C17R de HB (por ejemplo, MKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYK; SEQ ID NO: 21). Un ejemplo de fusión de C17R de HB con el IGF-1 humano de longitud completa (de la SEQ ID NO: 7) tiene los aminoácidos:

**MKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:12).** En algunas realizaciones, un ejemplo de fusión de C16R de HB con el IGF-1 humano de longitud completa (de la SEQ ID NO: 7) (por ejemplo, HB-IGF) tiene los aminoácidos:

10 **KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ
ID NO:16).**

En algunas realizaciones, C16R de HB (por ejemplo, SEQ ID NO: 2) o C17R de HB (SEQ ID NO: 21) se puede sustituir por C16K de HB (SEQ ID NO: 3) o HB C17K (MKRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYK; SEQ ID NO: 22). Por ejemplo, en otro ejemplo, una fusión de C17K de HB con el IGF-1 humano de longitud completa (por ejemplo, SEQ ID NO: 7) tiene los aminoácidos:

15 **MKRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:13).** Los truncamientos del IGF-1 humano correspondientes a la SEQ ID NO: 8 fusionada a C17R de HB tiene la secuencia de aminoácidos de:

20 **MKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 14) o
KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:18),** y una fusión de HB C17K con el IGF-1 humano maduro:

**MKRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:15)**

25 Las variantes de las anteriores HB-proteínas de fusión se pueden construir de forma que carezcan de la metionina inicial del extremo N del péptido HB, por ejemplo, que comprende la SEQ ID NO: 1, SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3, es decir,

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAEI.VDAI.QFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ
ID NO:16);

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAEI.VDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRITDMPKTQKEVIIIKNASRGSA (SEQ
ID NO:17);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAEI.VDAI.QFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:18);

y

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAEI.VDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRAPQ
TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:19).

La Tabla 1 desvela ejemplos de diferentes realizaciones de fusiones de un péptido HB con un agente. Como agente ilustrativo (por ejemplo, X), se usa IGF-1:

	péptido HB	Enlazador	variante de IGF-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-enlazador-HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 7	KRKKKGLGKGRDPRLRKYKGGGKRRKKKGLGK KRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT GYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLRLEMYSAPLKP AKS ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASR GSA (SEQ ID NO:10);
HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 7	KRKKKGLGKGRDPRLRKYKGGGKRRKKKGLGK KRDPRLRKYKGGGKRRKKKGLGKGRDPRLRKYKGP ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTG IVDECCFRSCDLRRLRLEMYSAPLKP AKS ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASR GSA (SEQ ID NO:11)
HB-X	C17R (SEQ ID NO: 21)	-	SEQ ID NO: 7	MKRRKKKGLGKGRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQ I'VCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR IEMYSAPLKP AKS ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASR GSA (SEQ ID NO:12);
HB-X	C17K (SEQ ID NO: 22)	-	SEQ ID NO: 7	MKRRKKKGLGKGRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQ FVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR IEMYSAPLKP AKS ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASR GSA (SEQ ID NO:13)

(continuación)

	péptido HB	Enlazador	variante de IGf-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-X	C17R (SEQ ID NO: 21)	-	SEQ ID NO: 8	MKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQF FVCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR LEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:14)
HB-X	C17K (SEQ ID NO: 22)	-	SEQ ID NO: 8	MKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQF I>VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR LEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:15)
HB-X	C16R (SEQ NO: 2)	-	SEQ ID NO: 7	KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR LEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKIQKLEVHLKKNASRG SA (SEQ ID NO:16);
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	-	SEQ ID NO: 7	KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR LEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKIQKLEVHLKKNASRG SA (SEQ ID NO:17);
HB-X	C16R (SEQ NO: 2)	-	SEQ ID NO: 8	KRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRR LEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:18);

(continuación)

	péptido HB	Enlazador	variante de IGF-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	-	SEQ ID NO: 8	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCCGAEVLDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLCPAKSA (SEQ ID NO: 19).
HB-enlazador-HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 8	KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGKRRKKKGGKGLGK KRDPRLRKYKGPETLCCGAEVLDALQFVCGDRGFYFNKPT GYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL.EMYCAPLCPAKS A (SEQ ID NO: 25);
HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 8	KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGKRRKKKGGKGLGK KRDPRLRKYKGGKRRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKGP ETLCCGAEVLDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTG IVDECCFRSCDLRRL.EMYCAPLCPAKSA (SEQ ID NO: 26)
HB-enlazador-HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 7	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGKRRKKKGGKGLGK KRDPKLRKYKGPETLCCGAEVLDALQFVCGDRGFYFNKPT GYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL.EMYCAPLCPAKS ARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGS (SEQ ID NO: 27);

(continuación)

	péptido HB	Enlazador	variante de IGF-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-enlazador-HB-enlazador-HB-X	C16K (SEQ NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 7	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGKRRKKKGKGLGK KRDPKLRKYKGGKRRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYKGP ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQJG IVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLPAKSARSVRAQRHTDMP KTQKEVHLKNASRGS (SEQ ID NO: 28)
HB-enlazador-HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 8	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGKRRKKKGKGLGK KRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPT GYGSSRRAPQJGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLPAKS A (SEQ ID NO: 29);
HB-enlazador-	C16K (SEQ ID NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 8	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGKRRKKKGKGLGK KRDPKLRKYKGGKRRKKKGGKGLGKKRDPKLRKYKGP ETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQJG IVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLPAKSA (SEQ ID NO: 30);
HB-X	C16R (SEQ NO: 2)	-	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKILCGAELVDALQFVCG DRGFYFNKPTGYGSSRRAPQJGIVDECCFRSCDLRRLRE MYCAPLPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGS (SEQ ID NO: 64);

(continuación)

	péptido HB	Enlazador	variante de IGF-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	-	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKTL CGAELVDALQFVCG DRGIYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLLEM YCAPLKPAKSARSVRAQRITDMPKTQKEVIII.KNASRGS (SEQ ID NO: 65);
HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	-	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKTL CGALLVDALQFVCG DRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRIEM YCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 66);
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	-	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKTL CGAELVDALQFVCG DRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLLEM YCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 67);
HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGTL CGALLVDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSARSVRAQRITDMPKTQKEVHLKNASRG SA (SEQ ID NO: 68);
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 63	KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGGGTL CGALLVDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSARSVRAQRITDMPKTQKEVIII.KNASRG SA (SEQ ID NO: 69);

(continuación)

	péptido HB	Enlazador	variante de IGF-1 (por ejemplo, X)	Secuencia
HB-X	C16R (SEQ ID NO: 2)	GG G	SEQ ID NO: 63	KRKKKGLGKRRDPRLRKYKGGGTLCCGAEIYDALQF VCGDRGIYINKPTGYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 70);
HB-X	C16K (SEQ ID NO: 3)	GG G	SEQ ID NO: 63	KRKKKGLGKRRDPKLRKYKGGGTLCCGAEIYDALQF VCGDRGFYFNKPTGYGSSRRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRL EMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 71).

También se abarca que el péptido HB se puede localizar en el extremo N o en el extremo C o en el extremo N y C del principio activo, por ejemplo, un principio activo por ejemplo, tal como IGF-1. En algunas realizaciones de la divulgación, el péptido HB se puede localizar en el extremo N o el extremo N o en los extremos N y C del principio activo con o sin un enlazador en cada transición entre el péptido HB y el principio activo. Por consiguiente, las variaciones en las secuencias de la Tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 12-71) están abarcadas donde el HB se ubica en el extremo C en lugar del extremo N, y donde hay la presencia o ausencia de un enlazador entre la proteína IGF-1 y la secuencia del extremo C HB. En realizaciones adicionales, las variaciones en las secuencias de la Tabla 1 (por ejemplo, SEQ ID NO: 12-71) están abarcadas donde el HB se ubica en ambos extremos C y N, y donde hay la presencia o ausencia de un enlazador entre la proteína IGF-1 y la secuencia del extremo C o del extremo N. En algunas realizaciones de la divulgación, cualquier combinación de un péptido HB seleccionado del grupo de las SEQ ID NO: 1-3 o 20-22 se puede usar con cualquier combinación de un principio activo, con o sin la presencia de una proteína enlazadora, donde el péptido HB se puede situar en el extremo N y/o C del principio activo, y hay uno o múltiples enlazadores peptídicos HB unidos al extremo N y/o C del principio activo. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la fusión o conjugado puede comprender (HB-enlazador)_n-X_m-(enlazador-HB)_o, donde n, m, y o son números enteros, y m es al menos uno y n+o es al menos uno.

Los inventores habían previamente demostrado un enfoque para estimular la biosíntesis del cartílago usando una proteína IGF-1 de rata diseñada mediante ingeniería genética fusionada con un dominio de unión a heparina de rata, donde la proteínas de fusión, heparina-unión de IGF-1 (HB-IGF-1) se retiene en el cartílago después de la inyección intraarticular. (Miller y col., 62 Arth. Rheum. 3686 (2010)). En el presente documento, en lugar de utilizar el péptido HB de rata natural, como usó Miller, los inventores han modificado el péptido HB humano natural (por ejemplo, correspondiente en el presente documento a la SEQ ID NO: 1), y han demostrado sorprendentemente que las construcciones de HB de la SEQ ID NO: 2 o 3 que se desvela en el presente documento (donde el C16 de la SEQ ID NO: 1 o C17 de la SEQ ID NO: 20 se cambia de una cisteína (C) a una arginina (R) o lisina (K)) da como resultado en ambos (i) una expresión y rendimiento significativamente aumentados de la proteína de fusión HB-IGF-1 y (ii) mayor retención de la HB-proteína de fusión en el tejido de interés. Por consiguiente, las novedosas mutaciones en el péptido HB humano natural para cambiar C16 (de la SEQ ID NO. 1) o C17 (de la SEQ ID NO. 20) para potenciar la carga positiva dio sorprendente como resultado un aumento inesperado en la expresión y producción de las proteínas de fusión HB-X.

De esta forma, la presente memoria descriptiva demuestra la cinética de una proteína de fusión HB-IGF-1 que comprende la SEQ ID NO: 2 o SEQ ID NO: 3 tras inyección intraarticular, y muestra la estimulación funcional de HB-IGF-1 sobre cartílago de la articulación in vivo, y demuestra la eficacia terapéutica in vivo de HB-IGF-1 en un modelo de rata de artritis inducida por lesión articular.

Por consiguiente, en algunas realizaciones de la divulgación, un péptido HB de la SEQ ID NO: 1-3 o 20-22, especialmente en algunas realizaciones de la invención, un conjugado HB-X que comprende al menos una o una combinación de la SEQ ID NO: 2, 3, 21 o 22, conjugada con un principio activo, tal como aunque no de forma limitativa a una proteína IGF-1 o fragmento funcional de la misma (por ejemplo, cualquier variante de IGF-1 seleccionada entre las secuencias del grupo de: SEQ ID NO: 6-9 o 63) está abarcada para su uso en la presente invención, en procedimientos para tratar una enfermedad o trastorno relacionada con el cartílago.

Los inventores demostraron en el presente documento que, sorprendentemente, a diferencia de IGF-1 solo (por ejemplo, no fusionado a un agente), no solo queda la proteína de fusión HB-IGF-1 que se desvela en el presente documento retenida en la matriz extracelular del cartílago tras inyección intraarticular, sino que sigue siendo capaz de estimular las células del cartílago y es terapéuticamente eficaz. Más específicamente, para determinar la cinética de HB-IGF-1 en su unión al cartílago in vivo, los tejidos de la articulación se recogieron después de la inyección y los extractos tisulares se analizaron mediante análisis Western (Figura 1). Dos días después de la inyección de IGF-1, no hubo IGF-1 detectable remanente en ninguno de los tejidos articulares recogidos. Por el contrario, HB-IGF-1 quedó retenida en los cartílagos tanto articular como del menisco, pero no en el tendón de la rótula. Se observó un resultado similar cuatro días después de la inyección. De 6 a 8 días después de la inyección, HB-IGF-1 siguió siendo detectable en los extractos de cartílago, pero las bandas inmunorreactivas fueron débiles y más variables. Estos resultados demuestran que, a diferencia de IGF-1, la presente proteína de fusión HB-IGF-1 queda retenida en el cartílago articular durante un máximo de 8 días tras inyección intraarticular. En la Figura 2 se muestran los resultados de la farmacocinética de IGF-1 en suero, que indican que HB-IGF-1 inyectado en forma intraarticular redujo notablemente las fugas hacia la circulación sistémica, en comparación con IGF-1 sin modificar.

Adicionalmente, la HB-IGF-1 produjo una estimulación sostenida de la biosíntesis del cartílago in vivo. HB-IGF-1 siguió siendo capaz de activar los receptores celulares de IGF-1 in vivo a pesar de su mayor unión a sulfato de condroitina en la matriz extracelular del cartílago. La incorporación de sulfato al cartílago del menisco recogido tras la inyección se midió y se normalizó para su incorporación tras inyección de solución salina solamente (Figura 3). Dos días después de la inyección, HB-IGF-1 estimuló una tasa significativamente superior de incorporación de sulfato de lo que lo hizo el IGF-1 (HB-IGF: $2,10 \pm 0,52$; IGF: $0,49 \pm 0,11$; N = 4-5/grupo; P = 0,032). Cuatro días después de la inyección, la incorporación de sulfato permaneció significativamente mayor en el grupo de HB-IGF-1 que en el grupo de IGF-1 (HB-IGF: $1,82 \pm 0,09$; IGF: $1,05 \pm 0,21$; N = 5/grupo; P = 0,011).

Además, HB-IGF-1 protege el cartílago in vivo después de la transección del menisco medio. Más específicamente,

5 HB-IGF-1 es eficaz en un modelo en rata de OA inducida quirúrgicamente. Las ratas se sometieron a cirugía de desgarro en el menisco medio (MMT) y recibieron una inyección semanal de HB-IGF, IGF, o solución salina. Tres semanas después de la cirugía MMT, se llevó a cabo una evaluación histológica de la artrosis (OA) en la rodilla. Para la medida del resultado primario (Figura 4), la puntuación OARSI global fue significativamente menor en las articulaciones de los animales tratados con HB-IGF-1 en comparación con los animales del control tratados con IGF-1 (HB-IGF: $12,9 \pm 1,5$; IGF: $18,7 \pm 1,2$; N = 9-10/grupo; P = 0,008). También se observaron diferencias significativas entre las rodillas tratadas con HB-IGF-1 e IGF-1 en los análisis secundarios de anchura de degeneración total y pérdida completa del cartílago, como se muestra en la Tabla 2:

Tabla 2. Análisis del cartílago en el modelo MMT de rata. (Los resultados se muestran como promedio \pm SEM.)

	Solución salina (n=8)	IGF-1 (n=9)	HB-IGF-1 (n=10)
Pérdida de superficie de cartílago	174 \pm 56	207 \pm 39	120 \pm 41
Pérdida de espesor completo del cartílago	36 \pm 15	95 \pm 35	0 \pm 0
Anchura total de degeneración	436 \pm 28	506 \pm 57	343 \pm 36
Anchura significativa de degeneración	202 \pm 13	236 \pm 30	178 \pm 17

10 En algunas realizaciones, las composiciones que se desvelan en el presente documento proporcionan una proteína de fusión terapéutica que permite una administración y retención selectivas de las proteínas bioactivas en el sitio deseado. HB-IGF-1 quedó retenida en el cartílago articular y el menisco de 4 a 8 días después de la inyección a niveles suficientes para estimular la síntesis de proteoglicanos. IGF-1 (sin fusionar con HB) no quedó tan retenido. Por consiguiente, la administración local de HB-IGF-1 *in vivo* puede reducir la progresión de la enfermedad en un modelo de artrosis en menisco de rata. En comparación con IGF-1 o vehículo, HB-IGF-1 redujo significativamente la progresión del daño del cartílago según se determina mediante una puntuación OARSI modificada. Los análisis secundarios demostraron una puntuación de degeneración del cartílago inferior, y la prevención de la pérdida de toda la profundidad del cartílago, lo que sugiere un efecto beneficioso global sobre el cartílago.

20 Aunque IGF-1 es uno de los principales factores de crecimiento anabólicos del cartílago, los intentos de reparar el cartílago y prevenir la artrosis (OA) con una inyección intraarticular de IGF-1 en solitario no habían tenido éxito. Rogachefsky y col., 1993; Schmidt y col., 2006. Los presentes datos demuestran que estos resultados negativos no eran debidos a una falta de efecto del propio IGF-1, sino en su lugar, porque el IGF-1 "libre" no queda retenido en el cartílago durante una cantidad de tiempo significativa (IGF-1 queda retenido menos de 24 horas) después de la administración intraarticular.

25 Adicionalmente, estos datos tienen implicaciones para las terapias con proteínas inyectables para el cartílago en general. El desarrollo de futuras terapias deberá evaluar si se necesitará un mecanismo de direccionamiento para producir una administración sostenida a los condrocitos. La cinética de la retención en el cartílago se pueden verificar en otros modelos o experimentos, de forma que un resultado experimental negativo para un agente particular no debe interpretarse como un fracaso del agente en sí. Curiosamente, FGF-18, otro factor de crecimiento que ha demostrado ser terapéutico en este modelo, es un factor de crecimiento de unión a heparina ((Moore y col., 2005) Hu y col., 1998; Chuang y col., 2010)).

Como se demuestra en el presente documento en los Ejemplos, HB-PTH (pero no PTH solo) demuestra también quedar retenido en explantes de cartílago.

35 Además, los datos farmacocinéticos sistémicos sugieren que los niveles de IGF no eran lo suficientemente altos como para cambiar los niveles de glucosa hasta unirse a los receptores de insulina. Si el aumento en los niveles sistémicos se limita a ~24 horas, disminuirán los problemas acerca de la elevación a largo plazo de los niveles de IGF.

40 Por otra parte, un resultado inesperado observado en el presente documento fue la respuesta sólida del cartílago tanto articular como del menisco a Hb-IGF. Aunque la densidad de carga de un menisco es heterogénea y menor que la de otros cartílagos articulares, HB-IGF-1 quedó retenido a niveles suficientes para estimular la síntesis de proteoglicanos en el menisco. Esto demuestra que HB-IGF puede ser directamente protectora del cartílago tanto articular como del menisco y, por tanto, sería especialmente eficaz después de lesiones del menisco.

45 HB-IGF como terapia para la OA puede ser menos eficaz en la artrosis OA a largo plazo, en comparación con la OA temprana, porque HB-IGF puede necesitar la presencia de proteoglicanos sulfatados en la matriz para una retención a largo plazo en el cartílago. No obstante, HB-IGF se puede usar como una nueva terapia condroprotectora en el escenario de una lesión aguda traumática en una articulación que anteriormente estaba sana.

En otras realizaciones, la HB-proteína de fusión comprende factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18) o una parte funcional del mismo. Los miembros de la familia FGF tienen una gran cantidad de actividades mitogénicas y de

supervivencia celular, y están implicados en una variedad de procesos biológicos, que incluyen el desarrollo embrionario, crecimiento celular, morfogénesis, reparación del tejido. Por tanto, por ejemplo, el FGF-18 humano maduro se puede incorporar a una HB-proteína de fusión, donde FGF-18 tiene la secuencia de aminoácidos:

5 EENVDFRIHVENQTRARDDVSRKQLRLYLQYSRTSGKHIQVLGRRISARGEDGDKYAQLLVETD
TFGSQVRIKGETEFYLCMNRKGLVGPDPGTSKECVFIEKVLENNYTALMSAKYSGWYVGF
KKGRPRKPKTRENQQDVHFMKRYPKGQPELQKPFKYTTVTKRSRRIRPHTPA (SEQ ID NO: 31). Véase también ID génica: 8817. HB puede estar fusionado a los extremos N o C de FGF-18 (por ejemplo, HB-FGF, FGF-HB, HB-enlazador-FGF, o FGF-enlazador-HB) o una parte de FGF-18, por ejemplo, los restos 1-169 de FGF-18 maduro.

10 En algunas realizaciones, la HB-proteína de fusión comprende hormona paratiroidea (PTH), o una parte de la misma. PTH está implicado en el mantenimiento de los niveles de calcio y la osteostasia, y puede prevenir la pérdida de cartílago que se produce después de una lesión articular. Véase, por ejemplo, Harrington y col., 290 Anatom. Rec. 155 (2007). Por tanto, por ejemplo, el PTH puede ser PTH maduro, que tiene la secuencia de aminoácidos:

SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPRDAGSQRPRKKEDNVLVES
HEKSLGEADKADVNVLTAKKSQ (SEQ ID NO:32).

15 En algunas realizaciones, HB puede estar fusionado a los extremos amino o carboxi de la PTH, o parte de la PTH, tal como los restos de aminoácidos 1-31, 1-34, 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de PTH maduro. En algunas realizaciones, una parte de la PTH puede ser un fragmento del extremo N de 1-34 aminoácidos (denominado como PTH (1-34) correspondiente a: SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNF (SEQ ID NO:33). En algunas realizaciones, una parte de la PTH fusionada a un péptido HB se puede seleccionar entre las siguientes secuencias de aminoácidos: PTH(1-31): SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDV (SEQ ID NO:34); PTH(1-37): SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVAL (SEQ ID NO: 35); PTH(1-44): SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVALGAPLAPR (SEQ ID NO: 36).

20 Como se demuestra en el presente documento en los Ejemplos, HB-PTH(1-34) (pero no PTH (1-34) solo) demuestra también quedar retenido en explantes de cartílago. En algunas realizaciones, una proteína de fusión HB-PTH(1-34) es una proteína de fusión PTH(1-34) -enlazador - proteína de fusión, y comprende los aminoácidos: SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFVGGG KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO: 37).

25 Adicionalmente, PTH puede ser un análogo de PTH, tal como PTH(1-31) cíclica. La PTH(1-34) recombinante humano se comercializa en la actualidad como Forteo® (inyección de teriparátido [origen ADN_r] de Eli Lilly & Co (Indianápolis, IN). OSTABOLIN-C™, (ZT-031; PTH(1-31) cíclica) se ha investigado en los ensayos clínicos por Zelos Therapeutics, Inc. (West Conshohocken, PA).

30 En otras realizaciones adicionales, la HB-proteína de fusión comprende PTHrP o una parte de la misma. PTHrP se ha implicado en la condroprotección de cartílago recientemente regenerado después de la lesión. Wang y col., 19 Osteoarth. Cartil. 213 (2011); Sampson y col., Ann. Meeting Am. Soc. Bone Mineral Res. (2009). PTHrP maduro tiene los aminoácidos:

35 AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRFFLHHLIAEIHAEIRATSEVSPNSKPSNTKNHPVRFSGSDDEGR
YLTQETNKVETYKEQPLKTP (SEQ ID NO: 38). Véase también PLHLH, ID génica:5744. La proteína de fusión PTHrP HB se puede disponer, por ejemplo: PTHrP-enlazador-HB; PTHrP(1-34)-enlazador-HB; PTHrP(1-36)-enlazador-HB; PTHrP(1-37)-enlazador-HB; PTHrP(1-40)-enlazador-HB, etc.

40 Otro ejemplo de una proteína de fusión PTHrP-HB incluye una porción sintética de PTHrP (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), se puede fusionar con HB, por ejemplo, AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA (SEQ ID NO: 39)-enlazador-HB, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico). Aib en este análogo o derivado de PTHrP designa ácido α -aminoisobutírico (también denominado ácido 2-aminoisobutírico, α -metilalanina, o 2-metilalanina). Este polipéptido relacionado con PTHrP se puede fabricar sintéticamente o por medios recombinantes, o mediante una combinación de estos. Véase Wang y col., 292 Science 498 (2001); Ryu & Schultz, 3 Nat. Methods 263 (2006).

