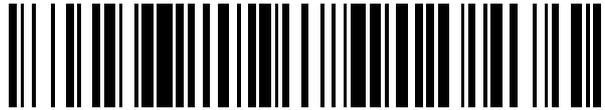


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 654 111**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

A61K 38/40 (2006.01)

A61K 38/00 (2006.01)

A61K 39/44 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **03.08.2012 PCT/US2012/049475**

87 Fecha y número de publicación internacional: **14.02.2013 WO13022738**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **03.08.2012 E 12746240 (6)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **27.09.2017 EP 2739649**

54 Título: **Fragmentos p97 con actividad de transferencia**

30 Prioridad:

05.08.2011 US 201161515792 P

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

12.02.2018

73 Titular/es:

**BIOASIS TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
130-10691 Shellbridge Way
Richmond, BC V6X 2W8, CA**

72 Inventor/es:

**JEFFERIES, WILFRED;
TIAN, MEI MEI y
VITALIS, TIMOTHY**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 654 111 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

Fragmentos p97 con actividad de transferencia

5 Antecedentes**Campo de la técnica**

10 La presente invención se refiere a fragmentos de la melanotransferrina humana (p97). En particular, la presente invención se refiere al tratamiento de enfermedades mediante la introducción del fragmento de melanotransferrina conjugado con un agente terapéutico o diagnóstico en un sujeto.

Descripción de la técnica relacionada

15 La melanotransferrina (MTf) es una proteína bi-lobulada que pertenece a la familia de la transferrina (Tf) de proteínas de unión al hierro. Se había demostrado previamente que la MTf es capaz de unirse directamente y transportar hierro en las células de mamífero independiente de Tf y receptor de Tf (TfR). A diferencia de otros miembros de la familia Tf, esta molécula existe en dos formas en los seres humanos, una forma de superficie celular unido al glicosil-fosfatidilinositol (GPI) y una forma hidrosoluble secretada. De manera adicional, también se ha
20 descubierto que la MTf se expresa en el endotelio cerebral humano donde se ha hecho la hipótesis de que transporta hierro a través de la barrera hematoencefálica (BBB). El papel de la MTf en la transferencia de hierro en el cerebro se evaluó siguiendo tanto la MTf como la Tf solubles radiomarcadas en el cerebro del ratón durante un periodo de 24 horas (Moroo et al., 2003, Demeule et al., 2002). Se determinó que la MTf soluble tiene la capacidad para hacer transcitosis a través de la barrera hematoencefálica (BBB) y este transporte era más eficaz que el de la Tf.

Posteriormente, se había demostrado que la MTf soluble se podía utilizar como un vehículo de suministro de agentes terapéuticos en el cerebro (Karkan et al., 2008). Los estudios farmacocinéticos de la MTf soluble demostraban que el aclaramiento de MTf del suero era mucho mayor que el de la IgG de control, y se distribuía
30 rápidamente en los tejidos con respecto a la IgG de control. El transporte de la MTf soluble en el cerebro como un porcentaje de la dosis inyectada era significativamente mayor que la IgG durante la primera hora después de la inyección. Se descubrió que la acumulación de MTf soluble en el cerebro que era significativamente mayor que la de la IgG durante las primeras 6 horas después de la inyección.

35 Además, se ha demostrado que la MTf soluble es capaz de suministrar hierro a través de la BBB (Moroo et al., 2003), así como el paclitaxel unido covalentemente a MTf (Karkan et al., 2008). En el mismo estudio, aunque la adriamicina libre y los conjugados MTf-adriamicina eran capaces de inhibir igualmente el crecimiento subcutáneo de gliomas fuera del cerebro, solamente los conjugados MTf-adriamicina prolongaban significativamente la supervivencia de animales que albergan gliomas intracraneales cuando se compara con la adriamicina libre de
40 control (Karkan et al., 2008). En conjunto, estos datos sugieren que la MTf soluble es una herramienta de suministro de fármacos potencial.

Sin embargo, una molécula de transferencia más eficaz para el suministro de un agente diana sería útil para fines terapéuticos y diagnósticos. La presente invención afronta estas y otras necesidades

45 <Yang et al, Protein Expression And Purification, v34, nº 1, pp. 28-48, 2004 desvela fragmentos de la proteína p97. El documento WO 03/009815 desvela la captación de p97 en astrocitos y astrocitomas. El documento WO 02/13873 desvela la p97 unida covalentemente a adriamicina.>

50 Breve resumen

La invención se define en las reivindicaciones.

55 La presente invención incluye polipéptidos de la p97 (melanotransferrina; MTf) aislados que consisten en las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NO: 1-8 o 9. también se incluyen composiciones que comprenden un fragmento de p97 que consiste esencialmente en las SEQ ID NO: 1-8 o 9 y un agente terapéutico o diagnóstico.

60 El polipéptido p97 se puede marcar con un marcador seleccionado de entre el grupo que consiste en moléculas fluorescentes, moléculas luminiscentes, enzimas, sustancias que tienen actividad terapéutica, toxinas, y radionúclidos. El polipéptido p97 se conjuga con un agente terapéutico o un fármaco.

65 Las composiciones farmacéuticas pueden comprender una cantidad eficaz de compuesto que comprende un fragmento p97 unido covalentemente a un agente terapéutico y un excipiente farmacéuticamente aceptable, en el que el fragmento p97 consiste en las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NO: 1-8 o 9.

También se incluyen composiciones para el suministro de un agente a través de la barrera hematoencefálica que comprende un fragmento p97 conjugado con el agente, una sustancia que es capaz de unirse específicamente a la p97 conjugado con el agente, o una proteína de fusión del fragmento p97 que contiene el fragmento p97 fusionado con el agente, y un vehículo o diluyente farmacéuticamente aceptable, en el que el fragmento p97 consiste en las secuencias de aminoácidos que se exponen en SEQ ID NO: 1-8 o 9.

La invención se refiere a conjugados, que comprenden un polipéptido p97 que consiste o consiste esencialmente en las SEQ ID NO: 1, 5 o 6, en el que el polipéptido p97 está unido covalente u operativamente a un agente, para formar un conjugado agente-p97. En algunas realizaciones, el agente es una molécula pequeña, un polipéptido, o un marcador (es decir, una entidad detectable).

En realizaciones particulares, la molécula pequeña es un agente citotóxico o quimioterápico o anti-angiogénico seleccionado de entre uno o más de agentes alquilantes, anti-metabolitos, antraciclinas, antibióticos anti-tumorales, platinos, inhibidores de la topoisomerasa tipo I, inhibidores de la topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca, y taxanos. En realizaciones específicas, la molécula pequeña se selecciona de entre uno o más de clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalan, procarbacin, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfan, daunorrubicina, doxorrubicina, gefitinib, erlotinib idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecina, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus, everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, paclitaxel, imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudil, SB-681323, semaxanib, donapizil, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasigilina, naltrexona, lubiprostona, safinamida, istradefilina, pimavanserin, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina, bexaroteno, acetato de glatirimer, fingolimod, y mitoxantrona, incluyendo sales y ácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

En algunas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo. En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo se une específicamente a uno o más de Her2/neu, Her1/EGFR, CD20, VEGF, CD52, CD33, CTLA-4, tenascina, alfa-4 (a4) integrina, IL-23, amiloidep, Huntington, CD25, factor de crecimiento nervioso (NGF), TrkA, TNF-a, TNF-p, o a-sinucleína humanos, entre otras dianas descritas en el presente documento.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo se selecciona de entre uno o más de trastuzumab, cetuximab, daclizumab, tanezumab, 3F8, abagovomab, adalimumab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatumab (mertansina), brentuximab vedotina, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, certolizumab, citatuzumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetan), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecromeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatumumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etanercept, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicin), girentuximab, glebatumumab (vedotin), golimumab, ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, infliximab, intetumumab, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetuzumab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radioactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, tucotuzumab (celmoleucina), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab, y zalutumumab, entre otros anticuerpos descritos en el presente documento, e incluyen fragmentos de unión al antígeno de los mismos.

En algunas realizaciones, el polipéptido es un polipéptido interferón- β , o un fragmento activo o variante del mismo.

En realizaciones adicionales, el polipéptido se asocia con una enfermedad de almacenamiento lisosómico. En algunos aspectos, el polipéptido se selecciona de entre uno o más de aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, α -galactosidasa A, ceramidasa ácida, α -L-fucosidasa, β -hexosaminidasa A, activador de gangliósido GM2 (GM2A), α -D-manosidasa, β -D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, α -N-acetilglucosaminidasa, fosfotransferasa, subunidad- γ de fosfotransferasa, L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparano-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetilCoA; N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, catepsina A, catepsina K, α -galactosidasa B, NPC1, NPC2, sialina, y transportador de ácido siálico, incluyendo fragmentos activos y variantes de los mismos.

En realizaciones particulares, la entidad detectable se selecciona de entre uno o más de ácido diatrizoico, un radioisótopo, un fluoróforo/colorante fluorescente, y una nanopartícula.

En algunas realizaciones, el agente es un agente cardiotoxico en su forma no conjugada. Ejemplos particulares incluyen en los que el agente cardiotoxico es una antraciclina/antraquinolona, ciclofosfamida, antimetabolitos, un agente antimicrotubular, inhibidor de tirosina cinasa, bevacizumab, o trastuzumab. Los ejemplos adicionales incluyen en los que el agente cardiotoxico es ciclofentil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docetaxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfan, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido arsénico, metotrexato, rosiglitazona, o mitoxantrona.

5 Se desvelan composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas), que comprenden un conjugado descrito en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

También se desvelan métodos de tratamiento de un sujeto que necesita el mismo, que comprende la administración al sujeto de un conjugado o composición descrita en el presente documento.

15 Algunos métodos son para el tratamiento de un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente del cerebro. Los métodos particulares son para el tratamiento de un cáncer primario del SNC, opcionalmente del cerebro. Los métodos específicos son para el tratamiento de un cáncer metastático en el SNC, opcionalmente del cerebro. En algunas realizaciones, los métodos son para el tratamiento de un glioma, meningioma, adenoma de pituitaria, schwannoma vestibular, linfoma primario del SNC, neuroblastoma, o tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma). En ciertos aspectos, el glioma es un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, o un papiloma del plexo coroideo.

Los métodos particulares son para el tratamiento de glioblastoma multiforme. En aspectos específicos, el glioblastoma multiforme es un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma. Ciertos métodos son para el tratamiento de una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico a modo de ejemplo incluyen las que se seleccionan de entre una o más de aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia celular globoide, enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glicógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis –GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis-GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis- GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α-manosidosis tipos I/II, β-manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolisacárido tipo I, sialidosis tipos I/II, mucopolisacárido tipo II/III, enfermedad celular-I, mucopolisacárido tipo IIIC, ploidistrofia pseudo-Hurler, mucopolisacárido tipo I, mucopolisacárido tipo II (síndrome de Hunter), mucopolisacárido tipo IIID, mucopolisacárido tipo IV A, síndrome de Morquio, mucopolisacárido tipo IV B, mucopolisacárido tipo VI, mucopolisacárido tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacárido tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipo NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler, y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico.

40 Ciertos métodos son para el tratamiento de un trastorno autoinmunitario o degenerativo del sistema nervioso central (SNC). En algunos métodos, el trastorno autoinmunitario del SNC es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, o esclerosis múltiple (MS).

45 En algunos métodos, el sujeto se somete a terapia con un agente de otra manera cardiotoxico. Agentes cardiotoxicos a modo de ejemplo incluyen antraciclinas/antraquinonas, ciclofosfamidias, antimetabolitos, agentes antimicrotubulares, inhibidores de la tirosina cinasa, bevacizumab, y trastuzumab. En algunos aspectos, el agente cardiotoxico es ciclofentil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docetaxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfan, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona, o mitoxantrona.

55 En alguno de los métodos proporcionados en el presente documento, el sujeto tiene un cáncer. En realizaciones particulares, el cáncer es uno o más de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, cáncer del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, un tumor epitelial, cáncer de huesos, o un cáncer hematopoyético.

60 En algunos métodos, la administración del conjugado reduce la cardiotoxicidad del agente, con respecto a una forma no conjugada del agente.

65 En ciertos aspectos, los métodos son para el tratamiento del dolor. En algunos métodos el dolor es un dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático, y/o dolor central. En realizaciones particulares, el dolor es un dolor nociceptivo, opcionalmente visceral, somático profundo, o dolor somático superficial. En algunos métodos, el dolor es irruptivo, y en el que el sujeto está tomando medicación para el dolor, y es opcionalmente un sujeto con dolor por el cáncer. En métodos adicionales, el dolor es un dolor incisivo. En ciertos métodos, el dolor tiene un componente del sistema

nervioso central (SNC). En realizaciones particulares, el dolor es de osteoartritis, dolor lumbar crónico, dolor de cáncer de huesos o de cistitis intersticial. En métodos específicos, la osteoartritis es la osteoartritis de la rodilla o de la cadera.

5 También se incluyen métodos para la formación de imágenes de un órgano o componente tisular en un sujeto, que comprende (a) la administración al sujeto de un fragmento de polipéptido p97 humano de SEQ ID NO: 1-8 o 9, en el que el polipéptido se conjuga con una entidad detectable, y (b) visualizar la entidad detectable en el sujeto. En algunos métodos, el órgano o compartimento tisular comprende el sistema nervioso central. En métodos
10 particulares, en los que el órgano o el compartimento tisular comprende el cerebro. En ciertos aspectos, la visualización de una entidad detectable comprende uno o más de fluoroscopia, radiografía proyeccional, rayos X, exploración CT, tomografía de emisión de positrones (PET), tomografía computarizada de emisión de único fotón (SPECT), o creación de imágenes por resonancia magnética (MRI).

Breve descripción de las varias perspectivas de los dibujos

15 La Figura 1 muestra el alineamiento de la secuencia proteica de la p97 soluble humana (H; SEQ ID NO: 12) y la p97 soluble de ratón (M; SEQ ID NO: 13). La región ligeramente sombreada representa la secuencia de aminoácidos de un fragmento de p97 humano soluble (SEQ ID NO: 1; o los restos 1-564 de SEQ ID NO: 12).
20 La Figura 2 muestra un gel PAGE nativo teñido con azul de Coomassie. Se digirió la p97 humana durante 3 días a 42 °C. La calle 1 es la p97 humana, las calles 2 y 3 son la p97 humana (3 mg) digerida con hidroxilamina, y la calle 4 es la p97 humana (5 mg) digerida con hidroxilamina.
La Figura 3 es una transferencia que muestra el fragmento de p97 humana yodado (60 kDa).
La Figura 4 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de fragmento p97 radiomarcado con ¹²⁵I presente en el suero después del suministro en los ratones mediante inyección en la vena caudal.
25 La Figura 5 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis de fragmento p97 inyectada normalizada a la masa corporal (%ID/g BM) presente en el cerebro a lo largo del tiempo.
La Figura 6 es un gráfico lineal que muestra la relación entre los recuentos radioactivos (CPM) en un gramo de tejido con respecto a un microlitro de suero (Vd) en el cerebro a lo largo del tiempo.
30 La Figura 7 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el cerebro durante 24 horas.
La Figura 8 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el cerebro con respecto al suero durante 24 horas.
La Figura 9 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el corazón durante 24 horas.
35 La Figura 10 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el corazón con respecto al suero durante 24 horas.
La Figura 11 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el hígado durante 24 horas.
La Figura 12 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el hígado con respecto al suero durante 24 horas.
40 La Figura 13 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el riñón durante 24 horas.
La Figura 14 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el riñón con respecto al suero durante 24 horas.
45 La Figura 15 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el pulmón durante 24 horas.
La Figura 16 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el pulmón con respecto al suero durante 24 horas.
50 La Figura 17 es un gráfico lineal que muestra el porcentaje de la dosis inyectada de fragmento de p97 en el bazo durante 24 horas.
La Figura 18 es un gráfico lineal que muestra la relación entre el fragmento de p97 presente en el bazo con respecto al suero durante 24 horas.

Descripción detallada

55 La presente divulgación se basa, en una parte pertinente, en el sorprendente descubrimiento de que las versiones más pequeñas de la MTf humana son capaces de mantener la capacidad de la melano transferrina (MTf; p97) para atravesar la barrera hematoencefálica (BBB). En particular, la presente invención se refiere a los fragmentos de la MTf humana que se expone en las SEQ ID NO: 1, 5 y 6 (véase también la Figura 1). Las realizaciones de la
60 divulgación se refieren al uso del fragmento de p97 para el diagnóstico, valoración y tratamiento de enfermedades y trastornos, que incluyen, por ejemplo, afecciones que implican alteraciones del metabolismo del hierro, enfermedad de Alzheimer, cánceres y enfermedades de almacenamiento lisosómico, entre otras. En realizaciones específicas, la invención se refiere a un fragmento de p97 conjugado con un agente terapéutico o diagnóstico.

65 Como se utiliza en la presente memoria descriptiva y las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares de “uno”, “una” y “el” incluye las referencias en plural a menos de que el contenido dicte claramente otra cosa. Por

“aproximadamente” se quiere decir una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud que varía como mucho un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % con respecto a una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia. Por “que consiste en” se quiere decir que incluye, y se limita a, cualquiera que sea la frase siguiente “que consiste en”. Por lo tanto, la frase “que consiste en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, y que no pueden estar presentes otros elementos. Por “que consiste esencialmente en” se quiere decir que incluyen cualquiera de los elementos enumerados después de la frase, y se limitan a otros elementos que no interfieren o contribuyen a la actividad o acción especificada en la divulgación para los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase “que consiste esencialmente en” indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden estar presentes o no dependiendo de si afectan materialmente o no a la actividad o acción de los elementos enumerados. Para ciertas secuencias de polipéptido, la frase “que consiste esencialmente en” se puede referir a polipéptidos de esencialmente la misma longitud que la secuencia de polipéptido mencionada, incluyendo las que se diferencian por la adición o eliminación de aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 restos del extremo N y/o el extremo C.

El término “conjugado” tiene la intención de referirse a la entidad formada como resultado de una unión o anclaje de un agente u otra molécula, por ejemplo, una molécula biológicamente activa, a un polipéptido p97. Un ejemplo de un polipéptido conjugado es una “proteína de fusión” o “polipéptido de fusión”, es decir, un polipéptido que se crea mediante la unión de dos o más secuencias codificantes, que originalmente codifican polipéptidos distintos; la traducción de las secuencias codificantes unidas da como resultado un único, polipéptido de unión, normalmente con propiedades funcionales derivados de cada uno de los diferentes polipéptidos.

Como se utiliza en el presente documento, los términos “función” y “funcional” y similares se refieren a una función biológica, enzimática, o terapéutica.

“Homología” se refiere al número en porcentaje de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservadoras. La homología se puede determinar utilizando programas de comparación de secuencias tales como GAP (Deveraux et al., Nucleic Acids Research. 12, 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de longitud similar o sustancialmente diferentes a las citadas en el presente documento se podrían comparar por inserción de huecos en el alineamiento, dichos gaps se determinan, por ejemplo, por el algoritmo de comparación que utiliza GAP.

Por “aislado” se quiere decir el material que está sustancial o esencialmente libre de los componentes que normalmente lo acompañan en su estado nativo. Por ejemplo, un “péptido aislado” o un “polipéptido aislado” y similares, como se utiliza en el presente documento, incluye el aislamiento *in vitro* y/o purificación de una molécula de péptido o polipéptido de su ambiente celular natural, y de su asociación con otros componentes de la célula; es decir, no está significativamente asociado con sustancias *in vivo*.

El término “unión”, “enlazador”, “resto enlazador” o “L” se utiliza en el presente documento para referirse a un enlazador que se puede utilizar para separar un fragmento del polipéptido p97 de un agente de interés, o para separar un primer agente de otro agente, por ejemplo cuando dos o más agentes están unidos para formar un conjugado p97. El enlazador puede ser estable fisiológicamente o puede incluir un enlazador liberable tal como un enlazador degradable enzimáticamente (por ejemplo, enlazadores escindibles proteolíticamente). En ciertos aspectos, el enlazador puede ser un enlazador peptídico, por ejemplo, como parte de una proteína de fusión p97. En algunos aspectos, el enlazador puede ser un enlazador no peptídico o un enlazador no proteináceo. En algunos aspectos, el enlazador puede ser una partícula, tal como una nanopartícula.

Las expresiones “que modula” y “que altera” incluyen “que aumenta”, “que incrementa” o “que estimula” así como “que disminuye” o “que reduce”, normalmente en una cantidad o grado estadísticamente significativos o fisiológicamente significativos con respecto a un control. Una cantidad “aumentada”, “estimulada”, o “incrementada” normalmente es una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir un aumento de 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (por ejemplo 500, 1000 veces) (incluyendo todos los enteros y puntos decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por no composición (por ejemplo, la ausencia de polipéptido o conjugado de la invención) o una composición, muestra o sujeto de ensayo de control. Una cantidad “disminuida” o “reducida” es normalmente una cantidad “estadísticamente significativa”, y puede incluir una disminución de un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % en la cantidad producida por una no composición o una composición de control, que incluye todos los enteros entre ellos. Como un ejemplo no limitante, un control podría comparar la actividad, tal como la cantidad o tasa de transporte/suministro a través de la barrera hematoencefálica, la tasa y/o niveles de distribución en el tejido del sistema nervioso central, y/o la $C_{máx}$ para el plasma, tejidos del sistema nervioso central, o cualquiera de otros tejidos sistémicos o periféricos del sistema nervioso no central, de un conjugado p97-agente con respecto al agente solo. Otros ejemplos de comparaciones y cantidades “estadísticamente significativas” se describen en el presente documento.

En ciertas realizaciones, la “pureza” de un agente determinado (por ejemplo, un polipéptido p97, un conjugado) en una composición se puede definir específicamente. Por ejemplo, ciertas composiciones pueden comprender un

agente que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % puro, incluyendo todos los decimales entre ellos, como se mide, por ejemplo y sin significar limitación, por cromatografía líquida de alta presión (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía en columna que se utiliza frecuentemente en bioquímica y química analítica, para separar, identificar y cuantificar compuestos.

5 Los términos “polipéptido” y “proteína” se utilizan de manera intercambiable en el presente documento para referirse a un polímero de restos de aminoácidos y a variantes y análogos sintéticos de los mismos. Por lo tanto, estos términos se aplican a polímeros de aminoácidos en los que uno o más restos de aminoácidos son aminoácidos sintéticos no de origen natural, tales como un análogo químico de un aminoácido de origen natural correspondiente, así como a polímeros de aminoácidos de origen natural. Los polipéptidos descritos en el presente documento no se limitan a una longitud específica del producto; por lo tanto, los péptidos, oligopéptidos, y proteínas se incluyen en la definición de polipéptido, y dichos términos se pueden utilizar de manera intercambiable en el presente documento a menos de que se indique específicamente otra cosa. Los polipéptidos descritos en el presente documento también pueden comprender modificaciones después de la expresión, tales como glicosilaciones, acetilaciones, fosforilaciones, y similares, así como otras modificaciones conocidas en la técnica, tanto de origen natural como no natural. Un polipéptido puede ser una proteína completa, o una subsecuencia, fragmento, variante, o derivado de la misma.

20 Un enlace “fisiológicamente escindible” o “hidrolizable” o “degradable” es un enlace que reacciona con agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia a hidrolizarse de un enlace en agua dependerá no solamente del tipo de enlace general que conecta dos átomos centrales, sino también de los sustituyentes unidos a esos átomos centrales. Los enlaces inestables hidrolíticamente apropiados o débiles incluyen, pero no se limitan a: éster carboxilato, éster fosfato, anhídrido, acetal, cetel, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, tioéster, carbonato, e hidrazona, peptídicos y oligonucleotídicos.

25 Un “enlazador liberable” incluye, pero no se limita a, un enlazador escindible fisiológicamente y un enlazador enzimáticamente degradable. Por lo tanto, un “enlazador liberable” es un enlazador que puede sufrir una hidrólisis espontánea, o una escisión por cualquier otro mecanismo (por ejemplo, catalizada por una enzima, catalizada por un ácido, catalizada por una base, y etc.) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, un “enlazador liberable” puede implicar una reacción de eliminación que tiene una abstracción básica de un protón (por ejemplo, un átomo de hidrógeno ionizable, H_a), como la fuerza directora. Para los fines del presente documento un “enlazador liberable” es sinónimo de un “enlazador degradable”. Un “enlazador degradable enzimáticamente” incluye un enlace, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos, que es el sujeto de la degradación por una o más enzimas, por ejemplo, peptidasas o proteasas. En realizaciones p articulares, un enlazador liberable tiene una semivida a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, un pH fisiológico, temperatura corporal humana (por ejemplo, *in vivo*), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas, o aproximadamente 96 horas o menos.

40 La expresión “secuencia de referencia” se refiere en general a una secuencia codificante de ácido nucleico, o una secuencia de aminoácidos, con la que se va a comparar otra secuencia. Todas las secuencias de polipéptido y polinucleótido descritas en el presente documento se incluyen como secuencias de referencia, incluyendo las descritas por su nombre y las descritas en el listado de secuencias.

45 La expresión “identidad de secuencia” o, por ejemplo, que comprende una “secuencia un 50 % idéntica a”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a la extensión en que las secuencias son idénticas basándose en nucleótido a nucleótido o basándose en aminoácido por aminoácido en una ventana de comparación. Por lo tanto, un “porcentaje de identidad de secuencia” se puede calcular comparando dos secuencias alineadas óptimamente en una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en el cual la base de ácido nucleico (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gin, Cys y Met) se encuentran en ambas secuencias para dar lugar al número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes por el número total de posiciones de la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana), y multiplicando el resultado por 100 para dar lugar al porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia que se describen en el presente documento (véase, por ejemplo, el Listado de Secuencias), normalmente cuando la variante polipeptídica mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

60 Las expresiones que se utilizan para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen “secuencia de referencia”, “ventana de comparación”, “identidad de secuencia”, “porcentaje de identidad de secuencia” y “identidad sustancial”. Una “secuencia de referencia” tiene al menos 12 pero frecuentemente 15 a 18 y a menudo al menos 25 unidades monoméricas, incluyendo nucleótidos y restos de aminoácidos, de longitud. Debido que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia del polinucleótido completo) que sea similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una

secuencia que sea divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencia entre dos (o más) polinucleótidos se llevan a cabo comparando las secuencias de los dos polinucleótidos en una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente aproximadamente 40 a 5 aproximadamente 100, más habitualmente aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en la que la secuencia se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas después de alinearse óptimamente las dos secuencias. La ventana de comparación puede comprender adiciones o eliminaciones (es decir, huecos) de aproximadamente un 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o eliminaciones) para el alineamiento óptimo de las dos secuencias. El alineamiento óptimo de las secuencias para el alineamiento de una ventana de comparación se puede llevar a cabo por implementaciones de algoritmos computarizados (GAP, BESTFIT, FASTA, y TFASTA en el Paquete de Software de Wisconsin Genetics Edición 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, USA) o por inspección y el mejor alineamiento (es decir, el que resulta del mayor porcentaje de homología en la ventana de comparación) generado por cualquiera de los distintos métodos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como por ejemplo los que se desvelan en Altschul et al., Nucl. Acids Res. 25:3389, 1997. Una exposición detallada del análisis de secuencia se puede encontrar en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology," John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Por "estadísticamente significativo" se quiere decir que el resultado es improbable que ocurra por casualidad. La significación estadística se puede determinar por cualquier método conocido en la técnica. Las medidas utilizadas comúnmente de significación incluyen el valor p, que es la frecuencia o probabilidad con la que se produciría un evento observado, si la hipótesis nula fuera verdad. Si el valor obtenido es menor que el nivel de significación, entonces la hipótesis nula es rechazada. En casos simples, el nivel de significación se define como un valor de p de 0,05 o menos.

El término "solubilidad" se refiere a la propiedad de un fragmento del polipéptido p97 o un conjugado para disolverse en un disolvente líquido y formar una solución homogénea. La solubilidad se expresa normalmente como una concentración sea por peso del soluto por unidad de volumen del disolvente (g de soluto por kg de disolvente, g por dl (100 ml), mg/ml, etc.), molaridad, molalidad, fracción molar u otras descripciones similares de concentración. La cantidad de equilibrio máximo de soluto que se puede disolver por cantidad de disolvente es la solubilidad de ese soluto en ese disolvente en las condiciones especificadas, incluyendo temperatura, presión, pH y la naturaleza del disolvente. En ciertas realizaciones, la solubilidad se mide a pH fisiológico u otro pH, por ejemplo, a un pH 5,0, pH 6,0, pH 7,0, o pH 7,4. En ciertas realizaciones, la solubilidad se mide en agua o un tampón fisiológico tal como PBS o NaCl (con o sin NaP). En realizaciones específicas, la solubilidad se mide a un pH relativamente bajo (por ejemplo, un pH de 6,0) y sal relativamente más alta (por ejemplo, 500 mM de NaCl y 10 mM de NaP). En ciertas realizaciones, la solubilidad se mide en un fluido biológico (disolvente) tal como la sangre o el suero. En ciertas realizaciones la temperatura puede ser aproximadamente la temperatura ambiente (por ejemplo, aproximadamente 20, 21, 22, 23, 24, 25 °C) o aproximadamente la temperatura corporal (~ 37 °C). En ciertas realizaciones, un polipéptido o conjugado de p97 tiene una solubilidad de al menos aproximadamente 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, o 30 mg/ml a temperatura ambiente o a aproximadamente 37 °C.

Un "sujeto" como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier animal que presenta un síntoma. o tiene el riesgo de presentar un síntoma que se puede tratar o diagnosticar con un conjugado de p97 de la invención. Los sujetos (pacientes) adecuados incluyen animales de laboratorio (tales como ratón, rata, conejo o cobaya), animales de granja, y animales domésticos o mascotas (tales como perros y gatos). Se incluyen los primates no humanos y, preferentemente pacientes humanos.

"Sustancialmente" o "esencialmente" significa casi total o completamente, por ejemplo, un 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 % o más de una cantidad determinada.

"Sustancialmente libre" se refiere a la ausencia casi completa o completa de una cantidad determinada, por ejemplo, menos de aproximadamente un 10 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 %, 0,5 % o menos de una cantidad determinada. Por ejemplo, ciertas composiciones pueden estar "sustancialmente libres" de proteínas celulares, membranas, ácidos nucleicos, endotoxinas, u otros contaminantes.