45 Tal como se observa, las composiciones de la presente invención pueden comprender HB-X2 o 2 o más proteínas de fusión HB-X diferentes, etc., donde X representa dos principios activos diferentes. De esta manera, por ejemplo, una composición puede comprender cualquier combinación de HB-PTHrP y/o HB-PTH, y/o HB-IGF-1, por ejemplo, para su uso en procedimientos para regenerar cartílago, o estabilizar el cartílago regenerado después de una lesión, etc.

Otro ejemplo más de proteínas de fusión de HB fusiona HB con IL1RA (antagonista del receptor interleuquina-1) como, por ejemplo, HB-enlazador-IL1RA o IL1RA-enlazador-HB. IL1RA es un miembro de la familia de la citoquina interleuquina 1. IL1RA se secreta por varios tipos de células, incluidas las células inmunitarias, células epiteliales, y adipocitos, y es un inhibidor natural del efecto proinflamatorio de IL1 β . Esta proteína inhibe las actividades de la

interleuquina 1, alfa (IL1A) e interleuquina 1, beta (IL1B), y modula una variedad de respuestas inmunitarias e inflamatorias relacionadas con interleuquina 1. Véase Arend, 13 Cytokine Growth Factor Rev. 323 (2002). En algunas realizaciones, el HB se fusiona con quimeras IL-1/IL-1 RA (por ejemplo, como se desvela en Hou y col., PNAS,2013, 110(10):3913-8), por ejemplo, para su uso en el tratamiento de daños o lesiones en el cartílago y/o menisco, o para el tratamiento del ojo o dolencias inflamatorias. La IL1RA madura tiene la secuencia de aminoácidos:

RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNNQLVAGYLQGPVNVLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGK
MCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEAD
QPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40). Véase también, ID génica: 3557.

10 Otra realización de la presente invención, la fusión HB comprende HB fusionado con HGMB2 (también denominado HMG2). El cartílago articular es un tejido que proporciona propiedades biomecánicas que permiten el movimiento de la articulación casi sin rozamiento, así como la dispersión de las cargas mecánicas. El cartílago está compuesto de un único linaje celular, pero se diferencia en la organización, fenotipo y función de las células en las diferentes capas que se han reconocido en el cartílago. La zona superficial (ZS) es la más exclusiva. Las células ZS producen lubricina, también denominada proteoglicano-4 (PRG4) o proteína de la zona superficial (PZS), un importante lubricante articular; son más sensibles a estimulación por citoquinas catabólicas tales como IL-1; y expresan marcadores de citoblastos mesenquimales. La expresión de HMGB2 está restringida a la ZS del cartílago articular, y un interacción entre HMGB2 y la ruta Wnt/ β -catenina regula el mantenimiento de la ZS y estimula la supervivencia de los condrocitos. De forma importante, el envejecimiento de las articulaciones en seres humanos y ratones conduce a una pérdida de expresión de HMGB2 con el inicio de cambios análogos a OA. Taniguchi y col., 106 PNAS 16817 (2009). HMG2 humano tiene la secuencia de aminoácidos (UniProtKB/Swiss-Prot: P26583.2; véase también ID génica: 3148):

MGKGDPNKPR GKMSYAFFV QTCREEHKKK HPDSSVNF AE FSKKCSERWK TMSAKEKSKF
EDMAKSDKAR YDREMKNYVP PKGDKKGGKKK DPNAPKRPPS AFFLFCSEHR PKIKSEHPGL
SIGDTAKKLG EMWSEQSAKD KQPYEQKAAK LKEKEYEKDIA AYRAKKGKSEA GKKGPGRPTG
SKKKNPEPEDE EEEEEEEDED EEEEEDEDEE (SEQ ID NO: 82).

25 En algunas realizaciones, una HB-proteína de fusión comprende somatostatina (SST) o un fragmento funcional o análogo de la misma (por ejemplo, un péptido HB se puede conjugar con las moléculas pequeñas octreotida (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®)). Dicha HB-proteína de fusión que comprende SST o un fragmento funcional o variante o análogo de la misma se puede usar para el tratamiento de defectos y trastornos del cartílago y/o del menisco, así como contra enfermedades inflamatorias. SST humana tiene la secuencia de aminoácidos (Uni-ProtKB/Swiss-Prot: Hs.12409; véase también ID génica: 6750): MLSCRLQCAL AALSIVLALG CVTGAPSDPR LRQFLQKSLA
30 AAAGKQELAK YFLAELLSEPNQTENDALEP EDLSQAAEQD EMRLELQRSA NSNPAMAPRE RKAGCKNFFW
KTFTSC (SEQ ID NO: 72).

35 En algunas realizaciones, una HB-proteína de fusión comprende un análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3) o un fragmento funcional o análogo de la misma. Dicha HB-proteína de fusión que comprende SST o un fragmento funcional o variante o análogo de la misma se puede usar para el tratamiento de defectos y trastornos del cartílago y/o del menisco, así como contra enfermedades inflamatorias. preproproteinANGPTL3 humano tiene la secuencia de aminoácidos (UniProtKB/Swiss-Prot: Q9Y5C1; véase también ID génica: 27329 o NP 055310.1"):

MFTIKLLLFI VPLVISSRIDQDNSSFDLSPEPKSRFAMLDDVKILANGLLQLGHGLKDFV
HKTKGQINDIFQKLNIFDQSFYDLSLQTSSEIKEEEEKELRRTTYKLQVKNEEVKNMSLELN
SKLESLLEEKILLQKVKYLEEQLTNLIQNQPETPEHPEVTSKTFVEKQDNSIKDLLQTV
EDQYKQLNQQHSQIKEIENQLRRTSIQEPTEISLSSKPRAPRTTPFLQLNEIRNVKHGIPA
ECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYK
YGFGRDLGDFWLGLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHYIEYSFYLGNHETNYTLHL
VAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPGEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYN
KPRAKSKPERRRGLSW KSQNGRLYSIKSTKMLIHPTDSESFE (SEQ ID NO: 73).

40 En algunas realizaciones, una HB-proteína de fusión comprende un fragmento funcional de análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3). Los fragmentos funcionales de ANGPTL3 incluyen, pero no se limitan a: ANGPTL3

(241-455) humano correspondiente a:

GIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVVFHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWE
 NYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNY
 TLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNG
 KYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD (SEQ ID NO: 74);

ANGPTL3 (225-455) humano

5 TTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQVVFHVYCDVISGSPWTLI
 QHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSNYVLRIELEDWKDNKH
 YIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHKAKGHFNCPEGYSGG
 WWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYSIKSTKMLIHPTD (SEQ ID NO: 75); ANGPTL3
 (207-455) humano

IQEPTAISLSSKPRAPRTTTPFLQLNEIRNVKHDGIPAECTTIYNRGEHTSGMYAIRPSNSQV
 FHVYCDVISGSPWTLIQHRIDGSQNFNETWENYKYGFGRLDGEFWLGLLEKIYSIVKQSN
 YVLRIELEDWKDNKHIEYSFYLGHNHETNYTLHLVAITGNVPNAIPENKDLVFSTWDHK
 AKGHFNCPEGYSGGWWWHDECGENNLNGKYNKPRAKSKPERRRGLSWKSQNGRLYS
 IKSTKMLIHPTD (SEQ ID NO: 76)

10 Los proteoglicanos humanos, con los que HB se asocia, proporcionan una vía para la administración selectiva de principios terapéuticos al sistema nervioso central. Véase, por ejemplo, Brandtlow y Zimmerman, 80 *Physiol. Rev.* 1267 (2000). Como se demuestra en el presente documento en los Ejemplos, una proteína de fusión HB-IGF-1 se retiene en la médula espinal. De acuerdo con ello, en algunas realizaciones, una HB-proteína de fusión puede comprender un principio activo para administración en el cerebro y la médula espinal.

15 En algunas realizaciones, una HB-proteína de fusión comprende IL-10. IL-10, una citoquina antiinflamatoria, se ha notificado como beneficiosa en sujetos con esclerosis múltiple (EM); la inducción de la citoquina antiinflamatoria IL-10 proporcionó ventaja clínica en pacientes de EM. Ersoy y col., 12 *Eur. J. Neurol.* 208 (2005). De este modo, otra realización proporciona una fusión HB-X en la que X es IL-10 o una parte de la misma.

20 Como alternativa, donde X es una porción de proteína terapéutica de una proteína de fusión HB-X recombinante, X se puede seleccionar entre factores neurotróficos, incluidas neurotrofinas tales como el factor de crecimiento nervioso (NGF; ID génica: 4803), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF, ID génica: 627), neurotrofina-3 (NT3, ID génica:4908), neurotrofina-4 (NTF4, ID génica: 4909), factor neurotrófico ciliar (CNTF, ID génica: 1270), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF, ID génica: 7873), o factor neurotrófico de la dopamina cerebral (CDNF, ID génica: 441549); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial tales como el factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF, ID génica: 2668), neurturina (NRTN, ID génica: 4902), artemina (ARTN, ID génica: 9048), o persefina (PSPN, ID génica: 5623).

25 En algunas realizaciones, el principio activo X se puede seleccionar entre citoquinas neuropoyéticas tales como interleuquina-6 (IL6, ID génica: 3569), interleuquina-11 (IL11, ID génica: 3589), interleuquina-27 (IL27, ID génica: 246778), factor de inhibición de la leucemia (LIF, ID génica: 3976), factor neurotrófico ciliar (CNTF, ID génica: 1270), cardiotrofina 1 (CTF1, ID génica: 1489), neuropoyetina (ortólogo NP de ratón, pseudogén humano ID génica: 647088), citoquina de tipo cardiotropina (CLGF1, ID génica: 23529), o factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, ID génica: 2247);

30 En algunas realizaciones, el principio activo X se puede seleccionar entre las citoquinas antiinflamatorias que incluyen interleuquina-4 (ILR4, ID génica: 3565), e interleuquina-10 (ILR10, ID génica:3586);

35 En algunas realizaciones, el principio activo X se puede seleccionar entre agentes neuroprotectores que incluyen neurregulina 1 (NRG1, Gen ID: 3084), y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFA, ID génica: 7422, VEGFB, ID génica: 7423, VEGFC, ID génica: 7424).

40 Como alternativa, en algunas realizaciones, el principio activo X se puede seleccionar entre otras proteínas terapéuticas tales como CEREBROLYSIN® (preparación de péptido cerebral de cerdo FPF-1070, Ever Neuro Pharma, Austria), factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11, ID génica: 10220), factor derivado de células del estroma 1 (SDF1, también CXCL12, ID génica: 6387), miostatina (MSTN, ID génica:2660), hormona paratiroidea (PTH, ID génica: 5741); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP o PLHLH, ID génica:5744);

antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL1RN, ID génica: 3557); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF18, ID génica: 8817); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMGB2, ID génica: 3148); un anticuerpo terapéutico o parte del mismo, tal como Remicade® (infiximab, anti-TNF- α , Janssen Biotech, Horsham, PA), Humira® (adalimumab, anti-TNF, Abbot Labs., N. Chicago, IL), o Enbrel® (etanercept, receptor de TNF recombinante 2 soluble fusionado al componente Fc de la inmunoglobulina humana G1, Amgen, Thousand Oaks, CA).

En algunas realizaciones, el principio activo X puede ser un receptor glucocorticoideo, tal como el miembro 1 del grupo C de la subfamilia 3 de receptores nucleares (NR3C1, ID génica: 2908;

En algunas realizaciones, el principio activo X puede ser una parte, variante, análogo, o derivado, de cualquiera de las moléculas terapéuticas anteriores.

Principios activos - moléculas pequeñas terapéuticas

En otras realizaciones más adicionales, HB se puede aprovechar para realizar la administración selectiva de moléculas pequeñas terapéuticas. Por ejemplo, la molécula pequeña TR2-01829, un análogo optimizado de PRO1, tiene propiedades condrogénicas. Más específicamente, PRO1 o un análogo optimizado, un candidato al desarrollo de molécula pequeña que ha demostrado dirigir la diferenciación de MSC avanzando en la ruta condrogénica, puede demostrar ser útil en la terapia regenerativa para la OA. Adicionalmente, 2-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) fue un potente inhibidor de la producción de NO y la expresión de iNOS en condrocitos porcinos estimulados por TNF- α . Al disminuir la regulación de la actividad de IRF-1 inducida por TNF- α , que suprime la activación de los condrocitos y evita la destrucción del cartílago, HS-Cf debería ser un potencial fármaco modificador de la enfermedad para usar como terapia de OA. Liu y col., 31 J. Clin. Immunol. 1131 (2011). Los estudios *in vitro* y con ratones sugieren que la molécula pequeña kartogenina podría ayudar a tratar la artrosis. 5(18) SciBX (May 3, 2012).

La molécula pequeña se puede unir a la parte HB de la composición mediante numerosos enfoques conocidos. Muchos agentes de unión bivalentes o polivalentes son de utilidad para acoplar las moléculas de proteínas a otras moléculas. Por ejemplo, los agentes de acoplamiento representativos pueden incluir compuestos orgánicos tales como tioésteres, carbodiimidas, ésteres de succinimida, diisocianatos, glutaraldehídos, diazobencenos y hexametildiaminas. Este listado no pretende ser exhaustivo de las distintas clases de agentes de acoplamiento conocidos en la técnica pero, en su lugar, es ilustrativo de los agentes de acoplamiento más habituales. Véanse Killen y Lindstrom, 133 J. Immunol. 1335 (1984); Jansen y col., 62 Imm. Rev. 185 (1982). En algunas realizaciones, los agentes reactivos de reticulación descritos en las referencias están abarcados para su uso en las composiciones de HB que se desvelan en el presente documento. Véase, por ejemplo, Ramakrishnan, y col., 44 Cancer Res. 201 (1984) (que describe el uso de MBS (éster de M-maleimidobenzoil-N-hidroxisuccinimida)); Umemoto y col., patente de Estados Unidos n.º 5.030.719 (que describe el uso de un derivado halogenado de acetil hidrazida acoplado a un anticuerpo mediante un enlazador oligopeptídico). Los enlazadores particulares incluyen: (a) EDC (clorhidrato de 1-etil-3-(3-dimetilamino-propil) carbodiimida); (b) SMPT (4-succinimidiloxycarbonil-alfa-metil-alfa-(2-piridil-ditio)-tolueno (Pierce Chem. Co., n.º de catálogo (21558G)); (c) SPDP [3-(2-piridilditio)propionamido]hexanoato de (succinimidilo 6) Pierce Chem. Co., n.º de Cat. 21651G); (d) Sulfo-LC-SPDP ([3-(2-piridiltio)-propionamida] hexanoato de sulfosuccinimidilo 6) (Pierce Chem. Co. n.º de Cat. 2165-G); y (f) sulfo-NHS (N-hidroxisulfo-succinimida: Pierce Chem. Co., n.º de catálogo 24510) conjugada con EDC.

Las uniones o agentes de unión anteriormente descritos contienen componentes que tienen diferentes atributos, llevando de esta forma a conjugados con distintas propiedades físico-químicas. Por ejemplo, los sulfo-NHS ésteres de carboxilatos de alquilo son más estables que los sulfo-NHS ésteres de carboxilatos aromáticos. Los enlazadores que contienen ésteres de NHS son menos solubles que los ésteres de sulfo-NHS. Además, el enlazador SMPT contiene un enlace disulfuro estéricamente impedido, y puede formar conjugados de mayor estabilidad. Los enlaces disulfuro, de manera general, son menos estables que otros enlaces porque el enlace disulfuro se puede escindir *in vitro*, dando como resultado menos conjugado disponible. Sulfo-NHS, en particular, puede potenciar la estabilidad de los acoplamientos de carbodiimida. Los acoplamientos de carbodiimida (tales como EDC) cuando se usan junto con sulfo-NHS, forman ésteres que son más resistentes a l hidrólisis que la reacción de acoplamiento de carbodiimida en solitario.

Las moléculas de reticulación ilustrativas para su uso en los procedimientos y composiciones que se desvelan en el presente documento incluyen, aunque no de forma limitativa, a las relacionadas en las Tablas 3 y 4:

Tabla 3. Reticulantes homobifuncionales ilustrativos (reactivos de reticulación homobifuncionales que tienen el mismo tipo de grupo reactivo en ambos extremos. Los reactivos se clasifican por los grupos químicos que reticulan (columna de la izquierda) y su composición química (columna del centro). Los productos están relacionados en orden de longitud creciente en cada célula).

Diana de reticulación	Grupos reactivos con el reticulante, Rasgos	Productos de ejemplo
Amina con amina	ésteres NHS	DSG; DSS; BS3; TSAT (trifuncional); parejas de reactivos bioconjugados en Toolkit
	ésteres NHS, separador PEG	BS(PEG)5; BS(PEG)9
	ésteres NHS, escindible por tiol	DSP; DTSSP
	ésteres NHS, escindible por misc.	DST; BSOE; EGS; Sulfo-EGS
	Imidoésteres	DMA; DMP; DMS
	Imidoésteres, escindible por tiol	DTBP
	Otro	DFDNB; THPP (trifuncional); kit de dextrano activado por aldehído
Sulfhidrilo con sulfhidrilo	Maleimidias	BMOE; BMB; BMH; TMEA (trifuncional)
	Maleimidias, separador PEG	BM(PEG)2; BM(PEG)3
	Maleimidias, escindible	BMDB; DTME
	Piridilditioles (escindible)	DPDPB
	Otro	HBVS (vinilsulfona)
No selectivo	Arilazidad	BASED (escindible por tiol)

5 **Tabla 4.** Reticulantes heterobifuncionales ilustrativos (reactivos de reticulación heterobifuncionales que tienen diferentes grupos reactivos en ambos extremos. Los reactivos se clasifican por los grupos químicos que reticulan (columna de la izquierda) y su composición química (columna del centro). Los productos están relacionados en orden de longitud creciente en cada célula.)

Dianas de reticulación	Grupos reactivos con el reticulante, Rasgos	Productos de ejemplo
Amina con sulfhidrilo	éster NHS/maleimida	AMAS; BMPS; GMBS y sulfo-GMBS; MBS y sulfo-MBS; SMCC y sulfo-SMCC; EMCS y sulfo-EMCS; SMPB y sulfo-SMPB; SMPH; LC-SMCC; sulfo-KMUS
	éster NHS/maleimida, separador PEG	SM(PEG)2; SM(PEG)4; SM(PEG)6; SM(PEG)8; SM(PEG)12; SM(PEG)24
	éster NHS/piridiltiol, escindible	SPDP; LC-SPDP y sulfo-LC-SPDP; SMPT; sulfo-LC-SMPT
	ésteres NHS/halocetilo	SIA; SBAP; SIAB; sulfo-SIAB
Amina con no selectivo	éster NHS/arilazida	NHS-ASA ANB-NOS sulfo-HSAB sulfo-NHS-LC-ASA SANPAH y sulfo-SANPAH

(continuación)

Dianas de reticulación	Grupos reactivos con el reticulante, Rasgos	Productos de ejemplo
	éster NHS/arilazida, escindible	sulfo-SFAD; sulfo-SAND; sulfo-SAED
	éster NHS/diazirina	SDA y sulfo-SDA; LC-SDA y sulfo-LC-SDA
	éster NHS/diazirina, escindible	SDAD y sulfo-SDAD
Amina con carboxilo	Carbodiimida	DCC; EDC
Sulfhidrilo con no selectivo	Piridilditiol/arilazida	APDP
Sulfhidrilo con carbohidrato	Maleimida/hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
	Piridiltiol/hidrazida	BMPH; EMCH; MPBH; KMUH
Carbohidrato con no selectivo	Hidrazida/arilazida	ABH
Hidroxilo con sulfhidrilo	Isocianato/maleimida	PMPI
Amina con ADN	éster NHS/psoraleno	SPB

Las moléculas pequeñas y, donde sea relevante, las proteínas de fusión, de las composiciones HB-X pueden incluir profármacos. El término "profármaco" se refiere a cualquier compuesto que libera un precursor activo *in vivo* cuando dicho profármaco se administra a un sujeto mamífero. Los profármacos de un compuesto I se preparan de forma típica modificando uno o más grupo(s) funcionales presentes en el compuesto de tal manera que la(s) modificación(es) se puede(n) escindir *in vivo* para liberar el compuesto progenitor. Los ejemplos de profármacos incluyen, aunque no de forma limitativa, ésteres (por ejemplo, derivados de acetato, formiato, y benzoato) y carbamatos (por ejemplo, N,N-dimetilaminocarbonilo) de grupos hidroxifuncionales, y amidas, derivados de carbamatos y urea de grupos aminofuncionalizados, y similares. Las formas de profármaco ofrecen ventajas de solubilidad, compatibilidad con tejidos, o liberación retardada en el organismo de los mamíferos. Véase Bundgard, DESIGN PRODRUGS, 7, 21 (Elsevier, Ámsterdam, 1985); Silverman, ORGANIC CHEMISTRY DRUG DESIGN & DRUG ACTION, 352 (Academic Press, San Diego, CA). Por otra parte, los derivados de profármaco de la invención se pueden combinar con otros rasgos característicos conocidos para un experto en la materia para potenciar la biodisponibilidad.

15 **Conjugados HB-X en el procedimiento de tratamiento**

Un aspecto de la presente invención se ilustra por un procedimiento de tratar una dolencia relacionada con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de un conjugado HB-X, tales como, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante que comprenden HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en el que X es un principio activo.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1); hormona paratiroidea (HPT); una parte de la PTH seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso, FGF-9, factor de crecimiento de hepatocitos, TGFβ, TGFβ3, BMP2, BMP7, análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3), somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionada entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®), receptor de TNF 2, interleuquina-4 e interleuquina-10; IL-11; un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, clonprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicartrato, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona,

tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona, para su uso en el tratamiento de dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) seleccionadas entre un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, raquitismo hipofosfatémico vinculado a X o uno o más síntomas de un trastorno articular o pérdida o daño del cartílago, incluidos uno o más síntomas del grupo de: inflamación de articulaciones, dolor articular, enrojecimiento de la articulación, laxitud de la articulación, síntomas de artritis leve, derrame articular hemorrágico, derrame articular inflamatorio, hipermovilidad de la articulación, derrame articular no inflamatorio. En algunas realizaciones, un principio activo para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago es una proteína terapéutica. En algunas realizaciones, la proteína terapéutica se selecciona entre la hormona paratiroidea (PTH); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGFβ, tales como TGFβ, TGFβ3, BMP2, o BMP7; o partes, análogos, derivados o fragmentos funcionales de las mismas.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago puede comprender al menos una proteína terapéutica de la hormona paratiroidea (PTH), por ejemplo, una seleccionada entre cualquier proteína o fragmento funcional de la misma seleccionada entre el grupo de: SEQ ID NO: 32-37.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago puede comprender X que es una proteína terapéutica seleccionada entre la hormona paratiroidea (PTH); una parte de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forte®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF seleccionadas entre TGF, TGFP3, BMP2, o BMP7 para su uso en el tratamiento de dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) seleccionadas entre un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, o raquitismo hipofosfatémico vinculado a X.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago puede comprender al menos una proteína terapéutica, por ejemplo, una seleccionada entre cualquier proteína o fragmento funcional de la misma seleccionada entre el grupo de: IGF-1 o variantes o fragmentos funcionales del mismo (SEQ ID NO: 6-9, SEQ ID NO: 63); FGF-18 (SEQ ID NO: 31); PTH o variantes o fragmentos funcionales del mismo (SEQ ID NO: 32-37); PTHrP (SEQ ID NO: 38, 39); IL-1 RA o quimeras IL-1/IL-1 RA (SEQ ID NO: 40); HMG (SEQ ID NO: 82); SST (SEQ ID NO: 72); ANGPTL3 o variantes o fragmentos funcionales del mismo (SEQ ID NO: 73-76); SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 73-76, o fragmento funcional de la misma.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago puede comprender al menos una molécula pequeña, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un antagonista de SST, por ejemplo, octreotida, pasireotida, o lamreotida. En algunas realizaciones, un conjugado HB-X que se desvela en el presente documento que comprende una proteína IGF-1 o fragmento funcional o variante de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 6-9 o SEQ ID NO: 63) se puede usar en el tratamiento de un sujeto con enanismo y/o con una afección relacionada con retraso del crecimiento.