"Tratamiento" o "tratar", como se utiliza en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o patología de una enfermedad o afección, y puede incluir incluso mínimos cambios o mejoras en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se va a tratar. "Tratamiento" o "tratar" no indica necesariamente la erradicación completa o la cura de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de las mismas. El sujeto que recibe este tratamiento es cualquier sujeto que necesita el mismo. Los marcadores a modo de ejemplo de la mejora clínica serán evidentes para los expertos en la técnica.

La expresión "de tipo silvestre" se refiere a un gen o producto genético que tiene las características de este gen o producto genético cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen o producto genético de tipo silvestre (por ejemplo un polipéptido) es el que se observa más frecuentemente en una población y por lo tanto se designa

arbitrariamente como la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a menos de que el contexto necesite otra cosa, la palabra "comprender", o variaciones tales como "comprende" o "que comprende", se entenderá que implica la inclusión de un elemento o número entero establecido o grupos de elementos o números enteros pero no la exclusión de cualquier otro elemento o número entero o grupo de elementos o números enteros.

Se pueden utilizar técnicas convencionales para el ADN recombinante, síntesis de oligonucleótido, y cultivo tisular y transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y técnicas de purificación se pueden llevar a cabo de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se consigue comúnmente en la técnica o como se describe en el presente documento. Estas y las técnicas y procedimientos relacionados se pueden llevar a cabo en general de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describen en distintas referencias generales y más específicas que se citan y exponen a lo largo de la presente memoria descriptiva. A menos de que se proporcionen definiciones específicas, la nomenclatura utilizada en conexión con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de biología molecular, química analítica, química orgánica sintética, y química medicinal y farmacéutica que se describen en el presente documento se conocen bien y se utilizan comúnmente en la técnica. Las técnicas convencionales se pueden utilizar para la tecnología recombinante, de biología molecular, microbiológica, síntesis química, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación, y suministro, y paciente de pacientes.

COMPOSICIONES Y PREPARACIÓN DE LAS MISMAS

En general los conjugados de un fragmento de p97 se puede preparar utilizando técnicas bien conocidas en la técnica. Existen numerosas estrategias para conjugación o entrecruzamiento químico de agentes para un polipéptido tal como el fragmento de p97, y un experto en la técnica puede determinar qué método es el más apropiado para conjugar un agente particular. El método empleado debe ser capaz de unir el agente con el fragmento p97 sin interferir con la capacidad del fragmento p97 para unirse a su receptor, preferentemente sin influenciar en la biodistribución del fragmento p97-agente en comparación con el fragmento p97 solo, y/o sin alterar significativamente la actividad deseada del agente (sea terapéutica o profiláctica o similar) una vez suministrado. Un método particularmente preferido para unir moléculas complejas al fragmento p97 es la reacción de unión cruzada SATA/sulfo-SMCC (Pierce (Rockford, IL)).

Los métodos para unir de manera cruzada las proteínas y péptidos son bien conocidos por los expertos en la técnica. Hay varios cientos de enlazadores de cruzamiento para conjugar un compuesto de interés al fragmento de p97 o con una sustancia que se une al fragmento p97 (véase, por ejemplo, Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking, Shans Wong, CRC Press, Ann Arbor (1991) y Patente de EE. UU. N° 5.981.194 y Publicaciones de Patente PCT N° WO 02/13843 y WO 01/59459). Se pueden utilizar muchos reactivos y enlazadores de cruzamiento para preparar conjugados de un agente activo y un fragmento de p97. Véase, por ejemplo, Hermanson, GT et al. Bioconjugate Techniques, Academic Press, (1996). El enlazador de cruzamiento se escoge en general basándose en los grupos funcionales reactivos disponibles o insertados en el agente terapéutico. Además, si no hay grupos reactivos, se puede utilizar un enlazador de cruzamiento fotoactivable. En ciertos casos, puede ser deseable incluir un espaciador entre el fragmento p97 y el agente. En una realización, el fragmento p97 y los agentes terapéuticos proteicos se pueden conjugar por la introducción de un grupo sulfhidrilo en el fragmento p97 y por la introducción de un enlazador de cruzamiento que contienen un grupo tiol reactivo en el compuesto proteico mediante grupos carboxílicos (Wawizynczak y Thorpe in Immunoconjugates: Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer, Vogel (Ed.) Oxford University Press, pp. 28-55 (1987); y Blair y Ghose (1983) J. Immunol. Methods 59:129). En algunas realizaciones, el enlazador es vulnerable a la hidrólisis al pH ácido del lisosoma de manera que se libera el agente del fragmento p97 y/o el enlazador.

En algunas realizaciones de la presente invención, el conjugado fragmento p97-agente es una proteína de fusión del fragmento p97. Las proteínas de fusión se pueden preparar utilizando técnicas convencionales conocidas en la técnica. Normalmente se une una molécula de ADN que codifica el fragmento p97 o una parte del mismo a una molécula de ADN que codifica el compuesto proteico. La construcción de ADN quimérico, junto con los elementos reguladores adecuados se puede clonar en un vector de expresión y se expresa en un huésped adecuado. Las proteínas de fusión resultantes contienen el fragmento p97 fusionado al compuesto proteico seleccionado.

Cuando se utiliza un enlazador, el enlazador es preferentemente un resto orgánico construido para que contenga una estructura alquilo, arilo, y/o aminoácido, y que contenga un enlace amida, éter, éster, hidrazona, disulfuro o cualquier combinación de los mismos. Los enlaces que contienen aminoácidos, éter y amida que unen los componentes son estables en condiciones de pH fisiológico normalmente 7,4 en el suero. Los enlaces preferidos son los que contienen ésteres o hidrazonas que son estables al pH del suero, pero que se hidrolizan para liberar el fármaco cuando se exponen a un pH lisosómico. Se prefieren los enlaces disulfuro debido a que son sensibles a la escisión reductora. Además, los enlazadores aminoacídicos se pueden diseñar para que sean sensibles a la escisión por enzimas específicas en el órgano diana deseado o más preferentemente, los propios lisosomas. Los enlazadores a modo de ejemplo se describen en Blattler et al. (19S5) Biochem. 24:1517-1524; King et al (1986) Biochem. 25:5774-5779; Srinivasachar y Nevill (1989) Biochem. 28:2501-2509.

En algunas realizaciones, el enlazador es un polietilenglicol o un polipropilenglicol. En otras realizaciones, el enlazador tiene desde 4 a 20 átomos de longitud. En otras realizaciones, el enlazador tiene desde 1 a 30 átomos de longitud con átomos en la cadena de carbono que se pueden sustituir por heteroátomos seleccionados independientemente de entre el grupo que consiste en O, N, o S. En algunas realizaciones, desde 1-4 o desde 5 a 15 de los átomos de C están sustituidos con un heteroátomo seleccionado independientemente de entre O, N, S. En otras realizaciones, el enlazador contiene un resto sometido a hidrólisis al suministrarlo en un ambiente lisosómico (por ejemplo, susceptibles a la hidrólisis al pH lisosómico o en contacto con una enzima lisosómica). En algunas realizaciones, el grupo enlazador es preferentemente hidrófilo para aumentar la solubilidad del conjugado en los fluidos corporales. En algunas realizaciones, el enlazador contiene o se une a la molécula del fragmento p97 o el agente proteico mediante un grupo funcional sometido al ataque de otras enzimas lisosómicas (por ejemplo, enzimas no deficientes en la diana lisosómica o una enzima lisosómica no conjugada al vehículo del fragmento p97). En algunas realizaciones, el fragmento p97 y el agente se une a un enlazador que comprende aminoácidos o péptidos, lípidos, o restos de azúcares. En algunas realizaciones el fragmento p97 y el agente se unen a grupos que se introducen sintéticamente o por modificaciones post-traduccionales.

En algunas realizaciones, los intermediarios agente-enlazador son similares a los que se habían descrito previamente, pero comprenden, por ejemplo, o un éster activo que puede reaccionar con grupos amina libres en el fragmento p97 o una maleimida que puede reaccionar con los tioles libres creados en el fragmento p97 mediante una reacción SATA o mediante otros grupos a la que los expertos en la técnica los pueden unir al fragmento p97.

Secuencias de p97

En algunas realizaciones, un polipéptido p97 comprende, consiste esencialmente, o consiste en al menos uno de los fragmentos de la p97 humana identificados en las SEQ ID NO: 1-8 o 9.

En otras realizaciones específicas, una secuencia polipeptídica de p97 comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad u homología, a lo largo de su longitud, con al menos uno de los fragmentos de p97 humana identificados en las SEQ ID NO: 1-8 o 9.

En realizaciones particular, el fragmento p97 o una variante del mismo tiene la capacidad de atravesar la BBB, y opcionalmente transporta un agente de interés a lo largo el BB y en el sistema nervioso central. En ciertas realizaciones, el fragmento p97 o una variante del mismo es capaz de unirse específicamente a un receptor de p97, un receptor LRP1, y/o un receptor LRP1B.

Preparación de p97

El fragmento p97 para su uso en los métodos y composiciones de la presente invención se puede obtener, aislar o preparar a partir de varias fuentes.

En un aspecto, se pueden utilizar técnicas de ADN recombinante para preparar el fragmento p97. En una realización, el ADN que codifica el fragmento p97 se puede obtener por amplificación mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) de la secuencia del fragmento p97 que se expone en las SEQ ID NO: 1-8 o 9 (véase en general, las Patentes de EE. UU. N° 4.683.202; 4.683.195; y 4.800.159; véase también, PCR Technology: Principles and Applications for DNA Amplification, Erlich (ed.), Stockton Press (1989)). En resumen, el ADN de doble cadena de las células que expresan el fragmento p97 (por ejemplo, células SK-MEL-28) se desnaturaliza por calor en presencia de la Taq polimerasa termoestable, secuencias de cebador específicas de ADN tales como 5' GCG-GACTTCCTCGG 3' (SEQ ID NO: 10) y 5' TCGCGAGCTTCCT 3' (SEQ ID NO: 11), ATP, CTP, GTP y TTP. Se produce ADN de doble cadena cuando se completa la síntesis. Este ciclo se puede repetir muchas veces, dando como resultado una amplificación factorial del fragmento de ADN de p97. El fragmento de ADN de p97 amplificado se puede insertar entonces fácilmente en un vector como se describe posteriormente.

DE manera alternativa, el ADN que codifica el fragmento p97 se puede aislar utilizando técnicas de clonación descritas por Brown et al. en la solicitud de patente del RU N° GB 2188 637.

Como se ha señalado anteriormente, la presente invención proporciona vectores de expresión recombinante que incluyen fragmentos de ADN sintéticos o derivados de ADNc que codifican el fragmento p97, que está unido operativamente a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales. Los elementos reguladores adecuados se pueden derivar de varias fuentes, incluyendo, pero si limitarse a, genes bacterianos, fúngicos, víricos, de mamífero y de insecto. La selección de los elementos reguladores apropiados depende de la célula huésped escogida, y se puede conseguir fácilmente por un experto en la técnica. Ejemplos de elementos reguladores incluyen, en particular, un promotor y un amplificador transcripcional o secuencia de unión a la ARN polimerasa, una secuencia de unión al ribosoma, incluyendo una señal de inicio de la traducción. De manera adicional, dependiendo de la célula huésped escogida y el vector empleado, se pueden incorporar otros elementos genéticos tales como un origen de replicación, sitios de restricción del ADN adicionales, amplificadores, secuencias que confieren una transcripción inducible y marcadores genéticos, en el vector de expresión.

Las secuencias de ADN que codifican el fragmento p97 se puede expresar mediante una amplia variedad de células huésped procariontas y eucariotas, incluyendo pero sin limitarse a, células bacterianas, de mamífero, de levaduras, fúngicas, víricas, vegetales y de insecto. Los métodos para transformar o transfectar dichas células para expresar un ADN ajeno son bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Itakura et al, Patente de EE. UU. N° 4.704.362; Hinnen et al. (1978) PNAS USA 75:1929-1933; Murray et al, Patente de EE. UU. N° 4.801.542; Upshall et al, Patente de EE. UU. N° 4.935.349; Hagen et al, Patente de EE. UU. N° 4.784.950; Axel et al, Patente de EE. UU. N° 4.399.216; Goeddel et al, Patente de EE. UU. N° 4.766.075; y Sambrook et al, supra).

Pueden conseguirse los promotores, terminadores, y métodos para la introducción de los vectores de expresión de un tipo apropiado en, por ejemplo, células vegetales, aviares, y de insecto por los expertos en la técnica. El fragmento de p97 producido recombinantemente puede purificarse adicionalmente como se ha descrito con mayor detalle posteriormente.

La forma soluble de p97 se puede preparar cultivando células que contienen el p97 soluble mediante la fase log del crecimiento celular y recolectar el sobrenadante. Preferentemente, el sobrenadante se recolecta antes del momento en el que las células pierdan la viabilidad. El p97 soluble se puede purificar entonces como se ha descrito posteriormente, con el fin de obtener el p97 soluble. Los métodos adecuados para purificar el p97 soluble se puede seleccionar basándose en la propiedad hidrófila del p97 soluble. Por ejemplo, el p97 soluble puede obtenerse fácilmente por separación en fases por Triton X-1 14. Una vez que el p97 soluble se ha purificado, se puede digerir con, por ejemplo, hidroxilamina como se describe en los Ejemplos para generar el fragmento p97.

Agentes terapéuticos

Como se ha señalado anteriormente, ciertas realizaciones comprenden un polipéptido p97 que está unido a un agente terapéutico o fármaco de interés, por ejemplo, una molécula pequeña o un polipéptido (por ejemplo, un péptido, un anticuerpo). También se incluyen conjugados que comprenden más de un agente terapéutico de interés, por ejemplo, un fragmento p97 conjugado con un anticuerpo y una molécula pequeña.

Se prefieren enlaces covalentes, sin embargo, también se pueden emplear enlaces no covalentes, incluyendo los que se utilizan interacciones proteína-ligando no covalentes relativamente fuertes, tales como la interacción entre biotina y avidina. Los enlaces opcionales también están incluidos, que no necesitan imprescindiblemente una interacción directamente covalente o no covalente entre el fragmento p97 y el agente de interés; ejemplos de dichos enlaces incluyen mezclas de liposomas que comprenden un polipéptido p97 y un agente de interés. Los métodos a modo de ejemplo de generación de conjugados proteicos se describen en el presente documento, y otros métodos se conocen bien en la técnica.

Las moléculas pequeñas a modo de ejemplo incluyen agentes citotóxicos, quimioterápicos, y anti-angiogénicos, por ejemplo, los que se han considerado útiles en el tratamiento de distintos cánceres, incluyendo cánceres del sistema nervioso central y cánceres que han metastatizado al sistema nervioso central. Las clases particulares de moléculas pequeñas incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, anti-metabolitos, antraciclinas, antibióticos antitumorales, platinos, inhibidores de la topoisomerasa tipo I, topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca, y taxanos.

Ejemplos específicos de moléculas pequeñas incluyen clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalan, procarbina, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfan, daunorrubicina, doxorubicina, gefitinib, erlotinib idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecina, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus, everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, y paclitaxel, y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

Ejemplos adicionales de moléculas pequeñas incluyen los que se dirigen a proteína cinasas para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso (por ejemplo, SNC), incluyendo imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudil, SB-681323, y semaxanib (SU5416) (véase, Chico et al., Nat Rev Drug Discov. 8:829-909, 2009). Los ejemplos de moléculas pequeñas incluyen también donepizil, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasagilina, naltrexona, lubiproston, safinamida, istradefilina, pimavanserina, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina, y bexaroteno (por ejemplo, para el tratamiento de la Enfermedad de Alzheimer, Enfermedad de Parkinson, Enfermedad de Huntington); y acetato de glatirimer, fingolimod, mitoxantrona (por ejemplo, para tratar la MS). También se incluyen sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

Ejemplos adicionales de moléculas pequeñas incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa, ciclofosfamida (CITOX-AN™); sulfonatos de alquilo tales como busulfan, improsulfan y piposulfan; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas que incluyen altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietileno fosforamida y trimetilolomelamina; mostazas nitrogenadas tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, óxido hidroclorhídrico de mecloretamina, melfalan, novembicina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza uracilo; nitrosoureas tales como carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos tales como

aclacinomicina, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, caliqueamicina, carabicina, carminomicina, carzinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorrubicina, detorrubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorrubicina, epirubicina, esorrubicina, idarrubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomicina, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorrubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, ubenimex, zinostatina, zorrubicina; anti-metabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos de ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiamiprina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, dideoxiuridina, doxifluridina, encocitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; anti-adrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; relleno de ácido fólico tales como ácido frolínico; aceglatona; aldofosfamida glicósido; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestrabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; eliptinium acetato de elfornitina; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinan; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidanmol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarrubicina; ácido podofilínico; 2-etilhidrazida; procarbina; PSK; razoxano; sizofiran; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclorotrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromina; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, por ejemplo, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de topoisomerasa RFS 2000; difluorometilmitina (DMFO); derivados del ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); espiromicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

También se incluyen agentes anti-hormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre los tumores tales como los anti-estrógenos incluyendo por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasas, 4-hidroxi tamoxifeno, tri-oxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona, y toremifeno (Fareston); y anti-andrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de los anteriores.

Como se ha señalado anteriormente, en ciertos aspectos la molécula pequeña es un agente cardiotóxico de otra manera. Ejemplos particulares de moléculas pequeñas cardiotóxicas incluyen, sin limitación, antraciclina/antraquinolonas, ciclofosfamiditas, antimetabolitos, agentes anti-microtúbulos, e inhibidores de la tirosina cinasa. Ejemplos específicos de agentes cardiotóxicos incluyen ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docetaxel, adriamicina, doxorrubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfan, vinblastina, bleomicina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona, y mitoxantrona, entre otras moléculas pequeñas descritos en el presente documento y conocido en la técnica.

En realizaciones particulares, el agente terapéutico de interés es un péptido o polipéptido. Los términos "péptido" y "polipéptido" se utilizan de manera intercambiable en el presente documento, sin embargo, en ciertos casos, el término "péptido" se puede referir a polipéptidos cortos, por ejemplo polipéptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, o 50 aminoácidos, incluyendo todos los números enteros e intervalos (por ejemplo, 5-10, 8-12, 10-15) entre ellos. Los polipéptidos y péptidos pueden estar compuestos de aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, como se ha descrito en el presente documento. Los anticuerpos también se incluyen como polipéptidos.

Los agentes polipeptídicos a modo de ejemplo incluyen los polipéptidos asociados con trastorno por almacenamiento lisosómico. Ejemplos de dichos polipéptidos incluyen aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, α -galactosidasa A, ceramidasa ácida, α -L-fucosidasa, β -hexosaminidasa A, activador del gangliósido GM2 (GM2A), α -D-manosidasa, (3-D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, α -N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa, subunidad γ de fosfotransferasa, L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparano-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetil-CoA:N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, catepsina A, catepsina K, α -galactosidasa B, NPC1, NPC2, sialina, y transportador de ácido siálico, incluyendo fragmentos, variantes y derivados de los mismos.

Ciertas realizaciones incluyen polipéptidos tales como interferón- β polipeptídicos, tales como interferón- β 1a (por ejemplo, AVONEX, REBIF) e interferón- β 1b (por ejemplo, Betaseron), que se utilizan a menudo para el tratamiento de esclerosis múltiple (MS).

En algunas realizaciones, como se ha señalado anteriormente, el agente polipeptídico es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo. El anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno se utiliza en los conjugados o composiciones de la presente invención puede ser de esencialmente cualquier tipo. Los ejemplos particulares incluyen anticuerpos terapéuticos y diagnósticos. Como se conoce bien en la técnica, un anticuerpo es

una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse específicamente a una diana, tal como un carbohidrato, un polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., mediante al menos un sitio de reconocimiento del epítipo, localizado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina.

5 Como se utiliza en el presente documento, el término “anticuerpo” engloba no solo anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), Fv de cadena sencilla (scFv), variantes sintéticos de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión al antígeno de la especificidad necesaria, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de
10 inmunoglobulina que comprende un sitio de unión al antígeno o un fragmento (sitio de reconocimiento del epítipo) de la especificidad necesaria.

La expresión “fragmento de unión al antígeno” como se utiliza en el presente documento se refiere a un fragmento de polipéptido que contiene al menos una CDR de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina que se une al
15 antígeno de interés. A este respecto, un fragmento de unión al antígeno del presente documento describe anticuerpos que comprenden 1, 2, 3, 4, 5, o las 6 CDR de una secuencia VH y VL de anticuerpo que se unen a una diana terapéutica o diagnóstica.

El término “antígeno” se refiere a una molécula o una parte de una molécula que es capaz de unirse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y adicionalmente es capaz de utilizarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítipo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítipos.

El término “epítipo” incluye cualquier determinante, preferentemente un determinante polipeptídico, capaz de la unión específica a una inmunoglobulina o receptor de células T. Un epítipo es una región de un antígeno que se
25 une a un anticuerpo. En ciertas realizaciones, los determinantes del epítipo incluyen agrupamientos de superficie químicamente activo de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcares, fosforilo o sulfonilo, y puede tener en ciertas realizaciones características estructurales tridimensionales específicas, y/o características de carga específicas. Los epítipos pueden ser contiguos o no contiguos en relación con la estructura primaria del antígeno.

Se dice que una molécula tal como un anticuerpo presenta una “unión específica” o “unión preferencial” si reacciona o se asocia más frecuentemente, más fácilmente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia en particular, de lo que lo hace con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo “se une específicamente” o “se une preferencialmente” a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o
35 con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específicamente o preferencialmente a un epítipo específico es un anticuerpo que se une a ese epítipo con mayor afinidad, avidez, más fácilmente, y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítipos. También se entiende leyendo esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítipo) que se une específicamente o preferencialmente a una primera diana puede unirse específicamente o preferencialmente, o no, a una segunda diana. Como tal, “unión específica” o “unión preferencial” no tiene que ser necesariamente (aunque puede incluir) una unión específica. En
40 general, pero no necesariamente, la referencia a unión significa unión preferencial.

Una unión inmunológica se refiere en general a interacciones no covalentes del tipo que se produce entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el que la inmunoglobulina es específica, por ejemplo a modo de
45 ilustración y no limitación, como resultado de fuerzas electrostáticas, iónicas, atracciones o repulsiones hidrófilas y/o hidrófobas, estéricas, enlaces hidrógeno, fuerzas de van der Waals, y otras interacciones. La fuerza, o afinidad de las interacciones de unión inmunológica se pueden expresar en términos de constante de disociación (K_d) de la interacción, en el que una K_d más pequeña representa una mayor inmunidad. Las propiedades de unión inmunológicas de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la
50 técnica. Uno de dichos métodos implica la medición de las tasas de formación y disociación del complejo sitio de unión al antígeno/antígeno, en el que las tasas dependen de las concentraciones de los componentes del complejo, a la afinidad de la interacción, y los parámetros geométricos que influyen de igual manera en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la “constante de velocidad de asociación” (K_{on}) y la “constante de velocidad de disociación” (K_{off}) se pueden determinar calculando las concentraciones y las velocidades de asociación y
55 disociación actuales. La relación K_{off}/K_{on} hace posible la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad y por lo tanto es igual a la constante de disociación.

Las propiedades de la unión inmunológica de los anticuerpos y polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar utilizando métodos bien conocidos en la técnica (véase Davies et al., Annual Rev. Biochem. 59:439-473, 1990). En
60 algunas realizaciones, se dice que un anticuerpo u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno o epítipo del mismo cuando la constante de disociación en equilibrio es aproximadamente $\leq 10^{-7}$ o 10^{-8} M. En algunas realizaciones, la constante de disociación en equilibrio de un anticuerpo puede ser aproximadamente $\leq 10^{-9}$ M o $\leq 10^{-10}$ M. En ciertas realizaciones ilustrativas, un anticuerpo u otro polipéptido tiene una afinidad (K_d) por un antígeno o diana descrita en el presente documento (a la que se une específicamente) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22,
65 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40, o 50 nM.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un receptor de superficie celular u otra proteína de superficie celular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un ligando en un receptor de superficie celular u otra proteína de superficie celular. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a una proteína intracelular.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado al cáncer o antígeno del cáncer. Los antígenos del cáncer a modo de ejemplo incluyen proteínas de superficie celular tales como receptores de superficie celular. También se incluyen antígenos asociados al cáncer que son ligandos que se unen a dichas proteínas o receptores de superficie celular. En realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno se une específicamente a un antígeno de cáncer intracelular. En algunas realizaciones, el cáncer que se asocia con el antígeno de cáncer es uno o más de cáncer de mama, cáncer cerebral metastático, cáncer de próstata, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, cáncer de SNC o cerebro, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, tumor epitelial, cáncer de huesos, o un cáncer hematopoyético.

En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a al menos un antígeno asociado al cáncer, o antígeno del cáncer, tales como el Her2/neu humano, receptor Her1/EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (Receptor IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento vascular endotelial VEGF (por ejemplo, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R), alfa-fetoproteína, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha\beta 3$, integrina $\alpha 5\beta 1$, receptor folato 1, glicoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glicoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7), EGP40 antígeno pancarcinoma, factor activador de células B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteína EpCAM (17-1A), Muerte programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido que se expresa en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano-3 (GPC3), y/o mesotelina.

En realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo u otro polipéptido se une específicamente a la proteína Her2/neu humana. Esencialmente cualquier anticuerpo anti-Her2/neu, fragmento de unión al antígeno u otro agente de unión específico de Her2/neu se puede utilizar en la producción de conjugados p97-anticuerpo de la presente invención. Los anticuerpos anti-Her2/neu ilustrativos se describen por ejemplo en las Patentes de EE. UU. N° 5.677.171; 5.720.937; 5.720.954; 5.725.856; 5.770.195; 5.772.997; 6.165.464; 6.387.371; y 6.399.063.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno del mismo u otro polipéptido que se une específicamente al Her1/EGFR humana (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Esencialmente cualquier anticuerpo anti-Her1/EGFR, fragmento de unión al anticuerpo u otro agente de unión específico de Her1/EGFR se puede utilizar en la producción de los conjugados p97-anticuerpo de la presente invención. Los anticuerpos anti-Her1/EGFR ilustrativos se describen por ejemplo en las Patentes de EE. UU. N° 5.844.093; 7.132.511; 7.247.301; 7.595.378; 7.723.484; 7.939.072; y 7.960.516.

En ciertas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico, tal como un anticuerpo terapéutico anti-cáncer, incluyendo los anticuerpos tales como 3F8, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatzumab (mertansina), brentuximab vedotin, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, cetuximab, citatuzumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetan), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicina), girentuximab, glembatumumab (vedotin), ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, intetumumab, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radioactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, trastuzumab, tucotuzumab (celmoleucina), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab, y zalutumumab. También se incluyen fragmentos, variantes, y derivados de estos anticuerpos.

En realizaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo cardiotoxico, es decir, un anticuerpo que presenta cardiotoxicidad cuando se administra en forma no conjugada. Ejemplos específicos de anticuerpos que presentan cardiotoxicidad incluyen el trastuzumab y bevacizumab.

5 En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-Her2/neu que se utiliza en el conjugado con p97 es trastuzumab (Herceptin®), o un fragmento, variante o derivado del mismo. El Herceptin® es un anticuerpo monoclonal específico de Her2/neu aprobado para el tratamiento del cáncer de mama humano. En ciertas realizaciones, un fragmento de unión al antígeno que se une a Her2/neu comprende una o más CDR de un anticuerpo Her2/neu. A este respecto, se ha demostrado en algunos casos que la transferencia de solo la VHCDR3 de un anticuerpo se puede llevar a cabo a la vez que se mantiene la unión específica deseada (Barbas et al., PNAS. 92: 2529-2533, 1995). Véase también, McLane et al., PNAS USA. 92:5214-5218, 1995; y Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162, 1994.

15 En otras realizaciones específicas, el anticuerpo anti-Her1/EGFR que se utiliza en un conjugado de la invención es cetuximab (Erbiximab®), o un fragmento o derivado del mismo. En ciertas realizaciones, un fragmento de unión anti-Her1/EGFR comprende una o más de las CDR de un anticuerpo Her1/EGFR tal como cetuximab. El cetuximab está aprobado para el tratamiento de cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal. El cetuximab está compuesto de las regiones FV (variables; de unión al antígeno) del anticuerpo monoclonal EGFR murino 225 específico de la parte del extremo N del EGFR humano con las regiones constantes de cadena ligera kappa y pesada de IgG1 humana (marco conservadas).

20 En algunas realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado con (por ejemplo, para el tratamiento de) al menos un trastorno del sistema nervioso, incluyendo trastornos del sistema nervioso periférico y/o trastorno del sistema nervioso central (SNC). En ciertas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado con (por ejemplo en el tratamiento del) dolor, incluyendo el dolor agudo, dolor crónico, y dolor neuropático. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión al antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado con (por ejemplo, en el tratamiento de) un trastorno autoinmunitario, incluyendo los trastornos autoinmunitarios del sistema nervioso o SNC.

30 Ejemplos de antígenos asociados con el sistema nervioso, dolor, y/o autoinmunidad incluyen sin limitación, integrina alfa-4 ($\alpha 4$), factor de necrosis tumoral (TNF), IL-12, IL-23, subunidad p40 de IL-12 e IL-23, CD20, CD52, β -amiloides (por ejemplo $A\beta(1-42)$), Huntingtina, CD25 (es decir, la cadena alfa del receptor de IL-2), factor de crecimiento nervioso (NGF), receptor de la tirosina cinasa neurotrófica tipo 1 (TrkA, el receptor catalítico de alta afinidad de NGF), y α -sinucleína. Estas dianas se han considerado útiles en el tratamiento de varios trastornos del sistema nervioso, dolorosos y/o autoinmunitarios, tales como la esclerosis múltiple (integrina $\alpha 4$, IL-23, CD25, CD20, CD52, IL-12, IL-23, la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, Nogo-A, LINGO-1), Enfermedad de Alzheimer ($A\beta$, TNF), Enfermedad de Huntington (Huntingtina), Enfermedad de Parkinson- α -sinucleína), y dolor (NGF y TrkA).