Un aspecto de la presente invención se ilustra por un procedimiento de tratar una dolencia relacionada con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un conjugado HB-X, tales como, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante que comprenden HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, donde X es un receptor glucocorticoideo; y administrar además en de forma paralela o independiente un corticoesteroide.

En algunas realizaciones, la composición comprende una proteína de fusión recombinante que comprende HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3), somatostatina (SST); o análogos de la misma seleccionados entre octreotida, pasireotida o lanreotida para su uso en el tratamiento de dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) seleccionadas entre un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, raquitismo hipofosfatémico vinculado a X, o uno o más síntomas de un trastorno articular o pérdida o daño del cartílago, incluidos uno o más síntomas del grupo de: inflamación de articulaciones, dolor articular, enrojecimiento de la articulación, laxitud de la articulación, síntomas de artritis leve, derrame articular hemorrágico, derrame articular inflamatorio, hipermovilidad de la articulación, derrame articular no inflamatorio.

En algunas realizaciones, una dolencia relacionada con el cartílago es un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura

o desprendimiento traumático del cartílago, enfermedad o daño en el menisco y/o rótula, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, o raquitismo hipofosfatémico vinculado a X.

5 En algunas realizaciones, una dolencia relacionada con el cartílago es una rotura o desprendimiento del cartílago, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo o un daño o enfermedad que afecta el menisco y/o
 10 rótula. En algunas realizaciones, una dolencia relacionada con el cartílago se selecciona entre cualquiera o una combinación de enfermedades entre el siguiente grupo: artrosis (que se denomina en el presente documento como "OA" con el resultado de la rotura del cartílago), incluida la artrosis de rodilla, dedo, muñeca, cadera, tobillos, codo, dedos del pie, hombro y dorsal, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante,
 15 capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide (AR), lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, condropatía, condrosarcoma, condromalacia, policondritis, policondritis con recaída, epifisiolisis, osteocondritis disecante, condrodisplasia, costocondritis, raquitismo hipofosfatémico vinculado a X, osteocondroma, condrosarcoma (maligno), susceptibilidad a artrosis (tipos 1-6), espondilosis, osteocondrosis, condrosarcoma primario, condrodisplasia, síndrome de Tietze, distrofia dermocondrocorneal de Francois, displasia de la epífisis, múltiple, (tipos 1-5), cartílagos auricular osificado con deficiencia mental, degeneración progresiva del músculo y
 20 carga ósea, osteocondromatosis carpotarsal, acondroplasia, condrocalcinosis (tipos 1-2), genocondromatosis, condrodisplasia (trastorno del desarrollo sexual), condroma, Acondrogénesis (tipos 1A, 1B, 2, 3, 4, tipo Langer-Saldino), tipo II Acondrogénesis-hipocondrogénesis, Atelosteogénesis, (tipo 1, 2 y III), Pknoacondrogénesis, pseudoacondroplasia, artrosis de los dedos, familia, displasia sitrófica, discondrosteosis - nefritis, cartílagos de coloboma de ala nasal con telecantos, hipoplasia del cartílago del ala --coloboma -telecanto, síndrome de Pierre Robin --condrodisplasia fetal, dispondiloencondromatosis, acondroplasia regional --displasia del músculo abdominal, osteocondritis disecante, condrocalcinosis articular familiar, traceobroncomalacia, condritis, discondrosteosis, síndrome de Maffucci, displasia de Jequier-Kozlowski esquelética, condrodistrofia, osteoartropatía craneal, síndrome de Tietze, displasia de cadera --encondromata -econdromata, enfermedad de Bessel-Hagen, condromatosis
 25 (benigna), encondromatosis (benigna), condrocalcinosis debida a la deposición de cristales de apatito, síndrome de Meyenburg-Altherr-Uehlinger, encondromatosis-enanismo-hipoacusia, síndrome de Astley-Kendall, osteocondromatosis sinovial, condrocalcinosis familiar articular, acondroplasia grave con retraso en el desarrollo y acantosis nigricans, condrocalcinosis, síndrome de Keutel, síndrome de Stanescu, fibrocondrogénesis, hipocondroplasia.

30 Un sujeto adecuado para el tratamiento con un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago se selecciona entre un sujeto que tiene uno o más síntomas de un trastorno articular o pérdida o daño del cartílago, incluidos uno o más síntomas del grupo de: inflamación de articulaciones, dolor articular, enrojecimiento de la articulación, laxitud de la articulación, síntomas de artritis leve, derrame articular hemorrágico, derrame articular inflamatorio, hipermovilidad de la articulación, derrame articular no inflamatorio, u otros tipos.

35 En algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago es un sujeto que tiene osteocondritis disecante familiar, donde el sujeto tiene una mutación del gen ACAN. El gen ACAN proporciona instrucciones para fabricar la proteína agrecano, que es un componente del cartílago. El agrecano se une a los otros componentes del cartílago, organizar la red de moléculas que proporciona al cartílago su resistencia. De forma
 40 adicional, el agrecano atrae moléculas de agua y proporciona al cartílago su estructura de tipo gel. Este rasgo permite al cartílago resistir la compresión, proteger los huesos y articulaciones. La mutación en el gen ACAN asociada con la osteocondritis disecante familiar da como resultado una proteína anómala que no puede unirse a los otros componentes del cartílago. Como resultado, el cartílago es anómalo y está desorganizado y débil y conduce a lesiones compatibles con la osteocondritis disecante familiar.

45 En algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago tiene una enfermedad relacionada con la osteopenia u osteoporosis, por ejemplo, asociada con enfermedades perimenopáusicas y postmenopáusicas. También están abarcados el tratamiento y la profilaxia de la enfermedad de Paget, hipercalcemia asociada con neoplasias del hueso y los tres tipos de enfermedades osteoporóticas que se clasifican a continuación según su
 50 etiología: osteoporosis primaria, hipercalcemia, osteoporosis involutiva, osteoporosis postmenopáusica de tipo I, osteoporosis de tipo II o senil, osteoporosis juvenil, osteoporosis idiopática en adultos jóvenes, osteoporosis secundaria, anomalía endocrina, hipertiroidismo, hipogonadismo, agénesis ovárica, o síndrome de Turner, hiperadrenocorticismos síndrome de Cushing, hiperparatiroidismo, anomalías de la médula ósea, mieloma múltiple. y trastornos relacionados, y mastocitosis sistémica, osteoporosis por carcinoma diseminado, enfermedad de Gaucher, anomalías del tejido conectivo, osteogénesis imperfecta, homocistinuria, síndrome de Ehlers-Danlos, síndrome de Marfan, síndrome de Menke, inmovilización o bajo peso por diferentes causas, atrofia de Sudeck, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, alcoholismo crónico, administración crónica de heparina e ingestión crónica de fármacos anticonvulsivos.

60 Los pacientes aptos para el tratamiento con una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago como se desvela en el presente documento incluyen pacientes con riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas (por ejemplo, pacientes asintomáticos), así como pacientes que muestran síntomas en la actualidad. En el caso de la OA o artrosis, virtualmente cualquier persona,

especialmente las mujeres, están en riesgo de padecer artrosis y osteoporosis si vive lo suficiente.

En algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago es un sujeto con riesgo genético conocido de una enfermedad o trastorno relacionado con el cartílago, por ejemplo, OA. En algunas realizaciones, los pacientes son mujeres, por ejemplo posmenopáusicas, o mujeres que tienen al menos 65 años de edad, o pacientes que han tenido fracturas previas o tienen familiares que han sufrido una enfermedad ósea metabólica, por ejemplo osteoporosis. Se pueden identificar los pacientes que tienen un mayor riesgo de desarrollar una enfermedad ósea metabólica ósea mediante procedimientos comúnmente conocidos del experto en la materia.

En algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago tiene al menos una de las siguientes dolencias; artritis reumatoide (AR), artritis reumatoide juvenil (ARJ), artritis psoriática, síndrome de Reiter (artritis reactiva), enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa y sarcoidosis (Orcel, y col., Bone demineralization and cytokines; *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1992; 59:16S-22S; Brown, y col., The radiology of rheumatoid arthritis. *Am Fam Physician.* 1995. 52:1372-80; De Vos, y col., Bone and joint diseases in inflammatory bowel disease. *Aliment Pharmacol Ther.* 1998;12(5):397-404; Falcini, y col., The primary role of steroids on the osteoporosis in juvenile rheumatoid patients evaluated by dual energy X-ray absorptiometry. *J Endocrinol Invest.* 1996;19(3):165-9; Scutellari, y col., Rheumatoid arthritis: sequences. *Eur J Radiol.* 1998: Supl 1:S31-8).

La artritis reumatoide está asociada con una disminución en la masa ósea (Cortet, y col., Evaluation of bone mineral density in patients with rheumatoid arthritis. Influence of disease activity and glucocorticoid therapy. *Rev Rhum Engl Ed.* julio-septiembre de 1997, 30, 1997; 64(7-9):451-8). Los cambios típicos en una artritis inflamatoria incluyen la osteoporosis yuxtoarticular, pérdida de cartílago, y erosiones corticales o marginales del hueso (Lawson, y col., Lyme arthritis: radiologic findings. *Radiology.* 1985;154(1):37-43; Grassi, y col., The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur J Radiol.* 1998;1:S18-24).

En algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia relacionada con el cartílago que tiene una enfermedad articular inflamatoria crónica, tal como artritis reumatoide, las células sinoviales producen grandes cantidades de citoquinas lo que conduce a un aumento de la resorción ósea local y a destrucciones en el hueso yuxtoarticular (Orcel, P y col., Bone demineralization and cytokines. *Rev Rhum Mal Osteoartic.* 1992; 59(6 Pt 2):16S-22S).

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar una dolencia neurológica (por ejemplo, una enfermedad o trastorno) que comprende administrar a un sujeto una cantidad de un conjugado HB-X, tales como, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante que comprenden HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, donde X es una proteína terapéutica seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neurregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o una porción funcional, análogo o derivado de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neurregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IGF o factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF-1) para su usar en el tratamiento de una dolencia neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, degeneración de nervios periféricos, ictus, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, neuropatía diabética, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewis, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, trastornos priónicos, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, paraparesis espástica hereditaria, atrofia espinocerebelares, ataxia de Friedreich, amiloidosis, o síndrome de Charcot Marie Tooth.

En algunas realizaciones, una dolencia neurológica a tratar se selecciona entre el grupo de enfermedades neurológicas seleccionado entre: enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, degeneración de nervios periféricos, ictus, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, neuropatía diabética, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewis, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, trastornos priónicos, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, paraparesis espástica hereditaria, atrofia espinocerebelares, ataxia de Friedreich, amiloidosis, o síndrome de Charcot Marie Tooth.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, un sujeto que se selecciona para la administración de una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una dolencia o trastorno que tiene al menos una de las siguientes enfermedades y trastornos, incluido, pero sin limitarse a, enfermedad de Alzheimer (EA), enfermedad de Parkinson (EP), enfermedad de Huntington (EH), demencia vascular, envejecimiento y deterioro cognitivo leve. En algunas realizaciones, un sujeto seleccionado para el tratamiento tiene un trastorno neurodegenerativo que se selecciona entre el grupo que consiste en: enfermedad de Alzheimer y enfermedad de Parkinson.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento tiene un trastorno neurológico tal como: hiperosmolaridad; pH ácido; encefalopatía por quemaduras; encefalopatía por plomo; encefalitis autoinmunitaria; esclerosis múltiple; reperfusión posterior a isquemia; hipertensión aguda; irradiación de microondas; encefalopatía hepática; convulsiones; tumores; desarrollo; hipervolemia; hipotermia; posterior a la radiación; dolencias hiperbáricas; meningitis; encefalopatía linfofástica; síndrome de Wernickes-Korsakoff; retraso mental familiar y esclerosis lateral amiotrófica (ELA).

Los sujetos aptos para el tratamiento con una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico como se desvela en el presente documento incluye sujetos en riesgo de enfermedad pero que no muestran síntomas (por ejemplo, sujetos asintomáticos), así como sujetos que muestran síntomas en la actualidad. En el caso de la enfermedad de Alzheimer, virtualmente cualquier persona está en riesgo de padecer enfermedad de Alzheimer si vive lo suficiente. Por tanto, los presentes procedimientos se pueden administrar profilácticamente a la población general sin ninguna evaluación del riesgo del sujeto paciente. Los procedimientos que se desvelan en el presente documento son especialmente útiles para individuos que tienen un riesgo genético conocido para la enfermedad de Alzheimer. Dichos individuos incluyen aquellos que tienen familiares que han experimentado esta enfermedad, y aquellos cuyo riesgo se determina por análisis de marcadores genéticos o bioquímicos, tal como se desvela en el presente documento.

La enfermedad de Alzheimer (EA) es una enfermedad progresiva que da como resultado demencia senil. Véanse, de manera general, Selkoe, TINS 16, 403-409 (1993); Hardy y col., documento WO 92/13069; Selkoe, J. Neuropathol. Exp. Neurol. 53, 438-447 (1994); Duff y col., Nature 373, 476-477 (1995); Games y col., Nature 373, 523 (1995). Hablando de una manera general, la enfermedad se clasificar en dos categorías: inicio tardío, que se produce en personas de edad avanzada (65 años +) e inicio temprano, que se desarrolla mucho antes del periodo senil, es decir, entre 35 y 60 años. En ambos tipos de la enfermedad, la patología es la misma, pero las anomalías tienden a ser más graves y generalizadas en los casos que comienzan a una edad más temprana. La enfermedad se caracteriza a nivel macroscópico por un acortamiento cerebral significativo respecto al hueso craneal que puede observarse en imágenes de IRM como resultado directo de la pérdida neuronal y debido a dos tipos de lesiones macroscópicas en el cerebro, las placas seniles y ovillos neurofibrilares. Las placas seniles son zonas que comprenden procesos neuronales desorganizados de hasta 150 μm de largo y depósitos amiloides extracelulares, que están concentrados, de forma típica, en el centro y son visibles mediante análisis al microscopio de cortes de tejido cerebral. Los ovillos neurofibrilares son depósitos intracelulares de proteína tau que consiste en dos filamentos enredados entre sí en parejas.

Los marcadores de riesgo frente a la enfermedad de Alzheimer incluyen las mutaciones en el gen APP, especialmente mutaciones en la posición 717 y en las posiciones 670 y 671 referidas a las mutaciones de Hardy y Swedish, respectivamente (véase Hardy, TINS, supra). Otros marcadores del riesgo son las mutaciones en el gen de la presenilina, PS1 y PS2, y ApoE4, antecedentes familiares de enfermedad de Alzheimer, hipercolesterolemia o aterosclerosis. Los sujetos que padecen en la actualidad de enfermedad de Alzheimer se pueden reconocer por la demencia característica, así como por la presencia de los factores de riesgo anteriormente descritos. De forma adicional, están disponibles números ensayos diagnósticos para identificar sujetos que tienen la enfermedad de Alzheimer. Estos incluyen mediciones de los niveles de CSF tau y A β 42. Niveles elevados de tau y niveles aumentados de A β 42 denotan la presencia de la enfermedad de Alzheimer. Los individuos que padecen la enfermedad de Alzheimer también pueden diagnosticarse según los criterios MMSE o ADRDA. La muestra de tejido para análisis suele ser sangre, plasma, suero, moco o fluido cerebroespinal del paciente. La muestra se analiza para determinar indicios de una respuesta inmunitaria contra cualquier forma del péptido A β , de forma típica A β 42. La respuesta inmunitaria se puede determinar a partir de la presencia de, por ejemplo, anticuerpos o linfocitos T que se unen específicamente al péptido A β . El experto en la materia conoce los procedimientos ELISA para detectar anticuerpos específicos A β .

En pacientes asintomáticos, el tratamiento puede comenzar a cualquier edad (por ejemplo, 10, 20, 30). Normalmente, sin embargo, no es necesario comenzar el tratamiento hasta que el paciente alcanza la edad de 40, 50, 60 o 70. El tratamiento suele conllevar múltiples dosis durante un periodo de tiempo. El tratamiento se puede controlar determinando en un ensayo la presencia del péptido A β en el SNC. Si el péptido A β sigue presente en el SNC, se recomienda tratamiento adicional con un conjugado HB-X para una enfermedad degenerativa como se desvela en el presente documento, y/o el tratamiento con terapias adicionales para la enfermedad de Alzheimer. En el caso de pacientes con síndrome de Down en potencia, el tratamiento puede comenzar antes del nacimiento mediante la administración de un agente terapéutico a la madre o poco después del nacimiento.

En algunas realizaciones, una composición que comprende un conjugado HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico tal como se desvela en el presente documento es también de utilidad para el

tratamiento de otros trastornos neurodegenerativos o trastornos por deterioro cognitivo de una manera general: por ejemplo, demencia, depresión, confusión, enfermedad de Creutzfeldt-Jakob o de las vacas locas, enfermedad de Huntington, pérdida de coordinación motora, esclerosis múltiple, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Pick y otros trastornos del almacenamiento cerebral (por ejemplo, amiloidosis, gangliosidosis, trastornos del almacenamiento de lípidos, mucopolisacaridosis), síncope, y demencia vascular. Por tanto, el tratamiento se puede dirigir a un sujeto que está afectado por una enfermedad neurodegenerativa pero que no está sintomático; puede mejorar la función cognitiva.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar un trastorno o enfermedad ocular que comprende administrar al sujeto una cantidad de un conjugado HB-X, tales como, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante que comprenden HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, donde X es una proteína terapéutica seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neuregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o una porción funcional, análogo o derivado de los mismos.

Otro aspecto de la presente invención se refiere a una composición que comprende al menos un HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neuregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), quimeras IL-1/IL-1 RA, IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos:

RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNQLVAGYLQGPVNVLEEKIDVVPIEPHALFLGIHGGKM
CLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFARSDSGPTTSFESAACPGWFLCTAMEAD

QPVSLTNMPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), receptor de TNF 2, interleucina-4 e interleucina-10; IL-11; un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluzacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortol, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbo, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónico de triamcinolona para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular o una dolencia ocular mediada por inflamación, tal como úlcera de la córnea o abrasión de la córnea, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratoconjuntivitis seca, inflamación coriorretinal, cicatrices coriorretinales, degeneración coroidal, distrofia coroidal hereditaria, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de la retina, degeneración macular, membrana epirretinal, degeneración periférica de la retina, distrofia retinal hereditaria, retinitis pigmentosa, xeroftalmia, o hemorragia retinal.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular que tiene una o más enfermedades oculares seleccionadas entre las siguientes: úlcera de la córnea / abrasión de la córnea, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratoconjuntivitis seca, inflamación coriorretinal, cicatrices coriorretinales, degeneración coroidal, distrofia coroidal hereditaria, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad (AMD), degeneración de la retina, degeneración macular, membrana epirretinal, degeneración periférica de la retina, distrofia retinal hereditaria, retinitis pigmentosa, xeroftalmia, o hemorragia retinal.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular que tiene una o más enfermedades oculares seleccionadas entre las siguientes, pero sin limitarse a: retinopatía diabética, retinopatía del prematuro (ROP), degeneración macular relacionada con la edad (AMD), oclusión de la vena retinal, retinopatía por radiación. En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno ocular que tiene una "enfermedad ocular mediada por inflamación", que en el presente documento hace referencia a cualquier dolencia del ojo que se podría beneficiar del tratamiento con agente antiinflamatorio, y significa que incluye, aunque no de forma limitativa, uveítis, edema macular,

degeneración macular aguda, desprendimiento de retina, tumores oculares, infecciones fúngicas o víricas, coroiditis multifocal, uveítis diabética, vitrorretinopatía proliferativa (PVR), oftalmia del simpático, síndrome de Vogt Koyanagi-Harada (VKH), histoplasmosis, y difusión uveal.

5 Otro aspecto de la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar la inflamación en un sujeto que comprende administrar al sujeto una cantidad que comprende un conjugado HB-X, tales como, por ejemplo, una proteína de fusión recombinante que comprenden HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, donde X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4, o interleuquina-10.

En algunas realizaciones, una composición que comprende HB-X para el tratamiento de la inflamación comprende una citoquina (por ejemplo, una citoquina antiinflamatoria) o quimioquina como principio activo.

10 Tal como se usa en el presente documento, una "citoquina" es un término genérico para proteínas liberadas desde cualquiera de las células linfáticas que actúan sobre otras células como mediadores intercelulares y alteran la actividad celular y controlan la inflamación. Las citoquinas son, de forma típica, proteínas o péptidos solubles que se producen de forma natural en las células de los mamíferos, y que actúan in vivo como reguladores humorales a concentraciones de micro a picomolares. Las citoquinas pueden, en condiciones tanto normales como patológicas, modular las actividades funcionales de las células y tejidos individuales. Citoquinas antiinflamatorias, tales como IL-4, IL-10, IL-11, W-13, IL-13 y TGFβ, no son mediadores de la inflamación. Ejemplos adicionales de citoquinas incluyen, linfoquinas, monoquinas, y hormonas polipeptídicas tradicionales. Entre las citoquinas están incluidas las hormonas del crecimiento tales como la hormona del crecimiento humana, N-metil hormona del crecimiento humana, y la hormona del crecimiento bovina; hormona paratiroidea; tiroxina; insulina; proinsulina; relaxina; prorelaxina; hormonas de glicoproteína tales como la hormona estimulante del folículo (FSH), hormona estimulante del tiroides (TSH), y hormona luteinizante (LH); factor de crecimiento hepático; factor de crecimiento de fibroblastos; prolactina; lactógeno placentario; factor α y -β de necrosis tumoral; sustancia inhibidora mulleriana (MIS); péptido asociado a gonadotropina de ratón; inhibina; activina; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); integrina; trombopoyetina (TPO); factores de crecimiento nervioso tales como NGF-β; factor de crecimiento plaquetario; factores de crecimiento transformante (TGF) tales como TGF-α y TGF-β; factor de crecimiento de tipo insulina I y II; eritropoyetina (EPO); factores osteoinductores; interferones tales como interferón-α, -β, y -γ; factores estimulantes de colonias (CSF) tales como macrófago-CSF (M-CSF); granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF); y granulocito-CSF (G-CSF); interleuquinas (IL) tales como, por ejemplo y no de forma limitativa, IL-1, IL-1α, IL-1β, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-11, IL-12; un factor de necrosis tumoral tal como TNF-α o TNF-β; y otros factores polipeptídicos incluidos el factor inhibidor de la leucemia (LIF) y ligando del kit (KL).

El término "quimioquina" es un término genérico para cualquiera de las proteínas que actúan sobre los leucocitos para inducir su movimiento y/o para que se activen para llevar a cabo sus funciones del sistema inmunitario. Las quimioquinas son bien conocidas en la materia. Las quimioquinas ilustrativas incluyen, por ejemplo y no de forma limitativa, TECK, ELC, BLC-1, CTACK, RANTES, fractalquina, exotaxina, eotaxina-2, proteína quimioattractora de monocitos 1 (MCP-1), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC, leucotactina, SDF-1β, linfotactina, TARC, ITAC, ENA-70, ENA-78, IP-10, NAP-2, interleuquina-8 (IL-8), HCC-1, MIP-1α, MIP-1β, MIP-1δ, I-309, GRO-α, GRO-β, GRO-γ, MIP-1, I-LINK, y GCP-2.

En algunas realizaciones, una composición para el tratamiento del enanismo de un sujeto con enanismo y/o una dolencia relacionada con el retraso del crecimiento comprende un principio activo que es una proteína IGF-1 o fragmentos funcionales o variantes de la misma (por ejemplo, SEQ ID NO: 6-9 o SEQ ID NO: 63).

En algunas realizaciones, una composición que comprende HB-X para el tratamiento de la inflamación en un sujeto comprende un principio activo que es un agente antiinflamatorio esteroideo. Preferentemente, el agente antiinflamatorio esteroideo se selecciona entre el grupo que consiste de 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinolona, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucloxonida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbo, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetónido de triamcinolona, y hexacetónico de triamcinolona. En una realización preferida, el agente antiinflamatorio esteroideo se selecciona entre el grupo que consiste en cortisona, dexametasona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, y triamcinolona. En una realización más preferida, el agente antiinflamatorio esteroideo es dexametasona. En otra realización, el implante bioerosionable comprende más de un agente antiinflamatorio esteroideo.

En algunas realizaciones, una composición que comprende HB-X para el tratamiento de la inflamación comprende un agente antiinflamatorio. Preferentemente, el agente antiinflamatorio se selecciona entre el grupo que consiste de: un analgésico; un agente antirreumático; un agente gastrointestinal; una preparación contra la gota; glucocorticoides;

una preparación oftálmica; un agente respiratorio; una preparación nasal; y un agente contra la membrana mucosa.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una inflamación o una enfermedad o trastorno relacionado con la inflamación que tiene una o más de las enfermedades relacionadas con la inflamación seleccionada entre las siguientes: artritis, artritis reumatoide, una enfermedad inflamatoria del intestino; psoriasis; esclerosis múltiple; un trastorno neurodegenerativo; insuficiencia cardíaca congestiva; ictus; estenosis de la válvula aórtica; fracaso renal; lupus; pancreatitis; alergia; fibrosis; anemia; aterosclerosis; una enfermedad metabólica; una osteopatía; una enfermedad cardiovascular, una complicación relacionada con quimioterapia/radiación; diabetes tipo I; diabetes tipo II; una enfermedad hepática; un trastorno gastrointestinal; una enfermedad oftalmológica; conjuntivitis alérgica; retinopatía diabética; síndrome de Sjogren; uveítis; un trastorno pulmonar, una enfermedad renal; dermatitis; caquexia relacionada con VIH; malaria cerebral; espondilitis anquilosante; lepra; anemia; y fibromialgia.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una inflamación o una enfermedad relacionada con la inflamación que tiene enfermedad inflamatoria del intestino (IBD), que incluye específicamente la enfermedad de Crohn y colitis ulcerosa. En otras realizaciones, la enfermedad que se va a tratar es artritis, artritis reumatoide, psoriasis, enfermedad de Alzheimer o enfermedad de Parkinson. En otra realización preferida adicional, la enfermedad es una enfermedad relacionada posterior a radioterapia, o aterosclerosis.

En algunas realizaciones, un sujeto se selecciona para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de una inflamación o una enfermedad relacionada con la inflamación que tiene enfermedad inflamatoria del intestino seleccionada entre el grupo que consiste en: enfermedad de Crohn o colitis ulcerosa, una complicación gastrointestinal tal como diarrea; una enfermedad hepática se selecciona entre el grupo que consiste de: una hepatitis autoinmunitaria, hepatitis C, cirrosis biliar primaria, colangitis esclerosante primaria, o fracaso hepático fulminante; un trastorno gastrointestinal seleccionado entre el grupo que consiste en: enfermedad celíaca y colitis no específica; una enfermedad ósea es osteoporosis; el trastorno pulmonar se selecciona entre el grupo que consiste en: rinitis alérgica, asma, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, inflamación granulomatosa crónica, fibrosis quística, y sarcoidosis; una enfermedad cardiovascular seleccionada entre el grupo que consiste en: cardiopatía aterosclerótica, insuficiencia cardíaca congestiva y restenosis; y una enfermedad renal seleccionada entre el grupo que consiste en: glomerulonefritis y vasculitis.

En algunas realizaciones, un sujeto seleccionado para el tratamiento con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de la inflamación tiene una enfermedad autoinmunitaria. En algunas realizaciones, un sujeto a tratar con una composición que comprende HB-X para el tratamiento de la inflamación o de una enfermedad autoinmunitaria tiene una o más de las siguientes dolencias seleccionadas entre las siguientes: artritis reumatoide, esclerosis múltiple (EM), lupus sistémico eritematoso (LSE), miocarditis autoinmunitaria, septicemia, enfermedad de Graves (tiroides con exceso de reactividad), tiroiditis de Hashimoto (tiroides con defecto de reactividad), Diabetes melitus de tipo 1 enfermedad celíaca, enfermedad de Crohns y colitis ulcerosa, síndrome de Guillain-Barre, esclerosis/ cirrosis biliar primaria, sclerosing cholangitis, hepatitis autoinmunitaria, fenómeno de Raynaud, escleroderma, síndrome de Sjogren, síndrome de Goodpasture, granulomatosis de Wegener, polimialgia reumática, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, síndrome de fatiga crónica (SFC), psoriasis, enfermedad de Addison autoinmunitaria, espondilitis anquilosante, encefalomiелitis diseminada aguda, síndrome de anticuerpos antifosfolípidos, anemia aplásica, púrpura idiopática trombocitopénica, miastenia grave, síndrome de opsoclonía-mioclonía, neuritis óptica, tiroiditis de Ord, pénfigo, anemia perniciososa, poliartritis en perros, síndrome de Reiter, arteritis de Takayasu, anemia hemolítica autoinmunitaria por anticuerpos calientes, granulomatosis de Wegener y fibromialgia (FM). La inflamación crónica ha recibido reciente interés por sospecha de causar y/o como factor contribuyente a una variedad de dolencias patológicas. Quizás la más importante entre todas estas dolencias sean las enfermedades cardiovasculares, aunque los cánceres, de manera similar, frecuentemente se consideran como relacionadas en su desarrollo con la inflamación crónica.

Administración de composiciones farmacéuticas

Una cantidad eficaz, por ejemplo, una dosis terapéuticamente eficaz de un conjugado HB-X que comprende una proteína o péptido terapéuticos se puede administrar al paciente en una sola dosis o en múltiples dosis. Cuando se administran múltiples dosis, las dosis pueden estar separadas entre sí, por ejemplo, una hora, tres horas, seis horas, ocho horas, un día, dos días, una semana, dos semanas, o un mes. Por ejemplo, una composición que comprende HB-X se puede administrar durante, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 10, 15, 20, o más semanas. Debe entenderse que, para cualquier sujeto concreto, los regímenes de dosificación específicos deben ser ajustados en el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones. Por ejemplo, la dosis del compuesto terapéutico se puede aumentar si la dosis más baja no proporciona suficiente actividad terapéutica.

Aunque el médico a cargo del paciente será quién finalmente decida la cantidad adecuada y el régimen de dosificación, se pueden proporcionar cantidades eficaces de un HB-X a una dosis de 0,0001, 0,01, 0,01, 0,1, 1,5, 10, 25, 50, 100, 500, o 1,000 mg/kg. Las dosis eficaces se pueden extrapolar a partir de las curvas de respuesta a la dosis derivadas de bioensayos o sistemas de ensayo in vitro o en modelos animales.

El experto en la técnica puede determinar las dosificaciones para un paciente o sujeto concreto usando consideraciones convencionales, (por ejemplo mediante un protocolo farmacológico convencional adecuado). Un médico puede, por ejemplo, prescribir al principio una dosis relativamente baja, aumentando posteriormente la dosis hasta que se obtiene una respuesta apropiada. La dosis administrada a un paciente debería ser suficiente para conseguir una respuesta terapéutica beneficiosa en el paciente con el tiempo, por ejemplo, para reducir los síntomas, u otra actividad adecuada, dependiendo de la aplicación. La dosis se determina mediante la eficacia de la formulación concreta, y la actividad, estabilidad o semivida en suero del principio activo X, por ejemplo, el péptido o proteína terapéuticos como se desvela en el presente documento, y el estado del paciente, la enfermedad a tratar, así como el peso corporal o el área superficial del paciente que se va a tratar. El tamaño de la dosis también se determina por la existencia, naturaleza, y extensión de cualesquiera efectos secundarios adversos que acompañan la administración de un vector, formulación, o similar, en un paciente concreto. Las composiciones terapéuticas que comprenden HB-X en las mismas se someten a ensayo en uno o más modelos animales de la enfermedad *in vitro* y/o *in vivo*, tal como el ensayo con cartílago que se desvela en el presente documento, o en otros modelos habitualmente conocidos para experto en la materia, para confirmar la eficacia, metabolismo tisular, y retención en el tejido con el tiempo, y para estimar las dosificaciones, de acuerdo con procedimientos bien conocidos en la materia. En particular, las dosificaciones se pueden determinar inicialmente según la actividad, estabilidad u otras medidas adecuadas del tratamiento comparado con la ausencia de tratamiento (por ejemplo, la comparación entre células o modelos animales tratados o sin tratar), en un ensayo relevante. Las formulaciones se administran a una tasa determinada por la DL50 de la formulación relevante, y/o la observación de cualesquiera efectos secundarios de HB-X a diversas concentraciones, por ejemplo, tal como se aplica a la masa y estado de salud general del paciente. La administración se puede llevar a cabo en una sola dosis o en dosis divididas.

Para determinar la cantidad eficaz de HB-X a administrar en el tratamiento o profilaxia de una enfermedad, el médico evalúa los niveles de circulación en plasma, toxicidades de la formulación, y la evolución de la enfermedad. El nivel de dosificación seleccionado también dependerá de una variedad de factores, incluida la actividad del compuesto concreto de la presente invención utilizado, o el éster, sal o amida del mismo, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular empleado, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con el compuesto concreto utilizado, la edad, sexo, peso, afección, estado de salud general y antecedentes médicos del paciente que se va a tratar, y factores similares bien conocidos en las prácticas médicas.

En algunas realizaciones, HB-X tal como se desvela en el presente documento se puede administrar a una dosis de conformidad con las buenas prácticas médicas, teniendo en cuenta el estado clínico del paciente individual, el sitio y el procedimiento de administración, calendario de administración, edad del paciente, sexo, peso corporal y otros factores conocidos para los profesionales sanitarios.

Los regímenes de dosificación de una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se pueden ajustar para proporcionar la respuesta deseada óptima (por ejemplo una respuesta terapéutica o profiláctica). Por ejemplo, se puede administrar un bolo único, se pueden administrar varias dosis divididas con el tiempo o la dosis se puede reducir o aumentar proporcionalmente según indiquen las exigencias de la situación terapéutica. Es especialmente ventajoso formular las composiciones parenterales en una forma farmacéutica unitaria para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación.

Por otro lado, los niveles de dosificación reales de HB-X en una composición farmacéutica se pueden variar para obtener una cantidad del principio activo que sea eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada en un sujeto concreto, composición, y modo de administración, sin que sea tóxica para el sujeto. Una composición farmacéutica que comprende HB-X como se desvela en el presente documento puede ser una "cantidad terapéuticamente eficaz" y/o una "cantidad profilácticamente eficaz". En general, una dosis diaria adecuada de una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento será aquella cantidad del principio activo X que es la dosis efectiva más baja que produce un efecto terapéutico, tal como una reducción de un síntoma de una enfermedad para la que se administra el HB-X. Dicha dosis eficaz generalmente dependerá de los factores anteriormente descritos.

Si se desea, la dosis diaria eficaz de una composición que comprende HB-X se puede administrar como dos, tres, cuatro, cinco, seis o más subdosis administradas por separado en intervalos de tiempo adecuados durante el día, opcionalmente, en formas farmacéuticas unitarias.

Se debe indicar que los valores de dosificación pueden variar en función del tipo y de la gravedad de la enfermedad que se va a aliviar. Debe entenderse además que para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos se deberían ajustar con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual y el criterio profesional de la persona que administra o supervisa la administración de las composiciones, y que los intervalos de dosificación que se definen en el presente documento son solo ilustrativos y no tienen por objeto limitar el ámbito o la práctica de la composición reivindicada.

La eficacia terapéutica y la toxicidad del compuesto se pueden determinar mediante procedimientos farmacéuticos convencionales en cultivos celulares o animales experimentales, por ejemplo, DE50 (la dosis es eficaz en el 50% de la población) y la DL50 (la dosis es letal para el 50% de la población). La relación de dosis entre los efectos tóxicos y

los terapéuticos es el índice terapéutico, y puede expresarse como el cociente DL50/DE50. Se prefieren las composiciones farmacéuticas que muestran índices terapéuticos grandes.

Por ejemplo, se puede estimar la cantidad terapéuticamente eficaz inicialmente tanto en ensayos de cultivo celular como en modelos animales, habitualmente ratones, conejos, perros, o cerdos. El modelo animal también se usa para conseguir un intervalo de concentraciones y una vía de administración deseables. Dicha información puede usarse seguidamente para determinar dosis útiles y rutas para la administración en otros sujetos. De manera general, la cantidad terapéuticamente eficaz es dependiente del efecto terapéutico deseado. Por ejemplo, la cantidad terapéuticamente eficaz de HB-X para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con el cartílago se puede evaluar según el efecto del HB-X, por ejemplo, HB-IGF-1 *in vivo* en un modelo de rata tras la transección del menisco medial (por ejemplo, cirugía de desgarro de menisco medial (TMM)) que se desvela en el presente documento en los Ejemplos, que es un modelo en rata de OA inducida quirúrgicamente. Tras la inyección del conjugado HB-X (por ejemplo HB-IGF-1) se lleva a cabo una evaluación histológica de la artrosis de rodilla (OA) y se determina la puntuación global OARSÍ para las articulaciones de los animales tratados con el conjugado HB-X (por ejemplo, HB-IGF-1) en comparación con los animales de control tratados, como se describe en el presente documento en los Ejemplos.

Un médico o un veterinario con una experiencia normal en la materia puede determinar fácilmente y prescribir la cantidad eficaz de la composición farmacéutica necesaria. Por ejemplo, el médico o veterinario podría iniciar las dosis de los compuestos de la invención empleados en las composiciones farmacéuticas a niveles inferiores a los requeridos para conseguir el efecto terapéutico deseado, e incrementar la dosificación gradualmente hasta lograr el efecto deseado. También se indica que, por lo general, los seres humanos se tratan durante más tiempo que los animales u otros animales experimentales ilustrados en el presente documento, donde el tratamiento tiene una duración proporcional a la del proceso patológico y la eficacia del fármaco. Las dosis pueden ser dosis únicas o múltiples dosis durante un período de varios días, pero se prefieren las dosis únicas.

En algunas realizaciones, el conjugado HB-X se puede administrar a los seres humanos y otros animales para su tratamiento mediante cualquier vía de administración adecuada, incluyendo la vía oral, por vía nasal, tal como, por ejemplo, una pulverización, por vía rectal, por vía intravaginal, mediante inyección intraarticular, por vía parenteral, intracisternal y tópica, tal como en polvos, pomadas o gotas, incluida la vía bucal y sublingual.

Un conjugado HB-X se puede administrar mediante cualquier vía conocida en la materia o descrita en el presente documento, por ejemplo, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa o intramuscular), intraperitoneal, rectal, cutánea, nasal, vaginal, inhalante, piel (parche), u ocular. El conjugado HB-X se puede administrar en cualquier dosis o régimen de dosificación.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X se puede administrar a un sujeto como parte de un implante biológico o trasplante. En algunas realizaciones, un implante biológico o trasplante se incuba con un conjugado HB-X como se desvela en el presente documento durante un periodo de tiempo antes de implantar el implante o trasplantarlo al sujeto. Cualquier implante biológico conocido del experto en la materia está abarcado para su uso en el presente documento, por ejemplo, pero sin limitaciones, aloinjertos osteocondriales o del menisco. En algunas realizaciones, un andamiaje biológico se incuba con un conjugado HB-X como se desvela en el presente documento durante un periodo de tiempo antes de implantar el andamiaje en el sujeto. En algunas realizaciones, el andamiaje es un andamiaje biocompatible y/o biodegradable.

En algunas realizaciones, un conjugado HB-X se administra al sujeto en una composición de hidrogel. Se puede usar cualquier composición de hidrogel biológicamente compatible, por ejemplo, pero sin limitaciones, un hidrogel que comprende péptidos autoensamblados. En algunas realizaciones, un hidrogel que comprende péptidos autoensamblados es RADA-16 (también conocido como PURAMATRIX®) y KLD-12. Los hidrogeles con péptidos autoensamblados son conocidos de la persona normalmente experta en la materia, tales como los descritos en la publicación de Patente de Estados Unidos números: 2013/0129712, 2013/0079421 y solicitud de patente EP: EP 1802743 y Kisiday y col., PNAS, 2002; 99(5); 9996-10001,

En algunas realizaciones, un hidrogel puede comprender péptidos con la secuencia RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77) y/o la secuencia KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78). En algunas realizaciones, el hidrogel comprende AcN-KLDLKLKLDL-CNH2 (SEQ ID NO: 79). Por consiguiente, en algunos aspectos, la presente invención se refiere a una composición que comprende un conjugado HB-X previsto para su administración a un sujeto que lo necesita, en la que el conjugado HB-X está presente en un hidrogel que comprende los péptidos seleccionados entre el grupo de: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcN-KLDLKLKLDL-CNH2 (SEQ ID NO: 79). En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar dolencias clínicas relacionadas con el menisco o relacionadas con el cartílago que comprende administrar una composición que comprende un HB-X y un hidrogel, por ejemplo, un hidrogel que comprende péptidos seleccionados entre el grupo de: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcN-KLDLKLKLDL-CNH2 (SEQ ID NO: 79). En algunas realizaciones, la presente invención se refiere a un procedimiento para tratar una enfermedad o trastorno neuronal que comprende administrar una composición que comprende un HB-X y un hidrogel, por ejemplo, un hidrogel que comprende péptidos seleccionados entre el grupo de: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcN-KLDLKLKLDL-CNH2

(SEQ ID NO: 79).

5 Cuando los agentes o compuestos se administran a un sujeto, se pueden administrar por cualquier vía adecuada, incluido, por ejemplo, por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos) o mediante administración parenteral. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, la administración intramuscular, intravenosa, intraarticular, intraarterial, intratecal, subcutánea o intraperitoneal. El agente también se puede administrar por vía oral, transdérmica, tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales) o por vía rectal. La administración puede ser local o sistémica, según se indica. Los agentes también se administran usando vectores víricos, que son bien conocidos por el experto en la técnica. Las formulaciones farmacéuticamente aceptables se pueden suspender en vehículos acuosos e introducirse mediante agujas hipodérmicas convencionales o usando bombas de infusión.

10 La administración tanto local como sistémica se contempla en la invención. Los rasgos característicos de la administración local incluyen conseguir concentraciones locales eficaces del principio activo, así como evitar los efectos secundarios derivados de la administración sistémica del principio activo. Las técnicas de administración localizada se describen en, por ejemplo, 51 J. Biomed. Mat. Res. 96 (2000); 100 J. Control Release 211 (2004); 103 J. Control Release 541 (2005); 15 Vet. Clin. North Am. Equine Pract. 603 (1999); 1 Semin. Interv. Cardiol. 17 (1996).

15 La cantidad de agente administrado al individuo dependerá de las características del individuo, tales como estado de salud general, edad, sexo, peso corporal y tolerancia a fármacos, así como el grado, severidad y tipo de enfermedad, según lo indicado. El experto en la materia podrá determinar las dosificaciones adecuadas dependiendo de estos y otros factores.

20 Por consiguiente, con respecto a los procedimientos terapéuticos de la invención, no se pretende que la administración de un conjugado HB-X, por ejemplo, proteína de fusión HB-X que comprende una proteína o péptido terapéuticos esté limitada a un modo de administración concreto, dosificación o frecuencia de dosificación; la presente invención contempla todos los modos de administración, incluida la intramuscular, intravenosa, intraperitoneal, intravesicular, intraarticular, intralesional, subcutánea, o cualquier otra vía suficiente para proporcionar un dosis adecuada para tratar una enfermedad o trastorno tal como se desvela en el presente documento.

25 Tras la formulación con un transportador farmacéuticamente aceptable adecuado en una dosificación deseada, una composición farmacéutica que comprende un HB-X como se desvela en el presente documento se puede administrar a un sujeto. Una composición farmacéutica que comprende HB-X se puede administrar a un sujeto usando cualquier medio adecuado. En general, los medios de administración adecuados incluyen, aunque no de forma limitativa, las rutas tópica, oral, parenteral (por ejemplo, intravenosa, subcutánea o intramuscular), rectal, intracisternal, intravaginal, intraperitoneal, ocular, o nasal.

30 En una realización específica, puede ser deseable administrar la composición farmacéutica que comprende HB-X de forma local a la zona que necesita tratamiento; esto se puede conseguir, a modo de ejemplo pero no como limitación, mediante infusión local durante la cirugía, aplicación tópica, por ejemplo, mediante inyección, mediante un catéter, o mediante un implante, siendo el implante un material poroso, no poroso, o gelatinoso, incluyendo membranas, como membranas sialásticas, fibras o sustitutos comerciales de la piel. En algunas realizaciones, HB-X tal como se desvela en el presente documento se aplica al músculo usando cremas tópicas, parches, inyecciones intramusculares, y similares.

35 En algunas realizaciones, HB-X se puede administrar a un sujeto por vía oral (por ejemplo, en cápsulas, suspensiones o comprimidos) o mediante administración parenteral. Los procedimientos convencionales para administración oral incluyen la administración de HB-X en forma de comprimidos, suspensiones, soluciones, emulsiones, cápsulas, polvos, jarabes y similares que son de utilidad. Las técnicas conocidas que suministran HB-X por vía oral o intravenosa y retienen la actividad biológica son las preferidas. La administración parenteral puede incluir, por ejemplo, la administración intramuscular, intravenosa, intraarticular, intraarterial, intratecal, subcutánea, o intraperitoneal. HB-X también se puede administrar por vía oral, transdérmica, tópica, mediante inhalación (por ejemplo, intrabronquial, intranasal, inhalación oral o gotas intranasales) o por vía rectal. La administración puede ser local o sistémica, según se indica. Los agentes, por ejemplo, agentes de ácido nucleico que codifican HB-X también se pueden administrar usando un vector, por ejemplo, un vector vírico por procedimientos que son bien conocidos por el experto en la técnica.

40 Cuando se administra una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento por vía parenteral, generalmente se formulará en una forma farmacéutica unitaria inyectable (por ejemplo, solución, suspensión, emulsión). Las formulaciones farmacéuticas adecuadas para inyección incluyen soluciones o dispersiones acuosas estériles, así como polvos estériles para reconstitución en soluciones inyectables estériles. El transportador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol, polietilenglicol líquido), mezclas adecuadas de los mismos, y aceites vegetales.

45 La expresión "forma farmacéutica unitaria" que se usa en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para los sujetos mamíferos que se van a tratar; conteniendo cada

unidad una cantidad predeterminada de un principio activo calculada para producir el efecto terapéutico deseado junto con el transportador farmacéuticamente aceptable. La especificación de las formas farmacéuticas unitarias de la invención vienen dictaminadas y son directamente dependientes de (a) las características únicas del HB-X que se desvela en el presente documento y el efecto terapéutico o profiláctico concreto a conseguir, y (b) las limitaciones inherentes en la técnica para componer un HB-X como principio activo para el tratamiento de la sensibilidad en individuos.