40 En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD25 que se utiliza en un conjugado con p97 es daclizumab (es decir, Zenapaz™), o un fragmento, variante o derivado del mismo. El daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado que se une específicamente al CD25, la subunidad alfa del receptor de IL-2. En algunas realizaciones, el anticuerpo es natalizumab, o una variante o fragmento del mismo que se une específicamente a la integrina $\alpha 4$. En otras realizaciones, el anticuerpo es rituximab, ocerlizumab, ofatumumab, o una variante o fragmento de los mismos que se unen específicamente a CD20. En realizaciones particulares, el anticuerpo es alemtuzumab, o una variante o fragmento del mismo que se une específicamente a CD52. En ciertas realizaciones el anticuerpo es ustekinumab (CNTO 1275), o una variante o fragmento del mismo que se une específicamente a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23.

50 En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-NGF que se utiliza en un conjugado es tanezumab, o un fragmento, variante o derivado del mismo. El tanezumab se une específicamente al NGF y evita que el NGF se una con alta afinidad a su cinasa A relacionada con el receptor catalítico de tropomiosina (TrkA), unida a la membrana, que está presente en las neuronas simpáticas y sensoriales; se cree que la reducción de la estimulación de TrkA por el NGF inhibe las actividades de transmisión dolorosa de dichas neuronas.

55 En algunas realizaciones, el anticuerpo que se utiliza en un conjugado se une específicamente al factor de necrosis tumoral (TNF)- α o TNF- β . En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-TNF es adalimumab (Humira®), certolizumab pegol (Cimzia®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Cimzia®), o infliximab (Remicade®), D2E7, CDP 571, o CDP 870, o un fragmento de unión al antígeno o variante de los mismos. Los conjugados que comprenden un anticuerpo anti-TNF se puede utilizar, por ejemplo, en el tratamiento de afecciones o trastornos neurológicos tales como enfermedad de Alzheimer, ictus, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis medular, lesión de la medula espinal aguda, compresión de la médula espinal (véase las Patentes de EE. UU. N° 6.015.557; 6.177.077; 6.419.934; 6.419.944; 6.537.549; 6.982.089; y 7.214.658).

65 Los anticuerpos se pueden preparar por cualquiera de varias técnicas conocidas por los expertos habitados en la técnica. Véase por ejemplo, Harlow y Lane, Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los anticuerpos monoclonales específicos de un polipéptido de interés se pueden preparar, por ejemplo utilizando la

técnica de Kohler y Milstein, Eur. J. Immunol. 6:511-519, 1976, y mejoras de la misma. También se incluyen métodos que utilizan animales transgénicos tales como ratones que expresan anticuerpos humanos. Véase por ejemplo, Neuberger et al., Nature Biotechnology 14:826, 1996; Lonberg et al., Handbook of Experimental Pharmacology 113:49-101, 1994; y Lonberg et al., Internal Review of Immunology 13:65-93, 1995. Los ejemplos
 5 particulares incluyen la plataforma VELOCIMMUNE® por REGENEREX® (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 6.596.541).

Los anticuerpos también se pueden generar o identificar por el uso de bibliotecas de fagos de presentación o levaduras de presentación (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. Nº 7.244.592; Chao et al., Nature Protocols.
 10 1:755-768, 2006). Ejemplos no limitantes de bibliotecas disponibles incluyen las bibliotecas clonadas o sintéticas, tales como la Biblioteca Combinatoria de anticuerpos humanos (HuCAL), en la que la diversidad estructural del repertorio de anticuerpos humanos se representa por genes de región variable de siete cadenas pesadas y siete cadenas ligeras. La combinación de estos genes da lugar a 49 regiones marco conservadas en la biblioteca maestra. Superponiendo casetes genéticos altamente variables (CDR = regiones determinantes de complementariedad)
 15 de estas regiones marco conservadas, se puede reproducir el enorme repertorio de anticuerpos humanos. También se incluyen las bibliotecas humanas diseñadas con fragmentos de una fuente de donantes humanos que codifican una región variable de cadena ligera, una CDR3 de cadena pesada, ADN sintético que codifica la diversidad en la CDR-1 de cadena pesada, y un ADN sintético que codifica la diversidad de CDR-2 de cadena pesada. Otras bibliotecas para su uso serán evidentes para los expertos en la técnica. Los polipéptidos p97
 20 descritos en el presente documento y conocidos en la técnica se pueden utilizar en el procedimiento de purificación, en por ejemplo, una etapa de cromatografía de afinidad.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos y fragmentos de unión al antígeno de los mismos como se describen en el presente documento incluyen un conjunto de CDR de cadena pesada y cadena ligera, intercalados respectivamente
 25 entre un conjunto de regiones marco conservadas de cadena pesada y cadena ligera (FR) que proporciona el soporte a las CDR y define la relación espacial de las CDR con respecto unas de otras. Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de la región V de cadena pesada o cadena ligera. Provieniendo desde el extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se señalan como "CDR1", "CDR2", y "CDR3", respectivamente. Un sitio de unión al antígeno, por lo tanto, incluye seis
 30 CDR, que comprenden el conjunto de CDR de cada una de las regiones V de cadena pesada y cadena ligera. Se hace referencia a un polipéptido que comprende una única CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) como "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de varios complejos antígeno-anticuerpo han demostrado que los restos de aminoácidos de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en el que el contacto más extenso con el antígeno es con la CDR3 de cadena pesada. Por lo tanto, las unidades de
 35 reconocimiento molecular son responsables primariamente para la especificidad de un sitio de unión al antígeno.

Como se utiliza en el presente documento, la expresión "conjunto FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos que flanquean como un marco las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos restos de FR pueden contactar con el antígeno unido; sin embargo, las FR son primariamente
 40 responsables del plegamiento de la región V en el sitio de unión al antígeno, particularmente los restos de FR directamente adyacentes a las CDR. En las FR, ciertos restos de aminoácidos y ciertas características estructurales están muy altamente conservados. A este respecto, todas las secuencias de la región V contiene un bucle disulfuro interno de alrededor de 90 restos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se presentan como motivos en bucles proyectados que forman una superficie de unión al antígeno. Se reconocen
 45 generalmente que hay regiones estructurales conservadas de FR que tienen influencia en la forma plegada de los bucles CDR en ciertas estructuras "canónicas" independientemente de las secuencias de aminoácidos precisa de la CDR- Además, se sabe que ciertos restos de FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo.

50 Las estructuras y localizaciones de los dominios variables se pueden determinar en referencia a Kabat, E. A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest. 4ª Edición. US Department of Health and Human Services. 1987, y actualizaciones del mismo.

Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población homogénea de anticuerpos en la que el anticuerpo monoclonal está compuesto de aminoácidos (de origen natural y no natural) que están implicado en la unión selectiva a un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son altamente específicos, dirigiéndose a un único epítipo. La expresión "anticuerpo monoclonal" engloba no solamente anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), de cadena sencilla (scFv), variantes de los mismos, proteínas de fusión que comprenden una parte de unión al antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión al antígeno (sitios de reconocimiento del epítipo) de la especificidad y capacidad necesaria para unirse a un epítipo. No se tiene la intención de limitarse con respecto a la fuente del anticuerpo o la manera en la que se fabrica (por ejemplo, por hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos). La expresión incluye
 65 inmunoglobulinas completas así como los fragmentos etc. descritos anteriormente con la definición de "anticuerpo".

La enzima proteolítica papaína escinde preferentemente moléculas de IgG para dar lugar a varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión al antígeno intacto. La pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluyendo el fragmento F(ab')₂ que comprende ambos sitios de unión al antígeno. Un fragmento Fv para su uso de acuerdo con ciertas realizaciones de la presente invención se puede producir por escisión proteolítica preferencial de una IgM, y en raras ocasiones de una molécula de inmunoglobulina de IgG o IgA. Sin embargo, los fragmentos Fv se derivan más comúnmente utilizando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero no covalente VH:VL que incluye un sitio de unión al antígeno que mantiene muchas de las capacidades de reconocimiento y unión al antígeno de la molécula de anticuerpo nativa. Véase Inbar et al., PNAS USA. 69:2659-2662, 1972; Hochman et al., Biochem. 15:2706-2710, 1976; y Ehrlich et al., Biochem. 19:4091-4096, 1980.

En ciertas realizaciones, se contemplan anticuerpos Fv de cadena sencilla o scFv. Por ejemplo, Kappa cuerpos (Ill et al., Prot. Eng. 10:949-57, 1997); minicuerpos (Martin et al., EMBO J 13:5305-9, 1994); diacuerpos (Holliger et al., PNAS 90: 6444-8, 1993); o Janusinas (Traunecker et al., EMBO J 10: 3655-59, 1991; y Traunecker et al., Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52, 1992), que se pueden preparar utilizando técnicas de biología molecular convencionales siguiendo las enseñanzas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tiene la especificidad deseada.

Un Fv de cadena sencilla (scFv) polipeptídico es un heterodímero VH:VL unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión genética que incluye genes que codifican V_H y V_L unidos por un enlazador que codifica un péptido. Huston et al. (PNAS USA. 85(16):5879-5883, 1988). Se han descrito varios métodos para distinguir estructuras químicas para convertir cadenas polipeptídicas pesadas y ligeras separadas químicamente pero agregadas naturalmente de una región V de anticuerpo en una molécula scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión al antígeno. Véase, por ejemplo, las Patentes de EE. UU. N° 5.091.513 y 5.132.405, de Huston et al.; y Patente de EE. UU. N° 4.946.778, to Ladner et al.

En ciertas realizaciones, un anticuerpo que se describe en el presente documento está en forma de "diacuerpo". Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando unidas los dos dominios (por ejemplo, por un enlazador peptídico) pero que son incapaces de asociarse entre ellos para formar un sitio de unión al antígeno: los sitios de unión al antígeno están formados por la asociación del primer dominio de un polipéptido en el multímero con el segundo dominio de otro polipéptido en el multímero (documento WO94/13804). Un fragmento dAb de un anticuerpo consiste en un dominio de VH (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989). Los diacuerpos y otros fragmentos multivalentes o multispecíficos se pueden construir, por ejemplo, por fusión genética (véase el documento WO94/13804; y Holliger et al., PNAS USA. 90:6444-6448, 1993)).

Los minicuerpos que comprenden un scFv unido a un dominio CH3 también están incluidos (véase, Hu et al., Cancer Res. 56:3055-3061, 1996). Véase también, Ward et al., Nature. 341:544-546, 1989; Bird et al., Science. 242:423-426, 1988; Huston et al., PNAS USA. 85:5879-5883, 1988); PCT/US92/09965; WO94/13804; y Reiter et al., Nature Biotech. 14:1239-1245, 1996.

Cuando se van a utilizar los anticuerpos biespecíficos, pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de varias maneras (Holliger y Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, 1993), por ejemplo, que se preparan químicamente a partir de hibridomas híbridos o puede ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpo biespecíficos mencionados anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, utilizando solo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de una reacción anti-idiotípica.

Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, también pueden ser particularmente útiles debido a que se pueden construir fácilmente y expresarse en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpo) con especificidades de unión apropiadas se pueden seleccionar fácilmente utilizando fagos de presentación (documento WO94/13804) de bibliotecas. En un brazo del diacuerpo se va a mantener constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces se puede fabricar una biblioteca en la que el otro brazo se varía y se selecciona un anticuerpo con la especificidad apropiada. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden producirse por modificación de botones-en-ojales (Ridgeway et al., Protein Eng., 9:616-621, 1996).

En ciertas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma de UniBody®. Un UniBody® es un anticuerpo IgG4 con la región bisagra eliminada (véase GenMab Utrecht, Países bajos; véase también, por ejemplo, la Solicitud de EE. UU. N° 2009/0226421). Esta tecnología de anticuerpo crea un formato de anticuerpo más pequeño, estable, con una ventana terapéutica que se ha anticipado más larga que los formatos de anticuerpos pequeños actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y por lo tanto no interactúan con el sistema inmunitario. Los anticuerpos IgG4 humanos completos se puede modificar eliminando la región de la bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de media molécula que tienen distintas propiedades de estabilidad con respecto a la IgG4 intacta correspondiente (GenMab, Utrecht). Teniendo que la molécula solo deja un área en el

UniBody® que se puede unir con antígenos equivalentes (por ejemplo, dianas de enfermedad) y por lo tanto el UniBody® se une univalentemente a solo un sitio en las células diana. Para ciertos antígenos de superficie celular del cáncer, esta unión univalente puede que no estimule el crecimiento de las células cancerosas como se puede ver utilizando anticuerpos bivalentes que tienen la misma especificidad antigénica, y por lo tanto, la tecnología UniBody® puede conseguir opciones de tratamiento para algunos tipos de cáncer que pueden ser refractarios al tratamiento con anticuerpos convencionales. El pequeño tamaño del UniBody® puede tener un gran beneficio cuando se tratan algunas formas de cáncer, permitiendo una mejor distribución de la molécula en grandes tumores sólidos y aumentar potencialmente la eficacia.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden tener forma de un nanocuerpo. Los minicuerpos se codifican por genes únicos y se producen eficazmente en casi todos los huéspedes procariontes y eucariotes, por ejemplo, en *E. coli* (véase la Pat. de EE. UU. Nº No. 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (Véase la Pat. de EE. UU. Nº 6.838.254). El procedimiento de producción es escalable y se han producido cantidades de multi-kilogramos de nanocuerpos. Los nanocuerpos se pueden formular como una solución lista para su uso que tenga una vida de almacenamiento larga. El método de nanoclón (véase el documento 06/079372) es un método privado para la generación de Nanocuerpos contra una diana deseada, basándose en una selección automática de células B de alto rendimiento.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión al antígeno de los mismos están humanizados. Estas realizaciones se refieren a una molécula quimérica, preparada en general utilizando técnicas recombinantes, que tienen un sitio de unión al antígeno derivado de una inmunoglobulina de una especie no humana y el resto de la estructura de inmunoglobulina de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión al antígeno puede comprender dominios variables completos fusionados con dominios constantes o solo se injertan las CDR en regiones marco conservadas apropiadas de los dominios variables. Los sitios de unión al epítipo pueden ser de tipo silvestre o modificarse por una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero la posibilidad de una respuesta inmunitaria contra la región variable ajena sigue existiendo (LoBuglio et al., PNAS USA 86:4220-4224, 1989; Queen et al., PNAS USA. 86:10029-10033, 1988; Riechmann et al., Nature. 332:323-327, 1988). Los métodos ilustrativos para la humanización de anticuerpos incluyen los métodos descritos en la Patente de EE. UU. Nº 7.462.697.

Otra estrategia se enfoca no solo en proporcionar regiones constantes derivadas de seres humanos, sino también modificar las regiones variables de manera que se les remodele lo más cercanamente posible a la forma humana. Se sabe que las regiones variables de ambas cadenas pesada y ligera contienen tres regiones determinantes de complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco conservadas (FR) que están relativamente conservadas en una especie determinada y que supuestamente proporcionan un armazón para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un epítipo particular, las regiones variables se pueden "remodelar" o "humanizar" injertando CDR derivadas de anticuerpos no humanos sobre las FR presentes en el anticuerpo humano que se va a modificar. La aplicación de esta estrategia en distintos anticuerpos ha sido expuesta por Sato et al., Cancer Res. 53:851-856, 1993; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988; Kettleborough et al., Protein Engineering. 4:773-3783, 1991; Maeda et al., Human Antibodies Hybridoma 2:124-134, 1991; Gorman et al., PNAS USA. 88:4181-4185, 1991; Tempest et al., Bio/Technology 9:266-271, 1991; Co et al., PNAS USA. 88:2869-2873, 1991; Carter et al., PNAS USA. 89:4285-4289, 1992; y Co et al., J Immunol. 148:1149-1154, 1992. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanizados conservan todas las secuencias CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR de los anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que están alteradas con respecto al anticuerpo original, lo que también se denomina una o más CDR "derivada de" una o más CDR del anticuerpo original.