Las composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden HB-X tal como se desvela en el presente documento se pueden suspender en vehículos acuosos e introducirse mediante agujas hipodérmicas convencionales o usando bombas de infusión.

Los procedimientos descritos en el presente documento se pueden usar para administrar HB-X a células, por ejemplo, células humanas, *in vitro* o *ex vivo*. Como alternativa, el procedimiento para administrar HB-X se puede llevar a cabo en células presentes en un sujeto como parte de un protocolo *in vivo* (por ejemplo, terapéutico o profiláctico). Por ejemplo, el procedimiento se puede usar para tratar o prevenir una indicación mediada por IGF-1 en un sujeto, tal como una terapia para la regeneración del cartílago después de una lesión. Por consiguiente, la invención proporciona un procedimiento para tratar (por ejemplo, curar, suprimir, mejorar, retrasar o prevenir el inicio de, o prevenir la recurrencia o la recaída de) o prevenir la pérdida permanente del cartílago. El procedimiento incluye administrar a un sujeto una composición de HB-X en una cantidad suficiente para inhibir o reducir la pérdida de cartílago o aumentar la regeneración del cartílago, tratando o previniendo de esta forma la degeneración articular en un sujeto.

Composiciones farmacéuticas

Las composiciones de la presente invención pueden estar contenidas en formulaciones farmacéuticamente aceptables. Dicha formulación farmacéuticamente aceptable puede incluir uno o varios transportadores o uno o varios excipientes farmacéuticamente aceptables, disolventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardantes de la absorción y similares, que sean fisiológicamente compatibles. Por ejemplo, el transportador puede ser adecuado para una inyección intraarticular. Los excipientes incluyen estabilizadores farmacéuticamente aceptables. La presente invención se refiere a cualesquiera formulaciones farmacéuticamente aceptables, que incluyen polímeros naturales o sintéticos en la forma de complejos macromoleculares, nanocápsulas, microesferas, o perlas, y formulaciones basadas en líquidos incluidas emulsiones de aceite en agua, micelas, micelas mixtas, vesículas de membrana sintética y geles tales como geles hialurónicos.

En algunas realizaciones, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se puede formular en cualquier medio adecuado, por ejemplo, en forma de una solución inyectable estéril, por ejemplo, que se puede preparar incorporando el HB-X en la cantidad necesaria al disolvente adecuado con diversos otros ingredientes, según se desee. En algunas realizaciones, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se puede formular en un hidrogel, por ejemplo, aunque no de forma limitativa, un hidrogel que comprende péptidos autoensamblados es RADA-16 (también conocido como PURAMATRIX®) y KLD-12.

Una formulación farmacológica de una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se puede administrar al paciente en una formulación inyectable que contiene cualquier transportador compatible, tales como diferentes vehículos, adyuvantes, aditivos y diluyentes; o los compuestos utilizados en la presente invención se pueden administrar por vía parenteral al paciente en la forma de implantes subcutáneos de liberación lenta o mediante sistemas de administración dirigida tales como anticuerpos monoclonales, administración vectorizada, iontoforética, matrices poliméricas, liposomas, y microesferas. Los ejemplos de sistemas de administración útiles en la presente invención incluyen los presentados en las patentes de Estados Unidos con números 5,225,182; 5.169.383; 5.167.616; 4.959.217; 4.925.678; 4.487.603; 4.486.194; 4.447.233; 4.447,224; 4.439.196 y 4.475.196. Otros de estos implantes, sistemas de administración, y módulos, son bien conocidos de los expertos en la materia.

La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, usando un recubrimiento como lecitina, manteniendo el tamaño de partícula necesario en el caso de las dispersiones y mediante el uso de tensioactivos. Los vehículos no acuosos, tales como aceite de semillas de algodón, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de soja, aceite de maíz, aceite de girasol, o aceite de cacahuete, y los ésteres, tal como el miristato de isopropilo, también se pueden usar como los sistemas disolventes para las composiciones de compuesto. Adicionalmente, varios aditivos que potencian la estabilidad, esterilidad e isotonicidad de las composiciones, incluidos los conservantes antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, y tampones, pueden añadirse. La prevención de la acción de los microorganismos se puede garantizar mediante varios agentes antibióticos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutano, fenol y ácido sórbico. En muchos casos, también será deseable incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, cloruro de sodio, y similares. La absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir mediante el uso de agentes que retrasan la absorción, por ejemplo, monostearato de aluminio y gelatina. De acuerdo con la presente invención, sin embargo, cualquier vehículo, diluyente o aditivo utilizado debería tener que ser compatible con los compuestos.

En otra realización, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento puede comprender formulaciones basadas en lípidos. Cualquiera de los sistemas de administración de fármacos basados en lípidos conocidos se pueden usar en la práctica de la invención. Por ejemplo, los liposomas multivesiculares, liposomas multilamelares y liposomas unilamelares se pueden usar, todos ellos, siempre que se pueda establecer una velocidad de liberación continua del principio activo encapsulado. Los procedimientos para fabricar sistemas de administración de fármacos en liposomas multivesiculares de liberación controlada se describen en las publicaciones de solicitud PTC números WO 9703652, WO 9513796, y WO 9423697.

La composición de la vesícula de la membrana sintética suele ser una combinación de fosfolípidos, normalmente en combinación con esteroides, especialmente colesterol. También se pueden usar otros fosfolípidos u otros lípidos. Los ejemplos de lípidos de utilidad en la producción de vesícula de membrana sintética incluyen fosfatidilglicerol, fosfatidilcolinas, fosfatidilserinas, fosfatidiletanolaminas, esfingolípidos, cerebrósidos, y gangliósidos, donde las realizaciones preferidas incluyen fosfatidilcolina de huevo, dipalmitoilfosfatidilcolina, distearoilfosfatidilcolina, dioleoilfosfatidilcolina, dipalmitoilfosfatidilglicerol, y dioleoilfosfatidilglicerol.

En la preparación de las vesículas de base lipídica que contienen HB-X, variables tales como la eficacia de la encapsulación del principio activo, la labilidad del principio activo, la homogeneidad y el tamaño de la población de vesículas resultantes, relación entre principio activo y lípido, permeabilidad, inestabilidad de la preparación, y la aceptabilidad farmacéutica de la formulación se deberán tener en cuenta.

En otra realización, el HB-X se puede administrar en una vesícula, en particular, un liposoma (véase, Langer (1990) Science 249:1527-1533). En otra realización adicional, HB-X se puede administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer(1990) anteriormente citado). En otra realización, se pueden usar materiales poliméricos (véase Howard y col. (1989) J. Neurosurg. 71:105). En otra realización donde el principio activo de la invención es un ácido nucleico que codifica HB-X, el ácido nucleico se puede administrar *in vivo* para promover la expresión de su proteína codificada, construyéndola como parte de un vector de expresión de ácido nucleico adecuado y administrándolo de manera que queda intracelular, por ejemplo, mediante el uso de un vector retroviral (véase por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 4.980.286), o mediante la inyección directa, o mediante el uso de un bombardeo con micropartículas (por ejemplo, una pistola génica; Biolistic, Dupont), o revestimiento con lípidos o receptores de la superficie celular o agentes de transfección, o mediante la administración en un enlace con un péptido tipo homeobox del que se sabe que penetra en el núcleo (véase, por ejemplo, Joliot y col., 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:1864-1868), etc. Como alternativa, un ácido nucleico se puede introducir intracelularmente e incorporarse al ADN de la célula hospedadora para su expresión, mediante recombinación homóloga.

Antes de la introducción, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se puede esterilizar, por cualquiera de las numerosas técnicas disponibles en la materia, tal como con radiación gamma o esterilización mediante haz de electrones.

En otra realización de la invención, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento, se puede administrar y/o formular junto con (por ejemplo, en combinación) con cualquier otro agente terapéutico. Para los fines de administración, HB-X tal como se desvela en el presente documento se formula preferentemente en forma de una composición farmacéutica. Las composiciones farmacéuticas de la presente invención comprenden un compuesto de la presente invención y un transportador farmacéuticamente aceptable, en las que el compuesto está presente en la composición en una cantidad que es eficaz para tratar la dolencia de interés. El experto en la técnica puede determinar fácilmente las concentraciones y dosificaciones adecuadas.

Los expertos en la materia están familiarizados con los transportadores farmacéuticamente aceptables. Para las composiciones formuladas en forma de soluciones líquidas, los transportadores aceptables incluyen suero salino y agua estéril, y puede incluir opcionalmente antioxidantes, tampones, bacterioestatos y otros aditivos comunes. Las composiciones se pueden formular también en forma de pastillas, cápsulas, gránulos, o comprimidos que contienen, además de un compuesto de la presente invención, diluyentes, dispersantes y agentes tensioactivos, aglutinantes y lubricantes. Un experto en la materia puede formular adicionalmente los compuestos de la presente invención de una manera adecuada y de acuerdo con las prácticas aceptadas, tales como las desveladas en Remington's Pharmaceutical Sciences, Gennaro, Ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa. 1990.

Las composiciones de la presente invención pueden estar en cualquier forma. Estas formas incluyen, aunque no de forma limitativa, soluciones, suspensiones, dispersiones, pomadas (incluidas las pomadas orales), cremas, pastas, geles, polvos (incluidos polvos dentales), pastas de dientes, pastillas para chupar, salvia, chicle, pulverizador bucal, pastillas, sobrecillos, colutorios, aerosoles, comprimidos, cápsulas, parches transdérmicos, que comprenden una o más resolvinas y/o protectinas o sus análogos de la invención.

Las formulaciones de una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento se pueden preparar mediante numerosos medios conocidos de los expertos en la materia. En algunas realizaciones, las formulaciones se pueden preparar para su administración como formulación en aerosol, por ejemplo, combinando (i) HB-X tal como se desvela en el presente documento en una cantidad suficiente para proporcionar una pluralidad de dosis terapéuticamente eficaces; (ii) la adición de agua en una cantidad eficaz para estabilizar cada una de las

5 formulaciones; (iii) el propulsor en una cantidad suficiente para impulsar una pluralidad de dosis desde un bote de aerosol; y (iv) cualesquiera componentes opcionales, por ejemplo etanol como codisolvente; y dispersión de los componentes. Los componentes se pueden dispersar usando un mezclador u homogeneizador convencional, mediante agitación o mediante energía de ultrasonidos. Las formulaciones a granel se pueden transferir a viales de aerosol individuales más pequeños usando procedimientos de transferencia con válvulas, llenado a presión, o mediante el uso de procedimientos convencionales de llenado en frío. No es necesario que el estabilizante utilizado en una suspensión formulada para aerosol sea soluble en el propulsor. Los que no sean suficientemente solubles se puede revestir sobre las partículas de fármaco en una cantidad adecuada, y a continuación, las partículas revestidas se pueden incorporar a una formulación como se ha descrito anteriormente.

10 En determinadas realizaciones, una composición que comprende HB-X, que es un agente de ácido nucleico o agente polipeptídico se puede administrar a un sujeto en forma de una composición farmacéutica con un transportador farmacéuticamente aceptable. En determinadas realizaciones, estas composiciones farmacéuticas comprenden opcionalmente además uno o más agentes terapéuticos adicionales. En determinadas realizaciones, el agente o agentes terapéuticos adicionales son enfermedades o fármacos autoinmunitarios, tales como
15 inmunosupresores y similares. Por supuesto, dichos agentes terapéuticos son aquellos conocidos por los expertos en la materia como fácilmente sustituibles, y esta lista no debería considerarse exhaustiva o limitante.

20 Agentes humectantes, emulsionantes y lubricantes, tales como lauril sulfato de sodio y estearato de magnesio, así como agentes colorantes, agentes de liberación, agentes de revestimiento, edulcorantes, agentes aromatizantes y perfumantes, conservantes y antioxidantes pueden estar también presentes en las composiciones. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfato sódico, sulfito sódico, y similares; antioxidantes solubles en aceite, tales como palmitato de ascorbilo, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, galato de propilo, alfa-tocoferol, y similares; y agentes quelantes de metales, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamina tetracético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico, y similares.

25 Las formulaciones de la presente invención incluyen los adecuados para la administración intravenosa, oral, nasal, tópica, transdérmica, bucal, sublingual, rectal, vaginal y/o parenteral. Las formulaciones se pueden presentar de forma cómoda en forma farmacéutica unitaria y se pueden preparar por cualquiera de los procedimientos bien conocidos en la farmacopea. La cantidad de principio activo que se puede combinar con un material vehículo para combinarse con un material transportador para producir una forma farmacéutica unitaria variará generalmente con la
30 cantidad del compuesto que produce un efecto terapéutico. De manera general, del cien por ciento, esta cantidad estará comprendida entre aproximadamente 1 por ciento a aproximadamente noventa y nueve por ciento de principio activo, preferentemente de aproximadamente 5 por ciento a aproximadamente 70 por ciento, más preferentemente de aproximadamente 10 por ciento a aproximadamente 30 por ciento.

35 Las formulaciones de la invención adecuadas para administración oral pueden estar en la forma de cápsulas, sellos, píldoras, comprimidos, pastillas para chupar (usando una base aromatizada, normalmente sacarosa y goma arábiga o tragacanto), polvos, gránulos, o en forma de una solución o suspensión en un líquido acuoso o no acuoso, o en forma de una emulsión de aceite en agua o de agua en aceite, o en forma de un elixir o jarabe, o en forma de pastillas (usando una base inerte, tal como gelatina y glicerina, o sacarosa y goma arábiga) y/o como colutorios y similares, conteniendo cada una de ellos una cantidad predeterminada de un compuesto de la presente invención
40 como principio activo. Un compuesto de la presente invención también se pueden administrar en forma de bolo, electuario o pasta.

45 En las formas farmacéuticas sólidas de la invención para administración oral (cápsulas, comprimidos, píldoras, grageas, polvos, gránulos y similares), el principio activo se mezcla con uno o más transportadores farmacéuticamente aceptables, tales como citrato sódico o fosfato dicálcico, y/o cualquiera de los siguientes: cargas o expansores, tales como almidones, lactosa, sacarosa, glucosa, manitol, y/o ácido silícico; aglutinantes, tales como, por ejemplo, carboximetilcelulosa, alginatos, gelatina, polivinilpirrolidona, sacarosa y/o goma arábiga; humectantes, tales como glicerol; agentes disgregantes, tales como agar-agar, carbonato cálcico, almidón de patata o tapioca, ácido algínico, algunos silicatos y carbonato de sodio; agentes retardantes de la solución, tales como parafina; aceleradores de la absorción, tales como compuestos de amonio cuaternario; agentes humectantes, tales como, por
50 ejemplo, alcohol cetílico y monoestearato de glicerol; absorbentes, tales como caolín y arcilla de bentonita; lubricantes, tales como talco, estearato de calcio, estearato de magnesio, polietilenglicoles sólidos, lauril sulfato de sodio y sus mezclas; y agentes colorantes. En el caso de cápsulas, comprimidos y píldoras, las composiciones farmacéuticas pueden comprender también agentes tamponantes. Se pueden emplear también composiciones sólidas de un tipo similar como rellenos en cápsulas de gelatina blandas y duras usando excipientes tales como
55 lactosa o azúcares de la leche, así como polietilenglicoles de alto peso molecular y similares.

60 Un comprimido puede prepararse por compresión o moldeado, de manera opcional con uno o más ingredientes auxiliares. Los comprimidos preparados por compresión se pueden preparar usando aglutinante (por ejemplo, gelatina o hidroxipropilmetil celulosa), lubricante, diluyente inerte, conservante, disgregante (por ejemplo, glicolato de almidón sódico o carboximetil celulosa sódica reticulada), tensioactivo o dispersante. Los comprimidos moldeables pueden hacerse moldeando en una máquina adecuada una mezcla del compuesto en polvo humedecido con un diluyente líquido inerte.

Los comprimidos, y otras formas farmacéuticas sólidas de las composiciones farmacéuticas de la presente invención, tales como grageas, cápsulas, píldoras y gránulos, pueden estar opcionalmente marcadas, o preparadas con revestimientos y cubiertas, tales como revestimientos entéricos y otros revestimientos bien conocidos en la técnica de formulación de sustancias farmacéuticas. También se pueden formular para que proporcionen una liberación lenta o controlada del principio activo desde la misma utilizando, por ejemplo, hidroxipropilmetilcelulosa en proporciones variables para proporcionar el perfil de liberación deseado, otras matrices poliméricas, liposomas y/o microesferas. Se pueden esterilizar, por ejemplo, por filtración a través de un filtro de retención de bacterias, o por incorporación de agentes esterilizantes en forma de composiciones sólidas estériles que pueden disolverse en agua estéril, o algún otro medio inyectable estéril antes del uso. Estas composiciones también puede contener opcionalmente agentes opacificantes y puede ser una composición desde la que liberan solamente, el uno o más principios activos, o preferentemente, en una parte determinada del tracto intestinal, opcionalmente, de manera retardada. Los ejemplos de composiciones incluidas que pueden utilizarse incluyen sustancias poliméricas y ceras. El principio activo también puede estar en forma microencapsulada, si es adecuado, con uno o más de los excipientes descritos anteriormente.

Las formas farmacéuticas líquidas para la administración oral de los compuestos de la invención incluyen emulsiones, microemulsiones, soluciones, suspensiones, jarabes y elixires farmacéuticamente aceptables.

Además del principio activo, las formas farmacéuticas líquidas pueden contener diluyentes inertes comúnmente utilizados en la técnica, tales como, por ejemplo, agua y otros disolventes, agentes solubilizantes y emulsionantes, tales como alcohol etílico, alcohol isopropílico, carbonato de etilo, acetato de etilo, alcohol bencílico, benzoato de bencilo, propilenglicol, 1,3-butilenglicol, aceites (en particular, de semillas de algodón, cacahuete, maíz, germen, oliva, de ricino y de sésamo), glicerol, alcohol tetrahidrofurfílico, polietilenglicoles y ésteres de ácido graso de sorbitán, y sus mezclas. Además de diluyentes inertes, las composiciones orales pueden también incluir adyuvantes, tales como agentes humectantes, agentes emulsionantes y suspensores, edulcorantes, aromatizantes, colorantes, agentes perfumantes y agentes conservantes.

Las suspensiones, además de los compuestos activos, pueden contener agentes suspensores tales como, por ejemplo, alcoholes de isoestearilo etoxilados, ésteres de sorbitol y sorbitán polioxietilenados, celulosa microcristalina, metahidróxido de aluminio, bentonita, agar-agar y tragacanto, y mezclas de los mismos.

En algunos casos, una composición que comprende HB-X como se desvela en el presente documento puede estar en una formulación adecuada para administración rectal o vaginal, por ejemplo, en forma de supositorio, que se puede preparar mezclando uno o más compuestos de la invención con uno o más excipientes o transportadores no irritantes adecuados que comprenden, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol, una cera de supositorio o un salicilato, y que son sólidos a temperatura ambiente, pero líquidos a temperatura corporal, y, liberan de esta forma el principio activo. Los transportadores y formulaciones adecuados para este tipo de administración se conocen en la técnica.

Las formas farmacéuticas para administración tópica o transdérmica de HB-X, por ejemplo, para la administración muscular incluyen polvos, pulverizaciones, pomadas, pastas, cremas, lociones, geles, soluciones, parches e inhaladores. HB-X tal como se desvela en el presente documento se puede mezclar en condiciones estériles con un transportador farmacéuticamente aceptable, y con conservantes, tampones, o propulsores que puedan ser necesarios.

Las pomadas, pastas, cremas y geles pueden contener, además del principio activo de la presente invención, excipientes, tales como grasas animales y vegetales, aceites, ceras, parafinas, almidón, tragacanto, derivados de celulosa, polietilenglicoles, siliconas, bentonitas, ácido silícico, talco y óxido de cinc, o mezclas de los mismos. Los polvos y los pulverizadores pueden contener, además de un compuesto de la presente invención, excipientes tales como lactosa, talco, ácido silícico, hidróxido de aluminio, silicatos de calcio y polvo de poliamida, o mezclas de estas sustancias. Los pulverizadores pueden contener adicionalmente propulsores habituales, tales como clorofluorohidrocarburos e hidrocarburos volátiles no sustituidos, tales como butano y propano.

Los parches transdérmicos tienen la ventaja añadida de proporcionar un suministro controlado de HB-X al organismo. Dichas formas farmacéuticas se pueden preparar disolviendo o dispersando el compuesto en el medio apropiado. También se pueden usar potenciadores de la absorción para aumentar el flujo del compuesto a través de la piel. La velocidad de dicho flujo puede controlarse ya sea proporcionando una membrana de control de la velocidad o dispersando el principio activo en una matriz polimérica o gel.

Las composiciones farmacéuticas de la presente invención adecuadas para la administración parenteral comprenden uno o más compuestos de la invención en combinación con una o más soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas isotónicas estériles farmacéuticamente aceptables, o polvos estériles que se pueden reconstituir para obtener soluciones inyectables estériles en el momento anterior al uso, que pueden contener antioxidantes, tampones, bacteriostáticos, solutos que convierten la formulación en isotónica con la sangre del receptor previsto, o agentes suspensores o agentes espesantes.

Los ejemplos de transportadores acuosos y no acuosos farmacéuticamente aceptables que se pueden utilizar en las

composiciones farmacéuticas de la invención incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares), y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva, y ésteres orgánicos inyectables, tales como oleato de etilo. La fluidez correcta se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de materiales de revestimiento, tal como lecitina, por el mantenimiento del tamaño de partícula necesario en caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones pueden contener también adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsificantes y agentes dispersantes. Se puede asegurar la prevención de la acción de microorganismos mediante la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutano, ácido fenol sórbico y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro de sodio, y similares, en las composiciones. De forma adicional, la absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable se puede conseguir aproximadamente mediante la inclusión de agentes que retrasan la absorción, como monostearato de aluminio y gelatina.

En algunos casos, a fin de prolongar el efecto de un fármaco, es deseable ralentizar la absorción del fármaco procedente de la inyección subcutánea o intramuscular. Esto puede lograrse mediante el uso de una suspensión líquida de material cristalino o amorfo con poca solubilidad en agua. La velocidad de absorción del fármaco depende entonces de su velocidad de disolución que, a su vez, puede depender del tamaño del cristal y de la forma cristalina. Como alternativa, se consigue la absorción retardada de una forma de fármaco administrada parenteralmente disolviendo o suspendiendo el fármaco en un vehículo oleoso.

Las formas de depósito inyectable se hacen formando matrices microencapsuladas de los compuestos sujeto en polímeros biodegradables tales como polilactida-poliglicólido. Dependiendo de la relación de fármaco a polímero y de la naturaleza del polímero concreto empleado, se puede controlar la velocidad de liberación del fármaco. Los ejemplos de otros polímeros biodegradables incluyen poli(ortoésteres) y poli(anhídridos). Se preparan también formulaciones inyectables de depósito atrapando el fármaco en liposomas o microemulsiones que son compatibles con los tejidos corporales.

En determinadas realizaciones, HB-X se puede aislar y/o purificar o purificarse sustancialmente mediante uno o más procedimientos de purificación descritos en el presente documento o conocidos de los expertos en la materia. De manera general, las purezas son al menos 90%, en particular 95% y frecuentemente mayores del 99%. En determinadas realizaciones, el compuesto de origen natural está excluido de la descripción general del género más amplio.