En ciertas realizaciones, los anticuerpos de la presente invención pueden ser anticuerpos quiméricos. A este respecto, un anticuerpo quimérico está compuesto por un fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo unido operativamente o fusionado de otra manera a una parte Fc heteróloga de un anticuerpo diferente. En ciertas realizaciones, el dominio Fc heterólogo es de origen humano. En otras realizaciones, el dominio Fc heterólogo puede ser de una clase de Ig diferente del anticuerpo parental, incluyendo IgA (que incluyen las subclases IgA1 e IgA2), IgD, IgE, IgG (que incluye las subclases IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), e IgM. En realizaciones adicionales, el dominio Fc heterólogo puede estar compuesto de dominio CH2 y CH3 de una o más de las diferentes clases de Ig. Como se ha señalado anteriormente con respecto a anticuerpos humanizados, el fragmento de unión al antígeno de un anticuerpo quimérico puede comprender solo una o más de las CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, o 6 CDR de los anticuerpos descritos en el presente documento), o puede comprender un dominio variable completo (VL, VH o ambos).

Marcadores

En algunas realizaciones, el conjugado de fragmento p97 se marca para facilitar su detección. Un "marcador" o "entidad detectable" es una composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos,

inmunoquímicos, químicos u otros medios físicos. Por ejemplo, los marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluye, por ejemplo, marcadores radioactivos (por ejemplo, ³²P) , fluoróforos (por ejemplo fluoresceína), reactivos electrodenso, enzimas (por ejemplo, como se utiliza comúnmente en un ELISA), biotina, digoxigenina, o haptenos y proteínas que se pueden hacer detectables, por ejemplo, incorporando un radiomarcador en el hapteno o péptido, o que se utilizan para detectar anticuerpos específicamente reactivos con el hapteno o péptido.

Como se ha señalado anteriormente, dependiendo del ensayo de exploración empleado, se puede marcar el agente, el enlazador o la parte del fragmento de p97 de un conjugado. El marcador particular o grupo detectable que se utiliza no es un aspecto crítico de la invención, a condicione de que ni interfiera significativamente con la actividad biológica del conjugado. El grupo detectable puede ser de cualquier material que tenga una propiedad física o química detectable. Por lo tanto, un marcador es cualquier composición detectable por medios espectroscópicos, fotoquímicos, bioquímicos, inmunoquímicos, eléctricos, ópticos o químicos.

Ejemplos de marcadores adecuados para su uso en la presente invención incluyen, pero no se limitan a, colorantes fluorescentes (por ejemplo, isotiocianato de fluoresceína, rojo Texas, rodamina, y similares), radio marcadores (por ejemplo, H, I, S, C o p), enzimas (por ejemplo peroxidasa de rábano rústico, fosfatasa alcalina y otras que se utilizan normalmente en un ELISA), y marcadores colorimétricos tales como oro coloidal o perlas de plástico o cristal coloreadas (por ejemplo, de poliestireno, polipropileno, látex, etc.).

El marcador se puede acoplar directa o indirectamente al componente deseado del ensayo de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica. Preferentemente, el marcador en una realización está unido covalentemente al fragmento p97 utilizando un reactivo de isocianato para conjugar un agente activo de acuerdo con la invención. En un aspecto de la invención, los reactivos de isocianato bifuncionales de la invención se pueden utilizar para conjugar un marcador al fragmento p97 para formar un conjugado del fragmento p97 marcador sin un agente activo unido a ellos. El conjugado marcador p97 se puede utilizar como un intermediario para la síntesis de un conjugado marcado de acuerdo con la invención o se puede utilizar para detectar el conjugado del fragmento p97. Como se ha indicado anteriormente, se pueden utilizar una amplia variedad de marcadores, dependiendo la elección del marcador de la sensibilidad necesaria, facilidad de conjugación con el componente del ensayo deseado, las necesidades de estabilidad, instrumentación disponible, y suministros desechables. Los marcadores no radioactivos se unen a menudo por medios indirectos. En general, una molécula de ligando (por ejemplo, biotina) se une covalentemente a la molécula. El ligando se une entonces a otras moléculas (por ejemplo una molécula de estreptavidina), que es detectable de manera inherente o se une covalentemente a un sistema de señal, tal como una enzima detectable, un compuesto fluorescente, o un compuesto químico luminescente.

Los conjugados también se pueden conjugar directamente a los compuestos generadores de señal, por ejemplo, por conjugación con una enzima o fluoróforo. Las enzimas adecuadas para su uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, hidrolasas, particularmente las fosfatasas, esterases, y glicosidasas, u oxidotasas, particularmente peroxidasas. Los compuestos fluorescentes, es decir, los fluoróforos, adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, fluoresceína y sus derivados, rodamina y sus derivados, dansil, umbeliferona, etc. Ejemplos adicionales de fluoróforos adecuados incluyen, pero no se limitan a, eosina, TRITC-amina, quinina, fluoresceína W, amarillo acridina, lisamina, rodamina B, sulfonil cloruro de eritrosceína, rutenio (tris, biperidinio), rojo Texas, dinucleótido nicotinamida adenina, dinucleótido flavina adenina, etc. Los compuestos quimioluminiscentes adecuados para su uso como marcadores incluyen, pero no se limitan a, luciferina y 2,3-dihidroftalacindionas, por ejemplo, luminol. Para una revisión de los distintos sistemas de marcado o producción de señales que se pueden utilizar en los métodos de la presente invención, véase la Patente de EE. UU. Nº 4.391.904.

Los medios para detectar los marcadores son bien conocidos por los expertos en la técnica. Por lo tanto, por ejemplo, cuando un marcador sea un marcador radioactivo, los medios de detección incluyen un contador de centelleo o una película fotográfica como en autorradiografía. Cuando el marcador es un marcador fluorescente, se puede detectar excitando un fluorocromo con la longitud de onda de luz apropiada y detectando la fluorescencia resultante. La fluorescencia se puede detectar visualmente, por el uso de detectores electrónicos, tales como dispositivos acoplados con cargas (CCD) o fotomultiplicadores y similares. De manera similar, los marcadores enzimáticos se pueden detectar proporcionando los sustratos adecuados para la enzima y detectando el producto de reacción resultante. Los marcadores colorimétricos o quimioluminiscentes se pueden detectar simplemente observando el color asociado con el marcador. Otros sistemas de marcador y detección adecuados para su uso en los métodos de la presente invención serán fácilmente evidentes para los expertos en la técnica. Dichos moduladores marcados y ligandos se pueden utilizar en el diagnóstico de una enfermedad o estado sano.

Composiciones farmacéuticas, y métodos de uso/tratamiento/administración

Ciertas realizaciones de la presente invención se refieren a métodos de utilización de las composiciones de los polipéptidos p97 y los conjugados de p97 descritos en el presente documento. Ejemplos de dichos métodos incluyen métodos de tratamiento y métodos de diagnóstico, incluyendo por ejemplo, el uso de conjugados de p97 para la creación médica de imágenes de ciertos órganos/tejidos, tales como las del sistema nervioso. Realizaciones específicas incluyen métodos de diagnóstico y/o tratamiento de trastornos o afecciones del sistema nervioso central

(SNC), o trastornos o afecciones que tienen un componente del SNC.

En consecuencia, ciertas realizaciones incluyen métodos de tratamiento de un sujeto que necesita los mismos, que comprende la administración de una composición que comprende un conjugado de p97 que se describe en el presente documento. También incluye métodos de suministro un agente para el sistema nervioso (por ejemplo, tejidos del sistema nervioso central) de un sujeto, que comprende la administración de una composición que comprende un conjugado de p97 descrito en el presente documento. En ciertas de estas realizaciones y relacionadas, los métodos aumentan la tasa de suministro del agente a los tejidos del sistema nervioso central con respecto, por ejemplo, al suministro de una composición que comprende el agente solo.

En algunos casos, un sujeto tiene una enfermedad, trastorno, o afección del SNC, en el que el suministro aumentado del agente terapéutico a través de la barrera hematoencefálica a los tejidos del SNC con respecto a los tejidos periféricos pueden mejorar el tratamiento, por ejemplo, reduciendo los efectos secundarios asociados con la exposición de un agente a los tejidos periféricos. Enfermedades, trastornos, y afecciones a modo de ejemplo del SNC incluyen distintos cánceres, incluyendo cánceres primarios y metastáticos del SNC, enfermedades de almacenamiento lisosómico, enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, y enfermedades autoinmunitarias tales como la esclerosis múltiple.

Ciertas realizaciones por lo tanto se refieren a métodos para el tratamiento de un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente el cerebro, en el que el sujeto que tiene necesidad del mismo tiene dicho cáncer o tiene el riesgo de desarrollar dicha afección. En algunas realizaciones, el cáncer es un cáncer primario del SNC, tal como un cáncer primario del cerebro. Por ejemplo, los métodos pueden ser para el tratamiento de un glioma, meningioma, adenoma pituitario, schwannoma vestibular, linfoma primario del SNC, o tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma). En algunas realizaciones, el glioma es un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma, o un papiloma del plexo coroideo. En ciertas realizaciones, el cáncer del SNC primario o cerebro es un glioblastoma multiforme, tal como un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma.

En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer metastático del SNC, por ejemplo, un cáncer que ha metastatizado al cerebro. Ejemplos de dichos cánceres incluyen, sin limitación, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres del tracto genitourinario, cánceres del tracto gastrointestinal (por ejemplo, cánceres colorrectales, carcinomas pancreáticos), osteosarcomas, melanomas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres prostáticos (por ejemplo, adenocarcinomas prostáticos), y linfomas. Ciertas realizaciones por lo tanto incluyen métodos para tratar, inhibir o prevenir la metástasis de un cáncer administrando a un paciente una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado desvelado en el presente documento (por ejemplo, en una cantidad que, a continuación de la administración, inhibe, previene o retrasa la metástasis de un cáncer de una manera estadísticamente significativa, es decir, con respecto a un control apropiado como sabrán los expertos en la técnica). En realizaciones particulares, el sujeto tiene un cáncer que aún no ha metastatizado al sistema nervioso central, incluyendo uno o más de los cánceres descritos anteriormente, entre otros conocidos en la técnica.

En realizaciones particulares, el cáncer (las células) expresan o sobre-expresan uno o más de Her2/neu, CD20, Her1/receptor(es) EGF, receptor(es) VEGF, receptor(es) PDGF, CD30, CD52, CD33, CTLA-4, o tenascina.

También se incluye el tratamiento de otros cánceres, que incluyen cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer ovárico, cáncer testicular, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer pancreático, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer endometrial, tumor epitelial, cáncer de hueso, o cáncer hematopoyético. Por lo tanto, en ciertas realizaciones, el cáncer celular que se va a tratar por un conjugado de p97 sobre-expresa o está asociado con un antígeno del cáncer, tal como Her2/neu humano, receptor Her1/EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23 (receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (por ejemplo, VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD47, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R), alfa-feoproteína, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glicoproteína transmembrana NMB, proteína alfa de activación de fibroblastos (FAP), glicoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7), EGP40, antígeno pancarcinoma, factor activador de células B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteínas EpCAM (17-1A), Muerte programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), Fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano-3 (GPC3) y/o mesotelina.

El uso de conjugados de p97 para tratar cánceres incluyendo cánceres del SNC pueden combinarse con otras modalidades terapéuticas. Por ejemplo, una composición que comprenden un conjugado de p97 se puede administrar a un sujeto antes, durante o después de otras intervenciones terapéuticas, incluyendo el cuidado sintomático, radioterapia, cirugía, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, terapia

antibiótica, o una combinación de los mismos. El cuidado sintomático incluye la administración de corticoides, para reducir el edema cerebral, dolores de cabeza, disfunción cognitiva, y emesis, y la administración de anti-convulsivantes para reducir las convulsiones. La radioterapia incluye radiación del cerebro completo, radioterapia fraccionada, y radiocirugía, tal como radiocirugía estereotáctica, que se puede combinar adicionalmente con cirugía tradicional.

En terapias de combinación específicas, la parte de anticuerpo de un conjugado p97-anticuerpo comprende el cetuximab, y el conjugado p97-cetuximab se utiliza para tratar un sujeto con carcinoma de células escamosas avanzado local o regionalmente de la cabeza y cuello en combinación con terapia de radiación. En otros aspectos, el conjugado p97-cetuximab se utiliza para el tratamiento de un sujeto con enfermedad locorregional recurrente o carcinoma celular escamosa metastática de la cabeza y cuello en combinación con una terapia basada en platino con 5-fluorouracilo (5-FU). En algunos aspectos, el conjugado p97-cetuximab se utiliza en combinación con irinotecan para el tratamiento de un sujeto con cáncer colorrectal que expresa EGFR y que es refractario a la quimioterapia basada en irinotecan.

En algunos casos, el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad de almacenamiento lisosómico. Ciertos métodos se refieren de esta manera al tratamiento de enfermedades de almacenamiento lisosómico en un sujeto que tienen necesidad del mismo, opcionalmente estas enfermedades de almacenamiento lisosómico asociadas con el sistema nervioso central. Las enfermedades de almacenamiento lisosómico a modo de ejemplo incluyen la aspartilglucosaminuria, enfermedad de almacenamiento de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia celular globoide, enfermedad de Krabbe, enfermedad de almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sanhoff, gangliosidosis GM2, α -manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolipidosis tipo I, sialidosis tipos I/II, mucopolipidosis tipos I/III, enfermedad celular -I, mucopolipidosis tipo IIIC, polidistrofia pseudo-Hurler tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, síndrome de hunter, mucopolisacaridosis tipo IIIA, síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis ceroides neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler, y enfermedad de almacenamiento de ácido siálico. En estas realizaciones y relacionadas, el polipéptido p97 se puede conjugar con uno o más polipéptidos asociados con una enfermedad de almacenamiento lisosómico, como se describe en el presente documento.

En ciertos casos, el sujeto tiene o está en riesgo de tener un trastorno autoinmunitario y/o un trastorno neurodegenerativo u otro neurológico, opcionalmente del SNC. Por lo tanto, también se incluyen métodos de tratamiento de un trastorno degenerativo o autoinmunitario del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que necesita el mismo. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el trastorno degenerativo o autoinmunitario del SNC es la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, o esclerosis múltiple (MS). Por lo tanto, ciertas realizaciones incluyen la administración de un conjugado de p97 a un sujeto que tiene enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson, o esclerosis múltiple (MS). En realizaciones particulares, el polipéptido p97 está conjugado con un anticuerpo u otro agente que se une específicamente a amiloide β (por ejemplo, $A\beta_{(1-42)}$) o factor de necrosis tumoral (TNF- α o TNF- β) para la enfermedad de Alzheimer, Huntingtina para la enfermedad de Huntington, α -sinucleína para la enfermedad de Parkinson, o $\alpha 4$ integrina, CD25, o IL-23 para MS. En realizaciones particulares, el polipéptido p97 se conjuga con un anticuerpo u otro agente que se une específicamente al factor de necrosis tumoral (TNF- α , TNF- β) para el tratamiento de otras afecciones neurológicas tales como ictus, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis medular, lesión de médula espinal aguda, o compresión de la médula espinal. En algunas realizaciones, el polipéptido p97 se conjuga con un interferón- β polipeptídico o un anticuerpo que se une específicamente a la subunidad alfa del receptor de la IL-2 (CD25), integrina $\alpha 4$, CD20, CD52, IL-12, IL-23, la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, o al menos uno de los inhibidores de crecimiento y re-mielinación Nogo-A y LINGO-1, para el tratamiento de MS. En realizaciones específicas, el polipéptido p97 se conjuga con daclizumab, natalizumab, rituximab, ocerlizumab, ofatumumab, o ustekinumab (CNTO 1275), para el tratamiento de MS.