En algunas realizaciones, la composición comprende al menos un HB-X en combinación con un transportador farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos representativos de materiales que pueden servir como vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, sin limitación: azúcares, tales como lactosa, glucosa y sacarosa; almidones, tales como almidón de maíz y almidón de patata; celulosa y sus derivados, tales como carboximetilcelulosa sódica, etil celulosa y acetato de celulosa; tragacanto en polvo; malta; gelatina; talco; excipientes, tales como manteca de cacao y ceras de supositorio; aceites, tales como aceite de cacahuete, aceite de semilla de algodón, aceite de cártamo, aceite de sésamo, aceite de oliva, aceite de maíz y aceite de soja; glicoles, tales como propilenglicol; polioles, tal como glicerina, sorbitol, manitol y polietilenglicol; ésteres, tales como oleato de etilo y laurato de etilo; agar; agentes tamponantes, tales como el hidróxido de magnesio y el hidróxido de aluminio; ácido algínico; agua exenta de pirógeno; suero salino isotónico; solución de Ringer; alcohol etílico; soluciones de tampón fosfato; y otras sustancias compatibles no tóxicas empleadas en formulaciones farmacéuticas.

En determinadas realizaciones, una composición que comprende HB-X, como se desvela en el presente documento, puede contener uno o más grupos funcionales ácidos y, por tanto, pueden formar sales farmacéuticamente aceptables con bases farmacéuticamente aceptables. La expresión "sales farmacéuticamente aceptables", ésteres, amidas, y profármacos farmacéuticamente aceptables" como se usan en el presente documento se refieren a aquellas sales de carboxilato, sales de adición de aminoácidos, ésteres, amidas, y profármacos de los compuestos de la presente invención que están, según el criterio médico establecido, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, y similares, acorde con una relación de beneficio/riesgo razonable, y eficaz para el uso previsto de los compuestos de la invención. El término "sales" se refiere a sales de adición de ácidos orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención.

Estas sales se pueden preparar in situ, durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar las sales formadas de esta manera. Estas pueden incluir cationes basado en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares. (Véase por ejemplo, Berge S. M., y col., "Pharmaceutical Salts," J. Pharm. Sci., 1977;66:1-19.

La expresión "ésteres farmacéuticamente aceptable" se refiere a productos esterificados relativamente no tóxicos de los compuestos de la presente invención. Estos ésteres se pueden preparar in situ durante el aislamiento y

purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de ácido libre o hidroxilo con un agente esterificante adecuado. Los ácidos carboxílicos pueden convertirse en ésteres mediante tratamiento con un alcohol en presencia de un catalizador. Se pretende además que el término incluya grupos de hidrocarburos inferiores capaces de solvatar en condiciones fisiológicas, por ejemplo, ésteres de alquilo, metilo, ésteres de etilo y propilo.

Tal como se usa en el presente documento, las "sales o profármacos farmacéuticamente aceptables" son sales o profármacos que son, según el criterio médico establecido, adecuados para su uso en contacto con los tejidos de pacientes y animales inferiores sin toxicidad, irritación, respuesta alérgica excesivas, y similares, acorde con una relación beneficio/riesgo razonable, y eficaz para su uso previsto. Estos compuestos incluyen formas de iones híbridos, cuando sea posible, de los compuestos r de la invención.

El término "sales" se refiere a sales de adición de ácidos orgánicas e inorgánicas relativamente no tóxicas de los compuestos de la presente invención. Estas sales se pueden preparar in situ, durante el aislamiento y purificación finales de los compuestos, o haciendo reaccionar por separado el compuesto purificado en su forma de base libre con un ácido orgánico o inorgánico adecuado y aislar las sales formadas de esta manera. Estas pueden incluir cationes basado en metales alcalinos y alcalinotérreos, tales como las sales de sodio, litio, potasio, calcio, magnesio, y similares, así como cationes de amonio, amonio cuaternario y amina no tóxicos, incluyendo, aunque no de forma limitativa, amonio, tetrametilamonio, tetraetilamonio, metilamina, dimetilamina, trimetilamina, trietilamina, etilamina, y similares (véase, por ejemplo, Berge S. M., y col. (1977) J. Pharm. Sci. 66,1).

El término "profármaco" se refiere a los compuestos o agentes que se transforman rápidamente in vivo para dar como resultado el HB-X activo, por ejemplo, un HB-X biológicamente activo o funcionalmente activo que codifica un péptido o proteína terapéutica funcionalmente activo. En algunas realizaciones, los profármacos de HB-X pueden activarse mediante hidrólisis en sangre, por ejemplo, mediante escisión de una proteína terapéutica precursora en una proteína terapéutica activa, similar a cómo se activa la insulina a partir de su proproteína en una proteína insulina activa. Se proporciona una discusión completa en T. Higachi y V. Stella, "Pro-drugs as Novel Delivery Systems," Vol. 14 del A.C.S. Symposium Series, y en Bioreversible Carriers en: Drug Design, ed. Edward B. Roche, American Pharmaceutical Association and Pergamon Press, 1987. Tal como se usa en el presente documento, un profármaco es un compuesto que, tras la administración in vivo, se metaboliza o convierte de otra forma en la forma biológica, farmacéutica, o terapéuticamente activa del compuesto. El profármaco puede diseñarse para alterar la estabilidad metabólica o las características de transporte de HB-X, para enmascarar los efectos secundarios o la toxicidad, o para alterar otras características o propiedades de HB-X. En virtud del conocimiento de los procesos farmacodinámicos y del metabolismo del fármaco o del procesamiento de la proteína posterior a la traducción de HB-X *in vivo*, una vez que se identifica un compuesto farmacéuticamente activo, los expertos en la técnica farmacéutica pueden generalmente diseñar profármacos de HB-X que se pueden activar *in vivo* para aumentar los niveles de la proteína terapéutica presente en HB-X en el sujeto (véase, por ejemplo, Nogrady (1985) Medicinal Chemistry A Biochemical Approach, Oxford University Press, N.Y., páginas 388-392). Se describen procedimientos convencionales para la selección y preparación de profármacos adecuados, por ejemplo, en "Design of Prodrugs", ed. H. Bundgaard, Elsevier, 1985. Los ejemplos adecuados de profármacos incluyen ésteres de metilo, etilo, y glicerol del ácido correspondiente.

Independientemente de la ruta de administración seleccionada, los compuestos de la presente invención, que se pueden usar en una forma hidratada adecuada, y/o las composiciones farmacéuticas de la presente invención, se formulan en formas farmacéuticas farmacéuticamente aceptables mediante procedimientos convencionales para las personas normalmente expertas en la técnica.

Vectores

En otra realización, la presente invención se ilustra por un vector que codifica las proteínas de fusión HB-X para uso en los procedimientos, composiciones y kits como se desvela en el presente documento. En algunas realizaciones, el vector es un vector de expresión y permite la inserción de la secuencia de ácido nucleico que codifica un principio activo de una elección de los investigadores. En algunas realizaciones, la presente divulgación se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3). En particular, la invención se dirige a la presente invención que se refiere a un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3). En algunas realizaciones, el vector comprende un sitio de clonación múltiple para la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un principio activo de una elección de los investigadores en la dirección 3' o 5' o ambas de la secuencia HB. En algunas realizaciones, el vector comprende múltiples péptidos HB. En algunas realizaciones, el vector comprende también al menos un ácido nucleico que codifica un péptido enlazador (por ejemplo, que comprende al menos GGG) en la dirección 3' o 5' de la secuencia del péptido HB, antes del sitio de clonación múltiple, dependiendo de si la secuencia de ácido nucleico que codifica X se inserta en la dirección 3' o 5' o ambas de la secuencia del ácido nucleico del péptido HB. En algunas realizaciones, el vector comprende también al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un principio activo (X).

En otra realización, la presente invención proporciona un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al

menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21), KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22); y que comprende opcionalmente al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un principio activo (X) seleccionado entre:

- 5 factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6; interleuquina-11; interleuquina-27; factor inhibidor de leucemia; factor neurotrófico ciliar; cardiotrofina 1; neuropoyetina; citoquina de tipo cardiotrofina; factor de crecimiento de fibroblastos 2; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4 e interleuquina-10; neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF-1070); factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11); factor de crecimiento de células del estroma 1 (SDF-1); miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); factor de crecimiento de tipo insulina 1 (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una parte de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLDKGSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infliximab, anti-TNF- α), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF- β seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®),

o que comprende opcionalmente al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un enlazador.

- En algunas realizaciones de la divulgación, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos una proteína de fusión HB- X_n o X_n -HB $_n$, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, y n es un número entero de al menos 1.

- En algunas realizaciones de la divulgación, el vector comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un one (HB-linker) $_n$ - X_n o al menos una proteína de fusión X_n -(HB-linker) $_n$, o al menos un (HB-linker) $_n$ - X_m -(HB-linker) o proteína de fusión, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, en la que m es un número entero de al menos 1 y n + o es un número entero de al menos 1. Más particularmente, la invención se dirige a un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), or KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3);

40 **Kits**

- En otra realización, la presente invención se puede utilizar en kits para la práctica de los procedimientos de la presente invención. Los kits incluyen preferentemente uno o más recipientes que contienen un péptido HB y medios para unirse el péptido HB a un principio activo (X). En algunas realizaciones de la divulgación, un kit comprende (i) al menos un péptido HB seleccionado entre el grupo que consiste en: KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); y un enlazador químico para conjugar el péptido HB a una molécula pequeña.

- En algunas realizaciones de la divulgación, un kit puede comprender un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3), como se desvela en el presente documento, y los reactivos adecuados (por ejemplo, enzimas de restricción y enzimas de ligadura, etc.) para subclonar una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un principio activo en el vector. En algunas realizaciones, el vector en el kit comprende también secuencias de ácido nucleico que codifican péptidos enlazadores, que pueden estar en la dirección 3' o 5' (o ambas) de la secuencia de ácido nucleico que codifica los péptidos HB, dependiendo de si se va a clonar el agente activo. El péptido HB se selecciona más concretamente entre el grupo que consiste en: (SEQ ID NO: 2-3).

En otra realización, un kit puede comprender un conjugado de HB-X, donde X es una proteína o péptido terapéutico para el tratamiento de una enfermedad o dolencia, por ejemplo, una enfermedad o trastorno relacionado con el cartílago, un trastorno neurológico, un trastorno o inflamación del ojo.

Un kit puede contener opcionalmente agentes terapéuticos adicionales para administrarse simultáneamente con el conjugado de HB-X. El kit puede comprender instrucciones para la administración de un conjugado de HB-X a un sujeto con una enfermedad o trastorno relacionado con el cartílago, un trastorno neurológico, un trastorno o inflamación del ojo.

- 5 Los kits pueden incluir también opcionalmente sistemas adecuados (por ejemplo, recipientes opacos) o estabilizantes (por ejemplo, antioxidantes) para evitar la degradación del conjugado de HB-X por la luz u otras condiciones adversas.

10 En otro aspecto, la invención proporciona kits que incluyen uno o más recipientes que contienen un conjugado de HB-X como se desvela en el presente documento y un excipiente farmacéuticamente aceptable. El kit puede contener opcionalmente agentes terapéuticos adicionales para administrarse simultáneamente con el conjugado de HB-X. El kit puede comprender instrucciones para la administración a un sujeto con una enfermedad o trastorno relacionado con cartílago, un trastorno neurológico, un trastorno o inflamación del ojo.

15 Los kits pueden incluir opcionalmente materiales instructivos que contienen directrices (es decir, protocolos) que se proporcionan para el uso de conjugados de HB-X para el tratamiento de una enfermedad en un mamífero, por ejemplo, para el tratamiento de una enfermedad o trastorno relacionado con el cartílago, un trastorno neurológico, un trastorno o inflamación del ojo.

20 Aunque los materiales instructivos comprenden normalmente materiales escritos o impresos que no se limitan a los mismos. La presente invención contempla cualquier medio capaz de almacenar dichas instrucciones y transmitir las al usuario final. Dichos medios incluyen, aunque no de forma limitativa, medios de almacenamiento electrónicos (por ejemplo, discos magnéticos, cintas, cartuchos, chips), medios ópticos (por ejemplo, CD ROM), y similares. Dichos medios pueden incluir direcciones para sitios de internet que proporcionan dichos materiales instructivos.

En algunas realizaciones, la presente invención se puede definir por cualquiera de los siguientes párrafos numerados:

25 1. Una composición que ilustra la divulgación comprende al menos un HB_n-X_n , en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, y n es un número entero de al menos 1. La invención se dirige a una composición en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre SEQ ID NO: 2-3.

30 2. La composición del párrafo 1, que comprende además un enlazador, en la que la composición está representada por $(HB\text{-enlazador})_n-X_n$.

3. La composición del párrafo 2, en la que el enlazador es un péptido que comprende la secuencia GGG.

4. La composición del párrafo 3, cuya parte HB-enlazador de la composición se selecciona entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:4), o

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLG
KKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:5).

35 5. La composición de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en la que X es una proteína seleccionada entre factores neurotróficos; neurotrofinas; factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); o persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas; interleuquina-6; interleuquina-11; interleuquina-27; factor inhibidor de leucemia; factor neurotrófico ciliar; cardiotrofina 1; neuropoyetina; citoquina de tipo cardiotropina; factor de crecimiento de fibroblastos 2; citoquinas antiinflamatorias; interleuquina-4; interleuquina-10; agentes neuroprotectores; neurregulina-1; factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF 1070), Etanercept (Enbrel®, receptor de TNF recombinante 2 soluble fusionado al componente Fc de la inmunoglobulina humana G1); factor de diferenciación del crecimiento 11 (GDF11); factor derivado de células del estroma 1 (SDF-1); miostatina (factor de diferenciación del crecimiento de fibroblastos 8 (GDF8)); hormona paratiroidea (HPT); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2, también conocida como secuencia 2 del grupo de alta movilidad (HMGB2)); receptor glucocorticoideo; un anticuerpo terapéutico o parte del mismo, tal como Remicade® (infiximab, anti-TNF- α , Janssen Biotech, Horsham, PA), Humira® (adalimumab, anti TNF, Abbot Labs., N. Chicago, IL), o un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF 9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF β , tales como TGF β , TGF β 3, BMP2, o BMP7; u otras proteínas terapéuticas; o partes funcionales, variantes, análogos, o derivados de cualquiera de los anteriores; o principios activos de molécula pequeña.

6. La composición de uno cualquiera de los párrafos anteriores, en la que HB_n-X_n o $(HB\text{-enlazador})_n-X_n$ es una proteína de fusión.

7. La composición del párrafo 1-6, en la que X o el enlazador está fusionado al extremo N de HB.

8. La composición del párrafo 1-6, en la que X o el enlazador está fusionado al extremo C de HB.

9. La divulgación se ilustra mediante la composición del párrafo 1-6, en la que $n=2$, y X está fusionado tanto al extremo N como al extremo C de HB, incluyendo opcionalmente al menos un enlazador peptídico.

10. Un procedimiento para tratar dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o enfermedad) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB- X_n o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre hormona paratiroidea (PTH); péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor de crecimiento de fibroblastos 18 (FGF-18), un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos 9 (FGF 9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF β , tales como TGF β , TGF β 3, BMP2, o BMP7; o partes, análogos, derivados o fragmentos funcionales de las mismas.

11. Un procedimiento tratar una dolencia clínica relacionada con el cartílago (por ejemplo, daño o enfermedad) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB- X_n o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , donde X es un receptor glucocorticoideo; y administrar además en de forma paralela o independiente un corticoesteroide.

12. El procedimiento del párrafo 10 u 11, en la que la dolencia relacionada con el cartílago es un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarramiento parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, o raquitismo hipofosfatémico vinculado a X.

13. Un procedimiento tratar una dolencia neurológica (por ejemplo, un trastorno o enfermedad) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB- X_n o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT 3), neurotrofina 4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleuquina 6, interleuquina 11, interleuquina 27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF 1070, factor de crecimiento de fibroblastos 2, neurregulina1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), o una porción funcional, análogo o derivado de los mismos.

14. El procedimiento del párrafo 13, en el que la dolencia neurológica es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, degeneración de nervios periféricos, ictus, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, neuropatía diabética, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewis, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, trastornos priónicos, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, paraparesis espástica hereditaria, atrofias espinocerebelares, ataxia de Friedreich, amiloidosis, o síndrome de Charcot Marie Tooth.

15. Un procedimiento para tratar una enfermedad ocular tal como úlcera de la córnea / abrasión de la córnea, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratoconjuntivitis seca, inflamación coriorretinal, cicatrices coriorretinales, degeneración coroidal, distrofia coroidal hereditaria, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de la retina, degeneración macular, membrana epirretinal, degeneración periférica de la retina, distrofia retinal hereditaria, retinitis pigmentosa, xeroftalmia, o hemorragia retinal, que comprende administrar la composición de cualquiera de los párrafos 1-9.

16. Un procedimiento para tratar la inflamación que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB X_n , o (HB-enlazador) $_n$ - X_n , donde X es una proteína terapéutica o parte de la misma, seleccionada entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4, o interleuquina-10.

17. La composición de uno cualquiera de los párrafos 1 a 4, en el que X es una molécula pequeña.

18. La composición del párrafo 6 o 32, en la que la proteína de fusión se selecciona entre las siguientes:

19.

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELV
DALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSV
RAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:10);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGL
GKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCF
RSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO:11);
MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRR
APQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
(SEQ ID NO:12);

MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRR
APQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
(SEQ ID NO:13);

MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRR
APQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:14);

MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSSRA
PQTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:15);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
(SEQ ID NO:16);

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
(SEQ ID NO:17);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:18); o

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAP
QTGIVDECCFRSCDLRRLREMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO:19).

- 5 **20.** La composición del párrafo 1-6, en la que $HB_n=2$, y HB está fusionado tanto al extremo N como al extremo C de X, en la que la fusión de HB al extremo N o C incluye opcionalmente al menos un enlazador peptídico.
- 10 **21.** La composición de cualquiera de los párrafos 1-5, en la que el HB_n-X_n comprende $(HB\text{-enlazador})_n-X_m$ -(HB-enlazador)_o, en la que m es un número entero de al menos 1 y n + o es un número entero de al menos 1.
- 22.** La divulgación se ilustra mediante la composición del párrafo 20, en la que HB_n-X_n comprende dos o más péptidos HB diferentes seleccionados de KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3).
- 23.** La composición de cualquiera de los párrafos 1-9, en la que la composición comprende al menos 2 conjugados HB_n-X_n .

24. La composición de cualquiera de los párrafos 6, 21 o 22, en la que X se selecciona entre una cualquiera o una combinación de proteínas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6-9, SEQ ID NO: 30-41, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID NO: 73-76, o fragmento funcional de la misma.
- 5 25. La composición de cualquiera de los párrafos 1-9 y 17-23 para la administración de un principio activo X a una célula o tejido que expresa proteoglicanos.
26. La composición del párrafo 24, en la que el tejido es tejido de cartílago, tejido neuronal, piel o tejido subcutáneo.
27. La composición de cualquiera de los párrafos 1-9 y 17-25, en la que la composición comprende un hidrogel.
- 10 28. La composición del párrafo 26, en la que el hidrogel es un hidrogel con péptido autoensamblado.
29. La composición del párrafo 27, en la que el hidrogel con péptido autoensamblado comprende al menos una o una combinación de péptidos seleccionada entre: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcN-KLDLKLKLDL-CNH₂ (SEQ ID NO: 79).
30. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 10-16, en el que HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n está presente en o dentro de un hidrogel.
- 15 31. El procedimiento del párrafo 29, en la que el hidrogel es un hidrogel con péptido autoensamblado.
32. El procedimiento del párrafo 30, en la que el hidrogel con péptido autoensamblado comprende al menos una o una combinación de péptidos seleccionada entre: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcNKLDLKLKLDL-CNH₂ (SEQ ID NO: 79).
- 20 33. El procedimiento de cualquiera de los párrafos 10-16, en el que HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n está presente en o dentro de un implante biológico.
34. El procedimiento del párrafo 32, en el que el implante biológico es un aloinjerto osteocondrial o del menisco.
- 25 35. Un procedimiento para tratar dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o enfermedad) que comprende administrar a un sujeto una cantidad eficaz de una proteína de fusión recombinante que comprende HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3), somatostatina (SST); o fragmentos, porciones, análogos, derivados o fragmentos funcionales de las mismas.
36. El procedimiento del párrafo 34, en el que un análogo de SST se selecciona entre octreotida, pasireotida o lamreotida.
- 30 37. La divulgación se ilustra mediante un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3).
38. El vector del párrafo 36, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un principio activo (X).
- 35 39. El vector del párrafo 36, que comprende además al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un enlazador.
- 40 40. La divulgación se ilustra mediante el vector del párrafo 37, en el que la secuencia de ácidos nucleicos codifica al menos un HB-X_n o proteína de fusión X_n-HB_n, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, y n es un número entero de al menos 1.
- 45 41. La divulgación se ilustra mediante el vector del párrafo 38, en la que la secuencia de ácidos nucleicos codifica al menos un (HB-enlazador)_n-X_n o al menos una proteína de fusión X_n-(HB-enlazador)_n, o al menos un (HB-enlazador)_n-X_n-(HB-enlazador) o proteína de fusión, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, en la que m es un número entero de al menos 1 y n + o es un número entero de al menos 1.
42. El vector del párrafo 36 o 38, en el que el enlazador comprende GGG.
43. El vector de cualquiera de los párrafos 36 a 41, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el X o el enlazador está en 5' con respecto al ácido nucleico que codifica HB.
- 50 44. El vector de cualquiera de los párrafos 36 a 41, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el X o el enlazador está en 3' con respecto al ácido nucleico que codifica HB.
- 45 45. El vector de cualquiera de los párrafos 36 a 41, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el péptido HB está en 5' y 3' con respecto al ácido nucleico que codifica X o el enlazador es ilustrativa solamente de la invención.
- 55 46. El vector de cualquiera de los párrafos 36 a 44, en el que vector es un vector de expresión.
47. La divulgación se ilustra por un kit que comprende: (i) al menos un péptido HB seleccionado entre el grupo que consiste en: KRKKKGKGLGKKRDPCLRKYK (SEQ ID NO:1), KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); y (ii) un enlazador químico para conjugar el péptido HB a una molécula pequeña.
- 60 48. Un kit que comprende un vector del párrafo 36 o 38 y dirige la inserción de una secuencia de ácido nucleico que codifica un principio activo (X) en dicho vector.
49. Una línea celular que comprende el vector de cualquiera de los párrafos 36 a 45.

Las realizaciones se describirán adicionalmente mediante ejemplos no limitantes.

Ejemplos

Material y procedimientos

Ensayo de unión a cartílago:

5 Se extrajeron los explantes de cartílagos de las articulaciones femoro-tibiarotulianas de terneros bovinos recién nacidos de 1-2 semanas de edad (Research 87 Inc., Boylston MA). El cartílago articular se cortó y perforó en discos de 1 mm de espesor por 3 mm de diámetro y se incubó a 37°C en DMEM bajo en glucosa.

Los discos de cartílago se incubaron únicamente con medio, PTH, o eHB-PTH. Después de 24 horas, todos los discos de cartílago se lavaron x 3 en medio reciente sin péptidos añadidos. El cartílago se devolvió a la incubación y se recogió después de dos días o cuatro días en ausencia de péptidos.

10 Extracción de proteínas a partir de discos de cartílago y análisis:

Los discos de cartílago se pulverizaron individualmente enfriando a la vez con nitrógeno líquido. El polvo se volvió a suspender en tampón de lisis que contenía Triton X-100 al 0,1%, PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidores de proteasas (Sigma) y se hizo bascular durante la noche a 4°C. Los extractos resultantes se aclararon mediante centrifugación y se evaluó la concentración de proteínas con 660 nm de Protein Assay (Pierce).