También se incluyen métodos de tratamiento del dolor en un sujeto que necesita el mismo. Ejemplos generales de dolor incluye dolor agudo y dolor crónico. En algunos casos, el dolor tiene al menos un componente del SNC. Ejemplos específicos de dolor incluye dolor nociceptivo, dolor neuropático, dolor repentino, dolor incidental, dolor fantasma, dolor inflamatorio incluyendo dolor artrítico, o cualquier combinación de los mismos. En algunos aspectos, el dolor tiene un componente que actúa centralmente, tal como síndrome de dolor central (CPS), en el que el dolor se asocia con daño o disfunción del SNC, incluyendo el cerebro, el tronco cerebral, y/o la médula espinal.

En casos particulares, el dolor es un dolor nociceptivo, opcionalmente visceral, dolor somático profundo, o somático superficial. El dolor nociceptivo habitualmente se produce por estimulación de las fibras de nervios periféricos que

responden a estímulos que se aproximan o exceden la intensidad del daño (nociceptores), y puede clasificarse de acuerdo con el modo de estimulación nociva; por ejemplo, "térmica" (por ejemplo, calor o frío), "mecánica" (por ejemplo, aplastamiento, desgarro, corte) y "química". Las estructuras viscerales son altamente sensibles a la tracción, isquemia e inflamación, pero son relativamente insensible a otros estímulos tales como la quemadura y el

5 corte. El dolor visceral a menudo es más difuso, difícil de localizar, y a veces se hace referencia a que tiene una estructura distante o superficial. El dolor visceral se puede acompañar por náuseas y vómitos, y a veces se describe como nauseabundo, profundo, opresivo, y sordo. El dolor somático profundo se inicia habitualmente por la estimulación de los nociceptores en los ligamentos, tendones, huesos, vasos sanguíneos, fascias y músculos, y a

10 menudo se caracteriza como dolor sordo, persistente, o mal localizado. Los ejemplos incluyen esguinces y fracturas óseas. El dolor superficial se inicia principalmente por activación de los nociceptores de la piel u otro tejido superficial y es agudo, bien definido y claramente localizado. Ejemplos de lesiones que producen el dolor somático superficial incluye heridas y quemaduras.

El dolor neuropático resulta del daño o enfermedad que afecta el sistema somatosensorial. SE puede asociar con sensaciones anormales llamadas disestesia, y el dolor producido por estímulos normalmente no dolorosos (alodinia). El dolor neuropático puede tener componentes continuos y/o episódicos (paroxísticos), siendo comparado el último con un choque eléctrico. Las características comunes de dolor neuropático incluyen quemaduras o congelación, sensaciones de "punzadas o agujas", entumecimiento, y picor. El dolor neuropático puede ser el resultado de trastornos en el sistema nervioso periférico o el sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro, médula espinal). El

15 dolor neuropático puede caracterizarse como dolor neuropático periférico, dolor neuropático central, o dolor neuropático mixto (periférico y central).

El dolor neuropático central se encuentra en la lesión de la médula espinal, esclerosis múltiple, e ictus. Las causas adicionales de dolor neuropático incluyen neuropatía diabética, infección por herpes zoster, neuropatías relacionadas con VIH, deficiencias nutricionales, toxinas, manifestaciones remotas de enfermedades malignas, trastornos inmunomediados, y trauma físico en un tronco nervioso. El dolor neuropático también asocia con el

25 cáncer, principalmente como resultado directo de un cáncer o tumor sobre los nervios periféricos o centrales (por ejemplo, en la compresión por un tumor), o como un efecto secundario de la quimioterapia, lesión por radiación, o cirugía.

En algunos casos, el dolor es un dolor repentino. El dolor repentino es un dolor que aparece de repente durante cortos periodos y no se alivia con el régimen normal de manejo del dolor de un sujeto. Es común en pacientes de

30 cáncer que a menudo tienen un nivel de fondo del dolor controlado por medicaciones, pero cuyo dolor periódicamente "se abre camino" incluso con medicación. Por lo tanto, en ciertos casos, el sujeto está tomando medicación para el dolor, y opcionalmente es un sujeto con dolor canceroso, por ejemplo, dolor neuropático canceroso.

En ciertos casos, el dolor es un dolor incidental, un tipo de dolor que aparece como resultado de una actividad. Los ejemplos incluyen el movimiento en las articulaciones artríticas o lesionadas, y la tracción de una herida.

40 En casos específicos, el dolor es de osteoartritis, dolor lumbar (o lumbago), incluyendo el dolor lumbar agudo, subagudo, y crónico (CLBP), dolor de cáncer de huesos, o cistitis intersticial.

La osteoartritis (OA), a la que también se hace referencia como artritis degenerativa o enfermedad articular degenerativa u osteoartrosis, es un grupo de anormalidades que implican la degradación de las articulaciones, que

45 incluyen el cartílago articular y el hueso subcondral. Los síntomas de OA pueden incluir dolor articular, sensibilidad, rigidez, bloqueo, y a veces derrame. La OA puede iniciarse por varias causas, incluyendo causas hereditarias, del desarrollo, metabólicas y mecánicas, la mayoría de ellas que dan lugar a la pérdida de cartílago. Cuando las superficies óseas están menos bien protegidas por el cartílago, el hueso puede quedar expuesto y dañarse. Como resultado de la disminución del movimiento por el dolor, se pueden atrofiar los músculos regionales, y los ligamentos se vuelven cada vez más laxos. Ejemplos particulares incluyen la osteoartritis de la rodilla y la osteoartritis de la

50 cadera.

La cistitis intersticial, o síndrome de dolor de la vejiga, es una enfermedad crónica, bastantes veces gravemente debilitante de la vejiga urinaria. De causa desconocida, se caracteriza, por ejemplo, por dolor asociado con la vejiga,

55 dolor asociado con la micción (disuria), frecuencia urinaria (por ejemplo, tanto como cada 10 minutos), urgencia, y/o presión en la vejiga y/o la pelvis.

En métodos particulares para tratar el dolor, el polipéptido p97 se conjuga con un anticuerpo u otro agente que se une específicamente a NGF o TrkA. En realizaciones específicas el polipéptido p97 se conjuga con tanezumab para el tratamiento del dolor, opcionalmente para el tratamiento de la osteoartritis de rodilla o cadera, dolor lumbar

60 crónico, dolor de cáncer de huesos, o cistitis intersticial.

Ciertas realizaciones incluyen terapias de combinación para el tratamiento del dolor. Por ejemplo, se le puede administrar a un sujeto con dolor un conjugado p97-anticuerpo descrito en el presente documento, en el que el anticuerpo se une específicamente al menos a un antígeno asociado con el dolor, en combinación con una o más

65 medicaciones para el dolor, incluyendo analgésicos y anestésicos. los analgésicos a modo de ejemplo incluyen, sin

- limitación, paracetamol/acetaminofeno; fármacos anti-inflamatorios no esteroideos (NSAIDS) tales como salicilatos (por ejemplo, aspirina), derivados del ácido propiónico (por ejemplo, ibuprofeno, naproxeno), derivados del ácido acético (por ejemplo, indometacina), derivados del ácido enólico, derivados del ácido fenámico, e inhibidores selectivos de la COX-2; opiáceos/opioides y morfínomiméticos tales como morfina, buprenorfina, codeína,
- 5 oxicodona, oximorfona, hidrocodona, dihidromorfina, dihidrocodeína, levorfanol, metadona, dextropropoxifeno, pentazocina, dextromoramida, meperidina (o petidina), tramadol, noscapina, nalbufina, pentazocina, papaverina, papaveretum, alfentanilo, fentanilo, remifentanilo, sufentanilo, y etorfina; y otros agentes, tales como flupirtina, carbamacepina, gabapentina, y pregabalina, incluyendo cualquier combinación de los anteriores.
- 10 Como se ha señalado anteriormente, ciertos sujetos están van a someterse, se están sometiendo o se han sometido a terapia con un agente cardiotoxico de otra manera, es decir, un agente que presenta cardiotoxicidad en su forma conjugada (un agente que no se conjuga con p97). Dichos sujetos se pueden beneficiar de la administración de un conjugado p97-agente, con respecto a la administración del agente solo, parcialmente debido a que el p97 puede ejercer un efecto cardioprotector sobre los agentes cardiotoxicos de otra manera por un mecanismo que se cree que
- 15 se diferencia de sus propiedades de transporte BBB. Por lo tanto, dichos sujetos se pueden tratar con un conjugado p97-agente para varios estados enfermos, incluyendo enfermedades del SNC descritas en el presente documento, y enfermedades relacionadas con tejidos periféricos no del SNC.
- 20 Los agentes cardiotoxicos a modo de ejemplo se han descrito en otro sitio del presente documento, y se puede identificar de acuerdo con técnicas de diagnóstico *in vivo* y de exploración *in vitro* bien conocidas. Véase Bovelli et al., 2010, supra; Inoue et al., AATEX 14, Special Issue, 457-462, 2007; y Dorr et al., Cancer Research. 48:5222-5227, 1988.
- 25 Por ejemplo, los sujetos sometidos a terapia con un agente que se sospecha cardiotoxico se pueden controlar por técnicas de imagen para evaluar la disfunción sistólica y diastólica del LV, enfermedad valvular cardíaca, pericarditis y derrame pericárdico, y lesiones en la arteria carótida. El acortamiento fraccional en LV y LVEF son los índices más comunes de la función sistólica del LV para la evaluación de la función cardíaca, por ejemplo, durante la quimioterapia. También, los índices diastólicos derivados del Doppler representan un signo precoz de disfunción del LV en pacientes sometidos a terapia, de manera que el patrón de flujo diastólico mitral, la relación del pico precoz de
- 30 velocidad de flujo respecto al pico de velocidad de flujo auricular (E/A), tiempo de deceleración de la onda E y tiempo de relajación isovolumico pueden ser útiles para detectar cambios diastólicos de la función del LV antes de que se produzca la disfunción sistólica. Se puede llevar a cabo un Doppler tisular pulsado durante el examen Doppler ecocardiográfico convencional; puede ser fiable en proporcionar una información cuantitativa de la relajación diastólica miocárdica y la actuación sistólica (velocidad de onda E', onda A' y onda S). El Doppler tisular del anillo mitral lateral del LV tiene un papel pronóstico reconocido y, en combinación con el Doppler PW del reflujo mitral,
- 35 proporciona una información precisa sobre el grado de presión de llenado del LV. Los cambios precoces en la función miocárdica del LV se ha identificado por Doppler tisular pulsado de múltiples sitios del LV, y pueden ser determinantes relevantes de cardiotoxicidad.
- 40 En realizaciones particulares, el agente cardiotoxico es un quimioterápico, y el sujeto tiene un cáncer. Los ejemplos específicos de cánceres incluyen, cánceres de mama, cánceres de próstata, cánceres gastrointestinales, cánceres de pulmón, cánceres ováricos, cánceres testiculares, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de estómago, cánceres pancreáticos, cánceres hepáticos, cánceres de riñón, carcinomas de células escamosas, cánceres del SNC y cerebrales (que se describen en el presente documento), melanomas, cánceres no melanomas, cánceres de
- 45 tiroides, cánceres endometriales, tumores epiteliales, cánceres de hueso, y cánceres hematopoyéticos.
- En realizaciones específicas, el sujeto tiene un cáncer que expresa Her2/neu, tal como un cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de estómago, cáncer uterino agresivo, o cáncer metastático, tal como un cáncer metastático del SNC, y el péptido p97 está conjugado con trastuzumab. Dichos pacientes pueden beneficiarse no solo de la sinergia resultante de la combinación de p97 y trastuzumab, especialmente en los cánceres del SNC, sino también de la
- 50 reducción de la cardiotoxicidad del trastuzumab, que resulta de los efectos cardioprotectores potenciales del p97.
- Como se ha señalado anteriormente, las enfermedades que se pueden tratar, mejorar o prevenir utilizando los métodos de la presente invención incluyen, pero no se limitan a las siguientes: distintos cánceres, afecciones neurológicas, afecciones que implican alteraciones del metabolismo del hierro, Mucopolisacaridosis I (MPS I), MPS II, MPS IIIA, MPS IIIB, leucodistrofia metacromática (MLD), Krabbe, Pompe, CLN2, Tay-Sachs, Niemann-Pick A y B y otras enfermedades lisosómicas. Para cada enfermedad el agente conjugado comprende un compuesto, proteína o enzima específicos. Para los métodos que implican la MPS I, el compuesto o enzima preferido es la α -L-iduronidasa. Para los métodos que implican MPS IIIA, el compuesto o enzima preferida es la heparano N-sulfatasa.
- 60 Para los métodos que implican la MPS IIIB, el compuesto o enzima preferidos es la α -N-acetilglucosaminidasa. Para los métodos que implican la leucodistrofia metacromática (MLD), el compuesto o enzima preferidos es Arilsulfatasa A. Para los métodos que implican Krabbe, el compuesto o enzima preferidos es la Galactosilceramidasa. Para los métodos que implican Pompe, el compuesto o enzima preferidos es la alfa-glucosidasa acida. Para los métodos que implican CLN, el compuesto o enzima preferidos es la tioesterasa. Para los métodos que implican Tay-Sachs, el
- 65 compuesto o enzima preferidos es la hexosaminidasa. Para los métodos que implican Niemann-Pick A y B el compuesto o enzima preferidos es la esfingomielinasa ácida. Para los métodos que implican otros trastornos de

glicogenosis el compuesto o enzima preferidos es glicolipidosis, mucopolisacaridosis, oligosacaridosis.

Los conjugados de fragmento de p97 de la presente invención se pueden administrar con un “vehículo farmacéuticamente aceptable”. Dichos vehículos engloban cualquiera de los vehículos, tampones y excipientes farmacéuticos convencionales, incluyendo solución salina tampón de fosfato, agua, y emulsiones (tales como emulsiones de aceite/agua o agua/aceite), y distintos tipos de agentes humectantes y/o adyuvantes. Los vehículos farmacéuticos aceptables y sus formulaciones se describen en Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co., Easton, 19ª ed. 1995). Los vehículos farmacéuticos preferidos dependen del medio de administración que se pretende del principio activo. Los modos típicos de administración se describen posteriormente.

La expresión “cantidad eficaz” significa una dosificación suficiente para producir un resultado deseado en una enfermedad, patología o afección de la salud de un sujeto o con fines diagnósticos. El resultado deseado puede comprender una mejoría subjetiva u objetiva en el receptor de la dosificación.

Un “tratamiento profiláctico” es un tratamiento que se administra a un sujeto que no presenta signos de una enfermedad o que presenta solo signos tempranos de una enfermedad, en el que el tratamiento se administra con el fin de disminuir el riesgo de desarrollar una patología.