15 Para el análisis por transferencia Western, las porciones de extractos que contenían cantidades iguales de proteínas (3 ug de proteína total/banda) se hirvieron en condiciones reductoras y se sometieron a electroforesis en geles Bis-Tris al 4-12%. Un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra PTH era de Abcam (ab40630) para el análisis de la transferencia western de la presencia de PTH en explantes de cartílago. Las membranas se sondaron para PTH con una dilución 1:1000 de anticuerpo ab40630, seguido por un anticuerpo secundario de cabra dirigido contra un anticuerpo de conejo a una dilución de 1:5000.

Para la evaluación de la retención de HB-IGFI en la médula espinal:

25 Se obtuvieron ratas reproductoras macho retiradas de Charles River. Se sometió a eutanasia una rata y se extrajeron los tejidos. Se tomó el tejido de la médula espinal tras la disección y se dividió en porciones similares. Se pesó cada porción y a continuación se incubó en 1 ml de DMEM exento de suero a 37°C en placas de 24 pocillo. A continuación se sustituyó el medio con DMEM exento de suero que no contenía adiciones, 1 ug/ml de IGF-1, o 1 ug/ml HB-IGF-1. La IGF-1 era IGF-1 recombinante humana (Increlex, Tercica). IGF-1 se fusionó con HB(C17R) (SEQ ID NO: 21). HB-IGF-1 se expresó como HB-C17R-IGF-1 recombinante humana, y se extrajo a partir de cuerpos de inclusión tras la expresión en *E. coli*. Tras la incubación de la médula espinal con HB-IGF1 durante un día, se sustituyó el medio con DMEM exento de suero que no contenía adiciones. Se recogió un conjunto de tejido como muestras del "Día 0" y se almacenó congelado a -20°C. A continuación se tomaron muestras de tejido después de 30 24 horas de lavado ("Día 1").

Extracción de proteínas de la médula espinal y análisis:

35 Se extrajeron las proteínas de los tejidos congelados de la médula espinal homogeneizando en 1 ml de tampón de lisis/100 mg de tejido. El tampón de lisis contenía Triton X-100 al 0,1% con PMSF 1 mM y un cóctel de inhibidores de las proteasas (Sigma). Se midieron las concentraciones totales de las proteínas y se hirvieron las porciones de extractos que contenían cantidades equivalentes de proteínas totales en un tampón de muestra reductor y se cargaron en geles Bis-Tris al 4-12% para el análisis por transferencia Western

Determinación de la expresión de las proteínas de fusión que comprenden los péptidos C17K y C17R HB:

40 Se detectó la expresión superior de HB-IGF-1 soluble con las secuencias de péptidos HB potenciados (por ejemplo, C17R y C17K) en comparación con las secuencias naturales (SEQ ID NO: 20) y de C17S (SEQ ID NO: 41). Se evaluaron las expresiones de las proteínas de los siguientes plásmidos: (i) Plásmido 04 HB(C17K)-IGF-1 en pET24a(+), (ii) Plásmido 05 HB(C17R)-IGF-1 en pET24a(+), (iii) Plásmido 06 HB(C17S)-IGF-1 en pET24a(+), y (iv). Plásmido 07: HB-IGF-1 en pET24a(+). Se transformaron HB-IGF-1 y mutantes (relacionados anteriormente) en células de *E. coli* que expresan T7 y se hicieron crecer en medio de Luria-Bertani (LB) en lotes de 1 l. Se indujo la expresión de la proteína con isopropil β -D-tiogalactósido 1 mM durante 4 h, y a continuación se recogieron las células mediante centrifugación. se extrajeron las proteínas con 10 ml de reactivo de extracción nativo de la mezcla maestra BugBuster (Novagen). Se analizaron 10 ul de cada muestra e un gel Bis-Tris al 4-12% en condiciones reductoras. Se compararon los niveles de expresión mediante transferencia western utilizando un anticuerpo ab9572 dirigido contra IGF-1 (AbCam).

50 Determinación del rendimiento de producción de las proteínas de fusión que comprenden los péptidos C17K y C17R HB:

Se detectó un rendimiento superior sobre la purificación de proteínas de fusión HB-IGF-1 solubles que comprenden el péptido HB (C17R) potenciado. Se evaluaron los siguientes rendimientos de fusión a partir de los siguientes plásmidos: (i) El plásmido 05 HB(C17R)-IGF-1 en pET24a(+) o (ii) Plásmido 07: HB-IGF-1 en pET24a(+).

HB-IGF-1 y HB(C17R)-IGF-1 (relacionados anteriormente) se transformaron en células de *E. coli* que expresan T7 y se hicieron crecer en medio de Luria-Bertani (LB) en lotes de 1l. Se indujo la expresión de la proteína con isopropil β -D-tiogalactósido 1 mM durante 4 h, y a continuación se recogieron las células mediante centrifugación. Se extrajeron las proteínas con un reactivo de extracción nativo de la mezcla maestra BugBuster (Novagen). Se llevó a cabo la purificación cargando las muestras sobre una columna de cromatografía de exclusión por tamaños HiLoad 16/60 Superdex 200. Se eluyeron 2 ml en cada fracción. 10 μ l de cada fracción se analizaron en un gel Bis-Tris al 4-12% en condiciones reductoras. Se evaluó IGF-1 en cada fracción mediante la transferencia western utilizando el anticuerpo ab9572 dirigido contra IGF-1 (AbCam). Se detectó la proteína en las fracciones 3-12 (no se muestran las fracciones) para la variante C17R (eHB) y en las fracciones 4-10 para la variante natural.

Para demostrar que la HB potenciada (C17R) permite un rendimiento superior de la proteína de fusión HB-IGF-1 de los cuerpos de inclusión, los plásmidos que codifican HB-IGF-1 y HB(C17R)-IGF-1 (por ejemplo, el plásmido 05 HB(C17R)-IGF-1 en pET24a(+) o (ii) el plásmido 07: HB-IGF-1 en pET24a(+)) como se relaciona anteriormente) se transformaron en células de *E. coli* que expresan T7 y se hicieron crecer en medio de Luria-Bertani (LB) en lotes de 1 l. Para las muestras inducidas, Se indujo la expresión de la proteína con isopropil β -D-tiogalactósido 1 mM durante 4h. se dejó que las muestras no inducidas crecieran durante 4 h sin isopropil β -D-tiogalactósido 1 mM. Se recogieron las células mediante centrifugación. Se lisaron las células en 8 ml de tampón de lisis que contenía clorhidrato de guanidina 6 M, fosfato de sodio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,8. Se dializaron los lisados celulares en un tampón que contenía Tris 50 mM, NaCl 100 mM. Se analizaron 5 μ l de cada muestra en un gel Bis-Tris al 4-12% en condiciones reductoras. Se analizaron las muestras para la transferencia western de IGF-1 utilizando anticuerpo ab9572 dirigido contra IGF-1 (AbCam) y mediante la tinción de Coomassie.

Ejemplo 1. Proteína de fusión HB-IGF-1

Se preparó una construcción HB-IGF-1 para expresar el dominio de unión a heparina fusionado al extremo amino de una proteína IGF-1 madura. Se produjo la proteína de fusión HB-IGF-1 mediante expresión recombinante en *E. coli*, replegada, y purificada mediante cromatografía en fase inversa. IGF-1 recombinante humana está comercialmente disponible, por ejemplo INCRELEX® (mecasemin [origen del ADN], Ipsen Biopharmaceuticals, Inc., Basking Ridge, NJ).

Ejemplo 2. Unión y farmacocinética *in vivo*

Se llevaron a cabo experimentos con ratas Lewis machos (251-275 g, Charles River, Wilmington, MA). Todos los procedimientos animales fueron homologados por el Harvard Medical Area Standing Committee on Animals.

Las ratas recibieron una única inyección intraarticular que contenía 100 μ g de HB-IGF-1, 100 μ g de IGF-1, o solución salina tamponada con fosfato (PBS) en la articulación patelofemoral derecha. Se recogieron muestras del cartílago articular, el menisco medial y el tendón patelar en los días 2, 4, 6, y 8 días después de la inyección. Se pesaron las muestras, pulverizándolas a la vez en nitrógeno líquido y se extrajeron con 10 μ l de tampón de lisis (NaCl 100 mM, Tris 50 mM, Triton X-100 al 0,5%, EDTA 5 mM, PMSF 1 mM, y un cóctel de inhibidores de las proteasas [Roche] por miligramo de tejido. Se analizaron las porciones de extractos con masas de proteínas iguales mediante transferencia Western. Se midieron los niveles de IDF-1 en suero mediante el reactivo de ELISA R&D Systems n.º DY291) con IGF-1 humana pero no de roedor.

Ejemplo 3. Ensayo de biosíntesis de cartílago

Se asignaron aleatoriamente las ratas para recibir una única inyección intraarticular que contenía 100 μ g de HB-IGF-1, 100 μ g de IGF-1, o PBS en la articulación patelofemoral derecha. Se sacrificaron los animales 2 o 4 días después de la inyección. Tras el sacrificio, se extrajeron los meniscos de la articulación de la rodilla derecha y se incubaron a 37°C en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM) que contenía 5 μ Ci/ml ³⁵S-sulfato durante 18 h. Tras la incubación, las muestras se lavaron cuatro veces durante 15 min en PBS con sulfato para eliminar la radio marca no incorporada. Se digirieron las muestras durante la noche con 1 mg/ml de proteinasa K a 60°C y se midió la incorporación de la radiomarca en un contador de centelleo líquido.

Ejemplo 4. Modelo de daño de articulación en rata

Para los procedimientos quirúrgicos, las ratas se asignaron aleatoriamente a uno de tres grupos: 50 μ l de inyecciones intraarticulares que contenían 100 μ g de HB-IGF-1, 100 μ g de IGF-1, o PBS en la articulación de la rodilla derecha. Se administraron las inyecciones iniciales 1 día antes de la ruptura del menisco medial (MMT). Se usó el modelo MMT como se ha descrito anteriormente. Gerwin y col., 18 Osteoarthr. Cartil. S24 (2010). En resumen, se realizó una incisión en la piel a través del aspecto medial de la rodilla. Se expuso el ligamento colateral medial mediante disección roma y se seccionó. El menisco medial se reflejó medialmente y se cortó para simular una ruptura completa. Se administraron inyecciones intraarticulares posteriores a los 7 y 14 días después de la MMT. Se sacrificaron los animales 21 días después de la cirugía.

Se realizó una clasificación y seccionamiento histológicos. Se extrajeron las articulaciones de la rodilla y se fijaron en paraformaldehído al 4%. A continuación se transfirieron las articulaciones a una solución decalcificante de ácido fórmico al 5% (ImmunoCal, Decal Chemical Corp, Tallman, NY). Las articulaciones se cortaron por la mitad para

formar las secciones anterior y posterior, y se incluyeron en parafina. Se tiñeron secciones de 8 µm tomadas con una separación de aproximadamente 200 µm con azul de toluidina.

Se analizó la meseta tibial medial y se fotografió microscópicamente. La mayoría de las secciones centrales que presentaban la extensión de la lesión máxima se seleccionaron para la puntuación con enmascaramiento. Se puntuaron las lesiones utilizando un sistema de puntuación Mankin modificado. Se midieron las lesiones utilizando tres métricas diferentes: la anchura de la pérdida de la matriz de cartílago, la anchura de la degeneración total del cartílago, y la anchura de la degeneración significativa.

La anchura de la pérdida de la matriz de cartílago midió únicamente la extensión de la pérdida del 100% de matriz mientras que se ignoran las áreas de PG o la degeneración de los condriocitos. Se tomaron mediciones en la superficie (0% de profundidad) y en la profundidad de los márgenes (100%). La anchura de la degeneración total del cartílago midió la anchura total del área del cartílago articular afectada por cualquier tipo de cambio degenerativo. La anchura de la degeneración del cartílago significativa midió la extensión de la lesión que afecta más del 50% del grosor del cartílago. La anchura de la degeneración del cartílago significativa incluía cualquier forma de matriz de colágeno, PG, o degeneración de los condriocitos. Todos los resultados se expresan como promedio ± SEM.

15 Ejemplo 5:

Los inventores demostraron que la modificación del resto de aminoácido 17 en la SEQ ID NO: 20 (que corresponde al resto aminoácido 16 en la SEQ ID NO: 1) podría aumentar el rendimiento y la retención de la proteína de fusión HB en el tejido. Utilizando el péptido HB de 17-mer de la SEQ ID NO: 20, los inventores demuestran que existe una retención superior inesperada de HB-IGF-1 soluble en los explantes de cartílagos incubados con proteínas de fusión que comprenden péptidos HB (eHB) potenciados: C17K (SEQ ID NO:22) y C17R (SEQ ID NO: 21), en comparación con las proteínas de fusión HB-IGF1 que comprenden C17S (MKRKKKGKGLGKKRDP SLRKYK; SEQ ID NO: 41) o HB natural (SEQ ID NO: 20).

Por otro lado, existe una expresión superior inesperada de HB-IGF-1 soluble en explantes de cartílago incubados con proteínas de fusión que comprenden péptidos HB (eHB) potenciados: C17K (SEQ ID NO:22) y C17R (SEQ ID NO: 21), en comparación con las proteínas de fusión HB-IGF1 que comprenden C17S (MKRKKKGKGLGKKRDP SLRKYK; SEQ ID NO: 41) HB natural (SEQ ID NO: 20) (Figura 5).

Por otro lado, de forma sorprendente, los inventores detectaron un rendimiento significativamente superior tras la purificación de HB-IGF-1 soluble con explantes de cartílago incubados con las proteínas de fusión HB-IGF-1 que comprenden C17R (SEQ ID NO: 21) en comparación con explantes de cartílago incubados con una proteína de fusión que comprende HB natural (SEQ ID NO: 20) (Figura 6).

A continuación, Los inventores demuestran también que se puede obtener también un rendimiento de purificación superior de HB-IGF soluble a partir de los cuerpos de inclusión (inducidos y no inducidos) obtenidos de explantes de cartílagos incubados con la proteína de fusión HB-IGF-1 que comprende C17R (SEQ ID NO: 21) en comparación con los explantes de cartílagos incubados con HB-IGF-1 que comprenden HB natural (SEQ ID NO: 20) (Figura 7).

Por consiguiente, los inventores demuestran que la modificación de los aminoácidos cargados negativamente en la SEQ ID NO: 1 o SEQ ID NO: 20, por ejemplo, un cambio del resto cisteína en el aminoácido 17 en la SEQ ID NO: 20, (o un cambio de cisteína en el resto aminoácido 16 en la SEQ ID NO: 1) a un resto cargado positivamente (por ejemplo, arginina o lisina) puede dar como resultado de forma sorprendente un aumento significativo en la proteína de fusión HB retenida en el tejido, así como un significativo aumento del rendimiento de la proteína de fusión HB obtenida a partir del tejido de extractos de tejido completos (Figura 6) y cuerpos de inclusión del extracto de tejido (Figura 7).

Ejemplo 6:

En los Ejemplos 1-4, los inventores demuestran que las fusiones de unión a heparina (HB) con IGF-1 permiten una retención extendida de la proteína de fusión en el tejido del cartílago mediante la interacción de proteoglicanos sulfatados con condroitina muy abundantes. No obstante, otros tejidos tienen también abundantes proteoglicanos cargados negativamente en su matriz extracelular. Por consiguiente, los inventores evaluaron si la proteína de fusión HB-IGF-1 extendería la retención de la proteína en el tejido neural extraído de la médula espinal.

Tras la incubación de los explantes de médula espinal en presencia de IGF-1 o HB-IGF-1 durante un día, se detectaron ambas proteínas en los extractos tisulares mediante el análisis por transferencia Western para IGF-1 (Figura 8). Tras un día de lavado, no se detectó IGF-1 detectable no fusionado permaneciendo en el tejido. Por el contrario, la proteína HB-IGF-1 sigue siendo detectable en los extractos tisulares de médula espinal (Figura 8).

Por consiguiente, los inventores han demostrado en el presente documento que HB-IGF-1 se retiene en el tejido de médula espinal *ex vivo* durante al menos 24 horas, mientras que IGF-1 (no fusionado), no lo es. Por consiguiente, HB fusionado a una proteína permite la retención extendida de las proteínas en tejidos diferentes del cartílago, incluyendo tejido neural y otros tejidos con proteoglicanos sulfatados con condroitina abundantes sobre las superficies celulares de los tejidos.

Ejemplo 7:

En los Ejemplos 1-4, los inventores demuestran que la fusión del dominio HB con IGF-1 permite la retención dirigida y sostenida de la proteína de fusión IGF-1 en el cartílago. No obstante, como se describe en el presente documento, las fusiones del dominio HB no están limitadas a la proteína IGF-1. Por consiguiente, HB se puede fusionar a cualquier principio activo como una estrategia para la administración dirigida de múltiples proteínas terapéuticas.

Un péptido de la hormona paratiroidea (PTH), por ejemplo, aminoácidos 1-34 (PTH(1-34)) es un péptido homologado para el uso clínico en osteoporosis que tiene beneficios potenciales en la reparación del cartílago. En un modelo de osteoartritis de rata, ha mostrado reducir la extensión del desarrollo de la osteoartritis (Chang y col., 2009).

como se demuestra en el presente documento, los inventores evaluaron la retención de PTH en el cartílago usando explantes de cultivos de tejido bovino utilizando la proteína de fusión PTH-HB.

Los siguientes péptidos PTH se generaron mediante síntesis (Peptide 2.0, Chantilly VA):

1. PTH(1-34)-biotina: SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFK(-biotinil)-NH₂ (SEQ ID NO: 80)

2. PTH(1-34)-enlazador-HB-biotina: SVSEIQLMHNLGKHLNSMERVEWLRKKLQDVHNFGGGKRKKKGGKGLGKKRDPRLRKYKK(biotinil)-NH₂ (SEQ ID

NO: 81). Se añadió biotina al péptido PTH(1-34) y al péptido PTH(1-34)-enlazador-HB para fines de identificación y seguimiento. De manera análoga, se puede usar una construcción PTH(1-34)-enlazador-HB sin la biotina para fines terapéuticos. Adicionalmente, se puede usar también la ausencia de un enlazador, tal como se desvela en el presente documento. Un anticuerpo policlonal de conejo dirigido contra PTH era de Abcam (ab40630) para el análisis de la transferencia western de la presencia de PTH en explantes de cartílago.

El análisis por transferencia Western demostró la detección del péptido PTH y PTH-HB (Figura 9A). Después de dos días de incubación en ausencia de péptidos PTH, solo había una débil detección del PTH que queda en el tejido (Figura 9B). Por el contrario, hubo una fuerte detección del péptido PTH-eHB que queda en el tejido (Figura 9B). Por otro lado, el péptido PTHHB siguió siendo muy abundante en el tejido después de cuatro días de incubación en ausencia de los péptidos PTH (no se muestran los datos). Igualmente, hubo solo una débil detección del péptido PTH (no se muestran los datos).

Por consiguiente, los inventores han demostrado en el presente documento que la modificación del péptido PTH (1-34) mediante fusión con la secuencia de unión a heparina "KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK" (SEQ ID NO: 2) permite la retención extendida del péptido PTH en el tejido del cartílago. Por consiguiente, se puede retener un péptido PTH-HB en el tejido del cartílago para evitar la pérdida de cartílago tras la lesión o durante la OA.

Referencias

Chang, J.-K., Chang, L.-H., Hung, S.-H., Wu, S.-C., Lee, H.-Y., Lin, Y.-S., Chen, C.-H., Fu, Y.-C., Wang, G.-J., and Ho, M.-L. (2009). Parathyroid hormone 1-34 inhibits terminal differentiation of human articular chondrocytes and osteoarthritis progression in rats. *Arthritis Rheum.* 60, 3049-3060.

REIVINDICACIONES

1. Una composición que comprende al menos un conjugado HB_n-X_n, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21), KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22); X es un principio activo seleccionado de:
- factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina o factor 2 de crecimiento de fibroblastos; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre interleuquina-4 e interleuquina-10 del receptor 2 de TNF; neuregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF-1070); factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF11); factor 1 de derivado de células del estroma (SDF-1); miostatina (factor 8 de diferenciación del crecimiento de fibroblastos (GDF8)); factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una porción de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31,1-34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos: RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNLVAGYLQGPVNVNLEEKIDVVPIEP HALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSF ESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infliximab, anti-TNF-α), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor 9 de crecimiento nervioso; factor de crecimiento de fibroblastos (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF-β seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de fluocinolona, fluocinonida, fluocortin butilo, fluocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednideno, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicartrato, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona; somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®); un principio activo de molécula pequeña seleccionado entre TR2-01829 o PRO 1,2-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) o kartogenina y n es un número entero de al menos 1.
2. La composición de la reivindicación 1, que comprende además un enlazador, en la que la composición está representada por (HB-enlazador)_n-X_n.
3. La composición de la reivindicación 1 o 2, en la que X es un principio activo seleccionado entre factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una porción de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1, -37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; IL-1RA maduro que tiene la secuencia de aminoácidos :RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNLVAGYLQGPVNVNLEEKIDVVPIEP HALFLGIHGGKMCLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSNRKQDKRFAFIRSDSGPTTSF ESAACPGWFLCTAMEADQPVSLTNPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18).
4. La composición de la reivindicación 2 o 3, en la que el enlazador es un péptido que comprende la secuencia GGG o GGGGS.
5. La composición de la reivindicación 4, en la que la porción HB-enlazador de la composición se selecciona entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:4), o

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKG
KGLGKK RDPRLRKYK (SEQ ID NO:5).

6. La composición de la reivindicación 1-5, en la que X o el enlazador está:

fusionado al extremo N de HB o
fusionado al extremo C de HB.

5 7. La composición de la reivindicación 6, en la que la proteína de fusión se selecciona entre las siguientes:

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAEL
VDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPA
KSARSVRAQR HTDMPKTQKEVHLKNASRGSA (SEQ ID NO: 10);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGGGKRKKKG
KGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSRRAPQT
GIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLKNASRGSA
(SEQ ID NO: 11);

MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGS
SSRRAPQTGTVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVH
LKNASRGSA (SEQ ID NO: 12);

MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGS
SSRRAPQTGTVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVH
LKNASRGSA (SEQ ID NO: 13);

MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGS
SSRR APQTGTVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 14);

MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGS
SSRRAPQ TGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 15);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSS
RRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLK
NASRGSA (SEQ ID NO: 16);

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSS
RRAPQTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSARSVRAQRHTDMPKTQKEVHLK
NASRGSA (SEQ ID NO: 17);

KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYKGPETLCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSS
QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 18); o

RRAP

KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYKGPETLCCGAELVDALQFVCGDRGFYFNKPTGYGSSS
 RRAP QTGIVDECCFRSCDLRRLEMYCAPLKPAKSA (SEQ ID NO: 19).

8. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 2-5, en la que el HB_n-X_n comprende (HB-enlazador)_n-X_m-
 (HB-enlazador)_o, en la que m es un número entero de al menos 1 y n + o es un número entero de al menos 1; dos o
 5 más péptidos HB diferentes seleccionados entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), o
 KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) o al menos 2 conjugados HB_n-X_n.
9. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 6 u 8, en la que X se selecciona entre una cualquiera o una
 combinación de proteínas del grupo que consiste en: SEQ ID NO: 6-9, SEQ ID NO: 30-41, SEQ ID NO: 63 y SEQ ID
 NO: 73-76.
10. La composición de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que X es una molécula pequeña
 10 seleccionada entre las moléculas pequeñas de octreotida (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida
 (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®) [00141]
 y principios activos de molécula pequeña seleccionados entre TR2-01829 o PRO 1, 2-hidroxi-N-[3-
 (trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) o kartogenina.
11. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende al menos un HB-X_n o (HB-
 15 enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre factor 1 de crecimiento de tipo insulina
 (IGF-1); hormona paratiroidea (HPT); una porción de la PTH seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-
 34 (TM Forteo®), 1-37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea
 (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde
 20 N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA);
 quimeras IL-1/IL-1 RA; factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18), un anticuerpo dirigido contra el factor de
 crecimiento nervioso, FGF-9, factor de crecimiento de hepatocitos, TGFβ, TGFβ3, BMP2, BMP7, análogo de
 angiopoyetina 3 (ANGPTL3), somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas
 25 pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida
 (nombre comercial: SOMATULINE®), receptor de TNF 2, interleuquina-4 e interleuquina-10; IL-11; un agente
 antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona,
 algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona,
 clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona,
 30 dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucloronida, flumetasona, flunisolida,
 acetónido de fluocinolona, fluocinonida, flucortin butilo, flucortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona,
 acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida,
 propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de
 loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona,
 35 prednicarbo, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona,
 prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de
 triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona, para su uso en el tratamiento de dolencias clínicas relacionadas con
 el cartílago (por ejemplo, daño o lesión) seleccionadas entre un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura
 o el desprendimiento, un defecto en el menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o
 desprendimiento traumático del cartílago, espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide,
 40 lupus sistémico eritematoso, artritis idiopática juvenil, raquitismo hipofosfatémico vinculado a X o uno o más
 síntomas de un trastorno articular o pérdida o daño del cartílago, incluidos uno o más síntomas del grupo de:
 inflamación de articulaciones, dolor articular, enrojecimiento de la articulación, laxitud de la articulación, síntomas de
 artritis leve, derrame articular hemorrágico, derrame articular inflamatorio, hipermovilidad de la articulación, derrame
 articular no inflamatorio.
12. La composición según cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende al menos un HB-X_n o (HB-
 45 enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica seleccionada entre hormona paratiroidea (PTH); una porción
 de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1, -37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la
 PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la
 secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID
 NO: 39); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18),
 50 un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor 9 de crecimiento de fibroblastos (FGF-9); factor
 de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF seleccionadas entre TGF, TGFP3, BMP2, o
 BMP7 para su uso en el tratamiento de dolencias clínicas relacionadas con el cartílago (por ejemplo, daño o lesión)
 seleccionadas entre un defecto en el cartílago articular que incluye la rotura o el desprendimiento, un defecto en el
 menisco que incluye un desgarro parcial o completo, artrosis, ruptura o desprendimiento traumático del cartílago,
 55 espondilitis anquilosante, capsulitis, artritis psoriática, artritis reumatoide, lupus sistémico eritematoso, artritis
 idiopática juvenil, o raquitismo hipofosfatémico vinculado a X.
13. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, que comprende al menos un HB-X_n o (HB-
 enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica o porción de la misma, seleccionada entre factor de

5 crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor
 10 inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor 2 de crecimiento de fibroblastos, neurregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), quimeras IL-1/IL-1 RA, IL-1RA madura que tiene la secuencia de aminoácidos: RPSGRKSSKMQAFRIWDVNQKTFYLRNQLVAGYLQGPVNLEEKIDVVPPIEPHALFL
 15 GIHGGKMLSCVKSGDETRLQLEAVNITDLSENKQDKRFAFIRSDSGPTTSFESAAC PGWFLCTAMEAD QPVSILTNPDEGVMVTKFYFQEDE (SEQ ID NO: 40), receptor de TNF 2, interleuquina-4 e interleuquina-10; IL-11; un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, clorprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluzacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de flucinolona, fluciclonida, flucortin butilo, flucortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbo, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona,
 20 prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónico de triamcinolona para su uso en el tratamiento de una enfermedad ocular o una dolencia ocular mediada por inflamación, tal como úlcera de la córnea o abrasión de la córnea, queratopatía puntiforme superficial de Thygeson, neovascularización de la córnea, distrofia de Fuchs, queratoconjuntivitis seca, inflamación coriorretinal, cicatrices coriorretinales, degeneración coroidal, distrofia coroidal hereditaria, desprendimiento de retina, retinosquiasis, retinopatía hipertensiva, retinopatía del prematuro, degeneración macular relacionada con la edad, degeneración de la retina, degeneración macular, membrana epirretinal, degeneración periférica de la retina, distrofia retinal hereditaria, retinitis pigmentosa, xeroftalmia, o hemorragia retinal.

14. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende al menos un HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n, en la que X es una proteína terapéutica o porción de la misma, seleccionada entre factor de crecimiento de los nervios (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), neurotrofina-4 (NT-4), factor neurotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF), factor neurotrófico de dopamina (CDNF), factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF), neurturina (NRTN), artemina (ARTN), persefina (PSPN), interleucina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina, FPF-1070, factor 2 de crecimiento de fibroblastos, neurregulina-1, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), IGF o factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF-1) para su usar en el tratamiento de una dolencia neurológica tal como la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amiotrófica, esclerosis múltiple, lesión cerebral, lesión de la médula espinal, degeneración de nervios periféricos, ictus, enfermedad de Huntington, enfermedad de Pick, neuropatía diabética, demencia frontotemporal, demencia con cuerpos de Lewis, degeneración corticobasal, parálisis supranuclear progresiva, trastornos priónicos, parálisis supranuclear progresiva, atrofia multisistémica, paraparesis espástica hereditaria, atrofas espinocerebelares, ataxia de Friedreich, amiloidosis, o síndrome de Charcot Marie Tooth.

15. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-5, que comprende al menos un HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n donde X es una proteína terapéutica o porción de la misma, seleccionada entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4, o interleuquina-10 para su uso en el tratamiento de la inflamación.

16. La composición de cualquiera de las reivindicaciones 1-10, para suministrar un principio activo X seleccionado entre: factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina o factor 2 de crecimiento de fibroblastos; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4 e interleuquina-10; neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolisin® (FPF-1070); factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF11); factor 1 de derivado de células del estroma (SDF-1); miostatina (factor 8 de diferenciación del crecimiento de fibroblastos (GDF8)); factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una porción de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forteo®), 1, -37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39); antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infliximab, anti-TNF-a), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína

- recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor 9 de crecimiento de fibroblastos (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF-beta seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); un agente antiinflamatorio esteroideo seleccionado del grupo que consiste en 21-acetoxipregnenolona, alclometasona, algestona, amcinonida, beclometasona, betametasona, budesonida, cloroprednisona, clobetasol, clobetasona, clocortolona, cloprednol, corticosterona, cortisona, cortivazol, deflazacort, desonida, desoximetasona, dexametasona, diflorasona, diflucortolona, difluprednato, enoxolona, fluazacort, flucoronida, flumetasona, flunisolida, acetónido de flucinolona, flucocortolona, flucocortolona, fluorometolona, acetato de fluperolona, acetato de fluprednido, fluprednisolona, flurandrenolida, propionato de fluticasona, formocortal, halcinonida, propionato de halobetasol, halometasona, acetato de halopredona, hidrocortamato, hidrocortisona, etabonato de loteprednol, mazipredona, medrisona, meprednisona, metilprednisolona, mometasona furoato, parametasona, prednicarbato, prednisolona, 25-dietilaminoacetato de prednisolona, fosfato de prednisolona sodio, prednisona, prednival, prednidileno, rimexolona, tixocortol, triamcinolona, acetónido de triamcinolona, benetonido de triamcinolona, y hexacetónido de triamcinolona; somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®); un principio activo de molécula pequeña seleccionado entre TR2-01829 o 1,2-hidroxi-N-[3-(trifluorometil)fenil]benzamida (HS-Cf) o kartogenina a una célula o tejido que expresa proteoglicanos en la que el tejido es preferentemente tejido de cartílago, tejido neuronal, piel o tejido subcutáneo.
17. La composición de acuerdo con cualquiera de las reivindicaciones 1-10, en la que la composición comprende; un hidrogel;
 un hidrogel con péptido autoensamblado; o
 un hidrogel con péptido autoensamblado que comprende al menos uno o una combinación de péptidos seleccionada entre: RADARADARADARADA (SEQ ID NO: 77), KLDLKLKLDL (SEQ ID NO: 78) o AcN-KLDLKLKLDL-CNH2 (SEQ ID NO: 79).
18. La composición para su uso de acuerdo con las reivindicaciones 11 o 12, en la que el HB-X_n o (HB-enlazador)_n-X_n está presente en o dentro de un implante biológico que es un aloinjerto osteocondrial o del menisco.
19. Un vector que comprende un ácido nucleico que codifica al menos un péptido de unión a heparina (HB) seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21), KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3); o MKRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22); y que comprende opcionalmente al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un principio activo (X) seleccionado entre:
 factor de crecimiento nervioso (NGF); factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF); neurotrofina-3 (NT-3); neurotrofina-4 (NT-4); factor neurotrófico ciliar (CNTF); factor neurotrófico mesencefálico derivado de astrocitos (MANF); factor neurotrófico de dopamina conservado (CDNF); ligandos de la familia del factor neurotrófico derivado de la línea celular glial; factor neurotrófico derivado de la línea celular glial (GDNF); neurturina (NRTN); artemina (ARTN); persefina (PSPN); citoquinas neuropoyéticas seleccionadas de interleuquina-6, interleucina-11, interleucina-27, factor inhibidor de leucemia, factor neurotrófico ciliar, cardiotrofina 1, neuropoyetina, citoquina de tipo cardiotropina o factor 2 de crecimiento de fibroblastos; citoquinas antiinflamatorias seleccionadas entre receptor 2 de TNF, interleuquina-4 e interleuquina-10; neurregulina-1 y factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF); Cerebrolysin® (FPF-1070); factor 11 de diferenciación del crecimiento (GDF11); factor 1 de derivado de células del estroma (SDF-1); miostatina (factor 8 de diferenciación del crecimiento de fibroblastos (GDF8)); factor 1 de crecimiento de tipo insulina (IGF1); hormona paratiroidea (HPT); una porción de la PTH, seleccionada entre los restos de aminoácidos 1-31, 1-34 (TM Forte®), 1, -37, 1-38, 1-44, o 1-84 de la PTH madura; péptido relacionado con la hormona paratiroidea (PTHrP) o un análogo de la PTHrP que tiene la secuencia (AVSEHQLLHDKGKSIQDLRRELLEKLLNKLHTA, donde N es Aib (ácido 2-aminoisobutírico) (SEQ ID NO: 39), antagonista del receptor de la interleuquina 1 (IL-1RA); quimeras IL-1/IL-1 RA; factor 18 de crecimiento de fibroblastos (FGF-18); proteína del grupo 2 de alta movilidad (HMG-2); un anticuerpo terapéutico seleccionado entre Remicade® (infiximab, anti-TNF-a), Humira® (adalimumab, anti-TNF), ENBREL® (etanercept, proteína recombinante anti-TNF); un anticuerpo dirigido contra el factor de crecimiento nervioso; factor 9 de crecimiento de fibroblastos (FGF-9); factor de crecimiento de hepatocitos; proteínas de la superfamilia de TGF-beta seleccionadas entre TGF, TGF3, BMP2, o BMP7; análogo de angiopoyetina 3 (ANGPTL3); somatostatina (SST) o un análogo de la misma seleccionado entre las moléculas pequeñas (nombre comercial SANDOSTATIN®), pasireotida (SOM230, nombre comercial SIGNIFOR®), lanreotida (nombre comercial: SOMATULINE®), o que comprende opcionalmente al menos una secuencia de ácido nucleico que codifica al menos un enlazador.
20. El vector de la reivindicación 19, en el que la secuencia de ácidos nucleicos codifica al menos un HB-X_n o proteína de fusión X_n-HB_n, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:2), MKRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:21), KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:3) o KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:22); X es un principio activo, y n es un número entero de al menos 1; o al menos un (HB-enlazador)_n-X_n o al menos una proteína de fusión X_n-(HB-enlazador)_n, o al menos un (HB-enlazador)_n-X_m-(HB-enlazador) o proteína de fusión, en la que HB es un péptido de unión a heparina seleccionado entre KRKKKGKGLGKKRDPKLRKYK (SEQ ID NO:2), o KRKKKGKGLGKKRDPRLRKYK (SEQ ID NO:3); X es un principio activo, en la que m es un número entero de al

menos 1 y $n + o$ es un número entero de al menos 1.

21. El vector de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 20, en el que la secuencia de ácidos nucleicos que codifica el X o enlazador está;

- 5 en la posición 5' del ácido nucleico que codifica HB o
 en la posición 3' del ácido nucleico que codifica HB.

22. Una línea celular que comprende el vector de cualquiera de las reivindicaciones 19 a 21.

FIG. 1

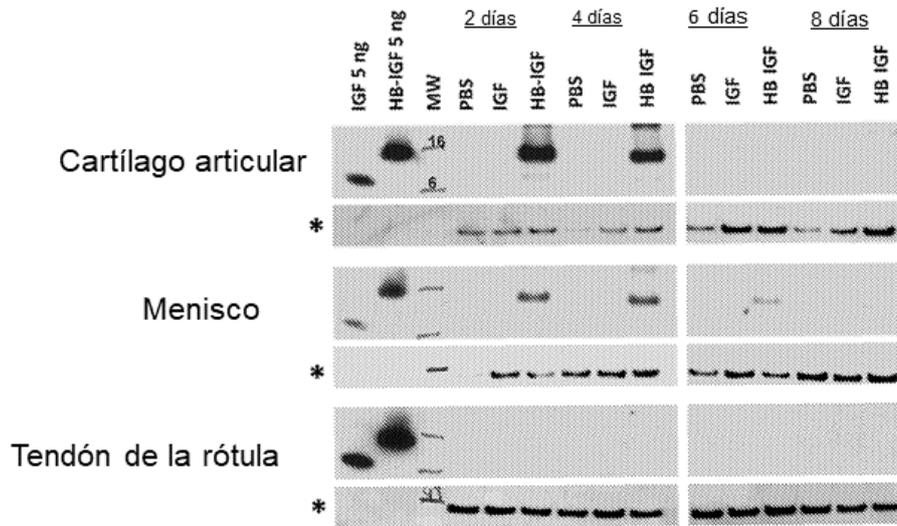


FIG. 2

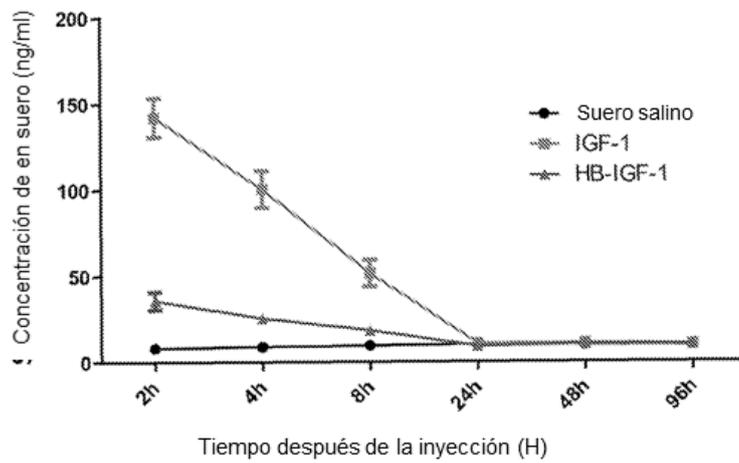


FIG. 3

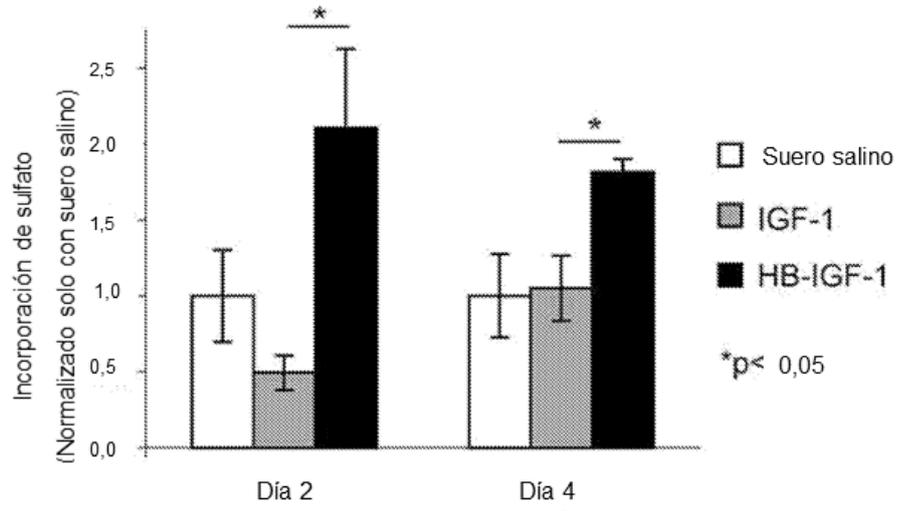


FIG. 4

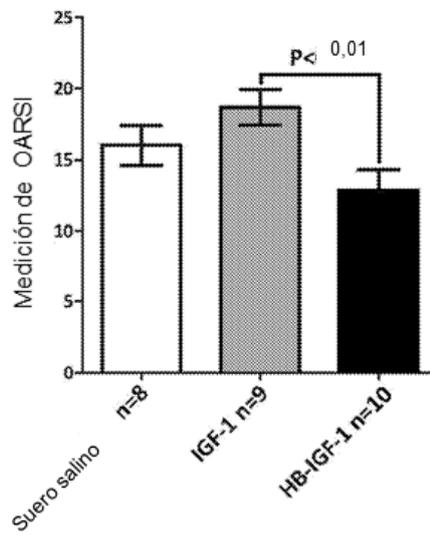
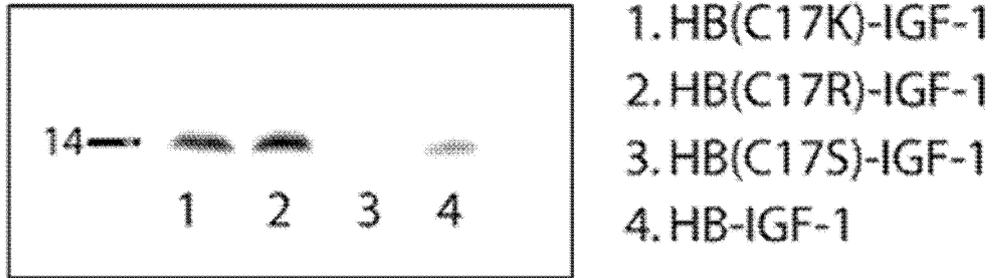


FIG. 5



Expresión de las variantes de HB-IGF-1 en los extractos de detergente

FIG. 6

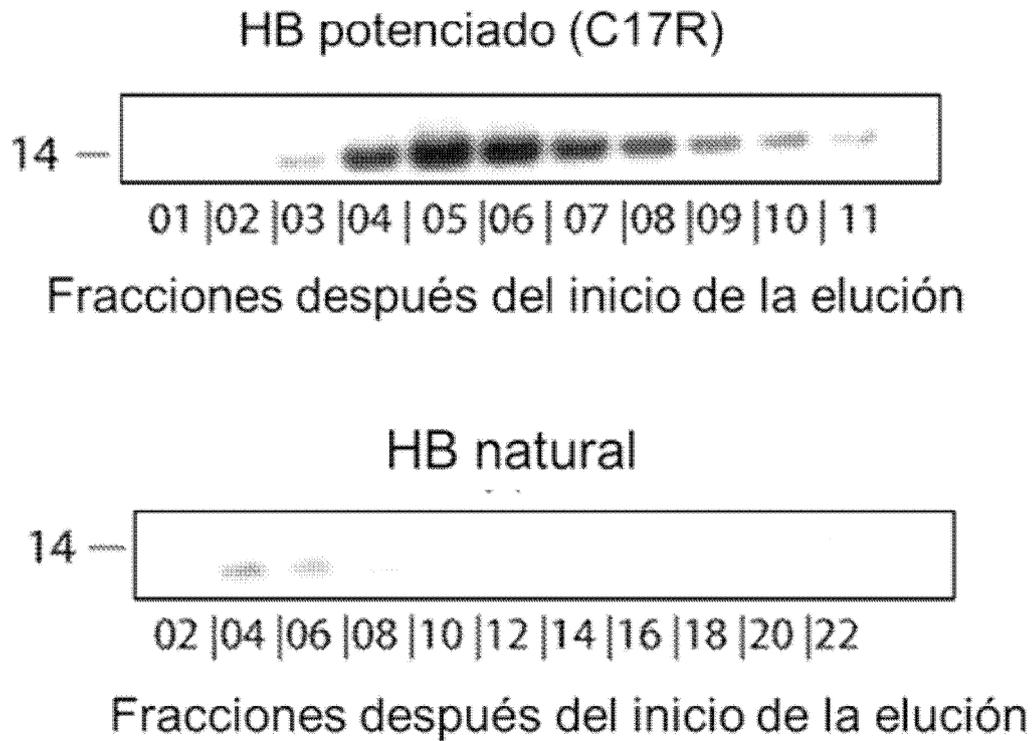


FIG. 7

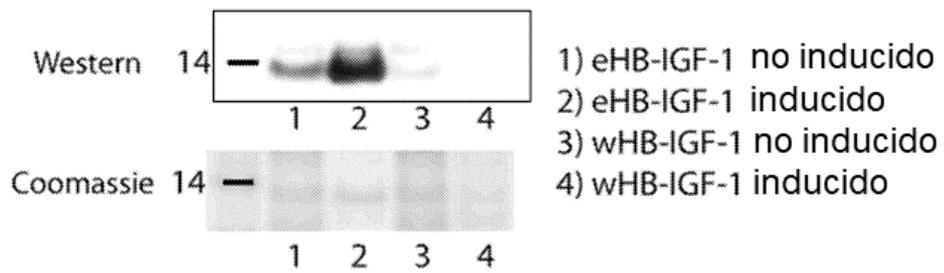


FIG. 8

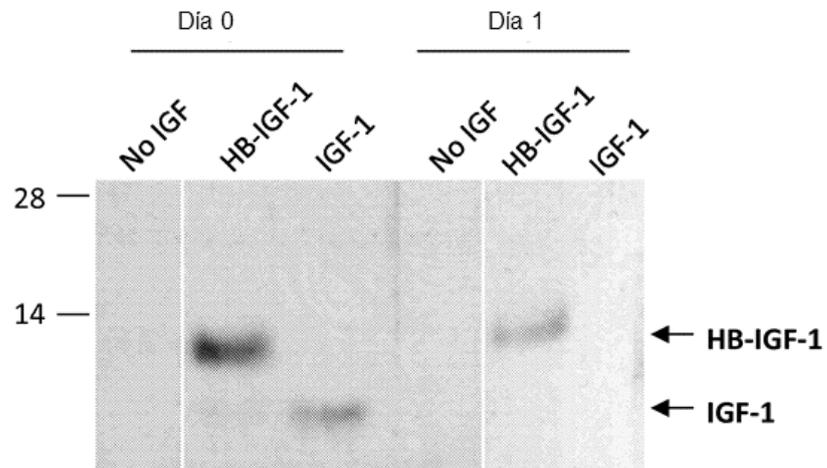


FIG. 9A

Patrón de péptido

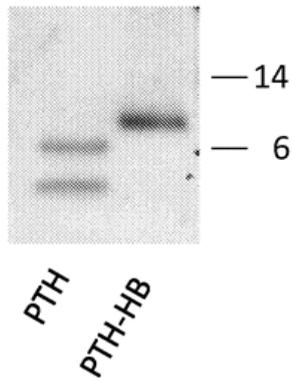


FIG. 9B

Remanente en el cartílago
después de dos días sin PHT