Un “tratamiento terapéutico” es un tratamiento que se administra a un sujeto que presenta signos de patología, en el que el tratamiento se administra con el fin de disminuir o eliminar los signos patológicos. Los signos pueden ser subjetivos u objetivos.

El término “composición”, como en una composición farmacéutica, tiene la intención de englobar un producto que comprende el principio activo, e ingrediente(s) inerte(s) que componen el vehículo, así como cualquier producto que resulta, directa o indirectamente, de la combinación, formación de complejos o agregación de cualquiera de dos o más ingredientes, o por la disociación de uno o más de los ingredientes, o de otros tipos de reacciones o interacciones de uno o más de los ingredientes. En consecuencia, las composiciones farmacéuticas de la presente invención engloban cualquier composición producida por la mezcla de un conjugado del fragmento p97-agente de la presente invención y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

La expresión “composición farmacéutica” indica una composición adecuada para su uso farmacéutico en un sujeto, incluyendo un animal o ser humano. Una composición farmacéutica comprende en general una cantidad eficaz del fragmento p97 conjugado y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

Los conjugados se pueden administrar mediante varias vías. Para las preparaciones orales, los conjugados se pueden utilizar solos o en combinación con aditivos apropiados para fabricar comprimidos, polvos, gránulos o cápsulas, por ejemplo, con derivados de celulosa, goma arábiga, almidón de maíz o gelatinas, con desintegradores, tales como almidón de maíz, almidón de patata, o carboximetilcelulosa sódica; con lubricantes, tales como el talco o estearato magnésico; y si se desea, con diluyentes, agentes tampón, agentes humectantes, conservantes y agentes saborizantes.

Los conjugados fragmento p97-agente se pueden formular en preparaciones para inyección disolviendo, suspendiendo o emulsionándolos en un disolvente acuoso o no acuoso, tal como aceites vegetales u otros similares, glicéridos ácidos alifáticos, ésteres, de ácidos alifáticos superiores o propilenglicol; y si se desea, con aditivos convencionales tales como solubilizantes, agentes isotónicos, agentes suspensores, agentes emulsionantes, estabilizantes y conservantes.

Los conjugados de fragmento p97-agente se pueden utilizar en una formulación en aerosol para administrarse por inhalación. Los conjugados de la presente invención se pueden formular en propulsores presurizados tales como diclorodifluorometano, propano, nitrógeno y similares.

Además, los conjugados del fragmento p97-agente se pueden fabricar como supositorios mezclando varias bases tales como bases emulsionantes o bases hidrosolubles. Los conjugados de la presente invención se pueden administrar por vía rectal mediante un supositorio. El supositorio puede incluir vehículos tales como manteca de coco, carboceras y polietilenglicoles que se funden a la temperatura ambiente, aunque se solidifican a temperatura ambiente.

Se pueden proporcionar formas de dosificación unitarias de los conjugados de fragmento de p97-agente para la administración oral o rectal como, por ejemplo, como jarabes, elixires, y suspensiones en los que cada unidad de dosificación, por ejemplo, una cucharadita, cucharada, comprimido o supositorio, contiene una cantidad pre-determinada de la composición que contiene el principio activo. De manera similar, las formas de dosificación unitaria para inyección o administración intravenosa puede comprender el conjugado en una composición como solución en agua estéril, solución salina normal u otro vehículo farmacéuticamente aceptable. La expresión “forma de dosificación unitaria”, como se utiliza en el presente documento, se refiere a unidades separadas físicamente adecuadas como dosificaciones unitarias para sujetos humanos y animales, conteniendo cada unidad una cantidad pre-determinada de conjugados de la presente invención calculada como la cantidad suficiente para producir el

efecto deseado en asociación con un diluyente, vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Las especificaciones para las nuevas formas de dosificación unitarias de la presente invención dependen del conjugado particular que se emplee y el efecto que se va a conseguir, y la farmacodinamia asociada con cada compuesto en el huésped.

5 En su uso práctico, los conjugados de acuerdo con la invención se pueden combinar como el principio activo en una mezcla íntima con el vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas de composición farmacéuticas convencionales. El vehículo puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo la intravenosa). En la preparación de las
10 composiciones para una forma de dosificación oral, se pueden emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas tales como,
15 por ejemplo, polvos, cápsulas blandas o duras y comprimidos, siendo preferidas las preparaciones orales sólidas sobre la preparaciones líquidas.

Con respecto a las vías de administración transdérmica, los métodos de administración transdérmica de los fármacos se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 17^a Edición, (Gennaro et al. Eds., Mack Publishing Co., 1985). Son medios preferidos los parches dérmicos o cutáneos para el suministro transdérmico de los
20 conjugados del fragmento p97-agente de la invención. Los parches proporcionan preferentemente un potenciador de la absorción tal como el DMSO para aumentar la absorción de los conjugados. Otros métodos de suministro farmacológico transdérmico se desvelan en las Patentes de EE. UU. N° 5.962.012. 6.261.595. y 6.261.595.

25 Los excipientes farmacéuticamente aceptables, tales como los vehículos, adyuvantes, excipientes o diluyentes, están disponibles en el mercado. Además, las sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables, tales como los agentes de ajuste del pH y tampón, agentes de ajuste de la tonicidad, estabilizantes, agentes humectantes y similares están disponibles en el mercado.

30 Los expertos en la técnica apreciarán fácilmente que los niveles de dosis pueden variar en función del agente específico, la gravedad de los síntomas y la susceptibilidad del sujeto a los efectos secundarios. Las dosificaciones preferidas para un conjugado determinado son fácilmente determinables por los expertos en la técnica mediante varios medios.

En cada uno de estos aspectos, las composiciones incluyen pero no se limitan a, composiciones adecuadas para la
35 administración oral, rectal, tópica, parenteral (incluyendo la subcutánea, intramuscular, e intravenosa), pulmonar (inhalación nasal o bucal), o administración nasal, aunque la vía adecuada en cualquier caso dependerá en parte de la naturaleza y gravedad de las afecciones que se van a tratar y de la naturaleza del principio activo. Las vías de administración a modo de ejemplo son la vía oral y la intravenosa. Las composiciones se pueden presentar convenientemente en forma de dosificación unitaria y se preparan por cualquiera de los métodos bien conocidos en
40 la técnica de farmacia.

En su uso práctico, los conjugados de acuerdo con la invención se pueden combinar como el principio activo en una mezcla íntima con el vehículo farmacéutico de acuerdo con las técnicas de composición farmacéuticas convencionales. El vehículo puede tener una amplia variedad de formas dependiendo de la forma de preparación deseada para la administración, por ejemplo, oral o parenteral (incluyendo la intravenosa). En la preparación de las
45 composiciones para una forma de dosificación oral, se pueden emplear cualquiera de los medios farmacéuticos habituales, tales como, por ejemplo, agua, glicoles, aceites, alcoholes, agentes saborizantes, conservantes, agentes colorantes, y similares en el caso de preparaciones líquidas orales, tales como, por ejemplo, suspensiones, elixires y soluciones; o vehículos tales como almidones, azúcares, celulosa microcristalina, diluyentes, agentes granulantes, lubricantes, aglutinantes, agentes desintegrantes y similares en el caso de preparaciones orales sólidas tales como,
50 por ejemplo, polvos, cápsulas blandas o duras y comprimidos, siendo preferidas las preparaciones orales sólidas sobre la preparaciones líquidas.

Debido a su facilidad de administración, los comprimidos y capsulas representan la forma de dosificación unitaria
55 oral más ventajosa en cuyo caso obviamente se emplean vehículos farmacéuticos sólidos. Si se desea, los comprimidos se pueden revestir por técnicas acuosas o no acuosas convencionales. El porcentaje de un ingrediente activo en estas composiciones pueden, por supuesto, variarse y pueden estar convenientemente entre aproximadamente un 2 por ciento a aproximadamente el 60 por ciento del peso de la unidad.

60 Los conjugados de la invención son útiles para la intervención terapéutica, profiláctica y diagnóstica en animales, y en particular en seres humanos.

Las composiciones de la presente invención se pueden administrar encapsulados en o unidos a envolturas víricas o
65 vesículas. Los liposomas son vesículas formadas a partir de una membrana bicapa. Las vesículas adecuadas incluyen, pero no se limitan a, vesículas unilaminares o vesículas lipídicas multilaminares o liposomas. Dichas vesículas y liposomas se pueden producir a partir de un intervalo amplio de compuestos lipídicos o fosfolipídicos,

tales como fosfatidilcolina, ácido fosfatídico, fosfatidilserina, fosfatidiletanolamina, esfingomiélna, glicolípidos, gangliósidos, etc. utilizando técnicas convencionales, tales como las que se describen, por ejemplo, en la Patente de EE. UU. N° 4.394.448. Dichas vesículas o liposomas se pueden utilizar para administrar conjugados intracelularmente y para suministrar los conjugados en los órganos diana. También se puede conseguir la liberación controlada de una composición de interés con p97 utilizando la encapsulación (véase, por ejemplo, la Patente de EE. UU. N° 5.186.941).

En ciertos aspectos, la secuencia del polipéptido p97 y el agente, cada uno individualmente o como un conjugado pre-existente, están unidos o encapsulados en una partícula, por ejemplo, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica, o liposoma, por ejemplo, un inmunoliposoma. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la secuencia del polipéptido p97 se une a la superficie de una partícula, y el agente de interés se une a la superficie de la partícula y/o se encapsula en la partícula. En algunas de estas realizaciones y las relacionadas, el polipéptido p97 y el agente están unidos covalente u operativamente entre ellos solo mediante la propia partícula (por ejemplo, nanopartícula, liposoma), y o están unidos covalentemente entre ellos de ninguna otra manera; es decir, están unidos individualmente a la misma partícula. En otras realizaciones, el polipéptido p97 y el agente se conjugan primero covalente o no covalentemente entre ellos, como se describe en el presente documento (por ejemplo, mediante una molécula enlazadora), y después se unen o encapsulan en una partícula (por ejemplo, inmunoliposoma, nanopartícula). En realizaciones específicas, la partícula es un liposoma, y la composición comprende uno o más de polipéptidos p97, uno o más agentes de interés, y una mezcla de lípidos para formar un liposoma (por ejemplo, fosfolípidos, cadenas lipídicas mezcladas con propiedades tensioactivas). En algunos aspectos, el polipéptido p97 y el agente están mezclados individualmente con la mezcla lipídica/liposoma, de manera que la formación de las estructuras liposómicas se operativamente el polipéptido p97 y el agente sin necesidad de conjugación covalente. En otros aspectos, el polipéptido p97 y el agente se conjugan primero covalente o no covalentemente entre ellos, como se ha descrito en el presente documento, y después se mezclan con los lípidos para formar un liposoma. El polipéptido p97, el agente, o el conjugado p97-agente pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli-(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro farmacológico coloidal (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, micro-emulsiones, nanopartículas y nanocápsulas), o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980). La partícula(s) o liposomas pueden comprender otros agentes terapéuticos o diagnósticos, tales como agentes citotóxicos.

Se puede utilizar cualquier vía de administración que ponga en contacto los conjugados con las células, tejidos, u órganos diana. Los conjugados se pueden administrar periférica o centralmente. Los conjugados se pueden administrar también por vía intravenosa o intraperitoneal. Los conjugados se pueden administrar local o regionalmente.

Las dosificaciones que se van a administrar dependerán de las necesidades y características individuales (edad, peso, gravedad de la afección, el efecto deseado, el agente activo que se utilice, y la vía de administración y régimen de tratamiento escogidos). Las dosificaciones preferidas de los conjugados del fragmento p97 varían desde aproximadamente 0,02 pmol/kg a aproximadamente 2,5 nmol/kg, y particularmente las dosificaciones preferidas varían desde 2-250 pmol/kg; de manera alternativa, las dosis preferidas del conjugado del fragmento p97 puede estar en el intervalo de 0,02 a 2000 mg/kg. Estas dosificaciones estarán influenciadas por el número de restos de agentes asociados con cada molécula de fragmento de p97. Además, las dosificaciones se pueden calcular basándose en el agente que se va a administrar y la gravedad de la afección que se va a tratar. Los métodos empíricos y teóricos para determinar las relaciones dosis respuesta y la optimización de las dosificaciones empleadas en la terapia de pacientes individuales son bien conocidos por un experto habituado en la técnica.

Los conjugados del fragmento p97 de la invención son, por ejemplo, útiles para la intervención con el tratamiento terapéutico y profiláctico de enfermedades de almacenamiento lisosómico en animales, y en particular en seres humanos. Los métodos de que se trata tienen utilidad en el tratamiento de varias enfermedades de almacenamiento lisosómico diferentes. En ciertas realizaciones, es de particular interés el uso de los métodos que se tratan en afecciones de enfermedad en el que el principio activo que tiene la actividad deseada se han identificado anteriormente, pero en la que los principios activos no se dirigen adecuadamente al sitio, área o compartimento diana. Con dicho principio activo, se pueden utilizar los métodos que se tratan para aumentar la eficacia terapéutica y el índice terapéutico del agente activo.

Los conjugados del fragmento p97 de la invención son, por ejemplo, útiles para el suministro de agentes terapéuticos o diagnósticos a través de la barrera hematoencefálica.

Tratamiento significa que engloba cualquier resultado beneficioso a un sujeto, que se asocia con la administración de un conjugado, que incluye una disminución de la probabilidad de adquirir una enfermedad, la prevención de una enfermedad, el entretimiento, parada o inversión de la progresión de una enfermedad o una mejora de los síntomas asociados con la afección de enfermedad que aflige al huésped, en la que la mejora o beneficio se utiliza en un amplio sentido para referirse a al menos a una reducción en la gravedad de la enfermedad o en una magnitud de un parámetro representativo de la gravedad o presencia de la enfermedad, por ejemplo, un daño tisular, muerte

celular, exceso o cantidades perjudiciales de materiales de almacenamiento lisosómico, síntomas, asociados con la afección patológica que se va a tratar, tal como la inflamación y el dolor asociado con la misma. Como tal, tratamiento incluye también, pero no se limita a, situaciones en las que la afección patológica, o al menos los síntomas asociados con la misma, se inhiben completamente, por ejemplo, se evita que ocurran, o se paren, por ejemplo, se terminan, de manera que el huésped no sufre durante más tiempo la afección patológica, o al menos los síntomas que caracterizan la afección patológica.

Varios huéspedes o sujetos son tratables de acuerdo con los métodos que se tratan. En general dichos sujetos son "mamíferos" o "de mamíferos", en los que estos términos se utilizan ampliamente para describir organismos que están en la clase de los mamíferos, que incluyen los órdenes carnívora (por ejemplo, perros y gatos), rodentia (por ejemplo, ratones, cobayas y ratas), y primates (por ejemplo, humanos, chimpancés, y monos). En muchas realizaciones, los huéspedes o sujetos serán seres humanos.

Los métodos para identificar sujetos con una o más de las enfermedades o afecciones que se describen en el presente documento se conocen en la técnica.

También se incluyen métodos para crear imágenes de un componente de un órgano o tejido en un sujeto, que comprende (a) la administración al sujeto una composición que comprende un polipéptido p97 (melanotransferrina) humano, o una variante del mismo, en el que el polipéptido p97 se conjuga con una entidad detectable, y (b) visualizar la entidad detectable en el sujeto, órgano, o tejido.

En realizaciones particulares, el compartimento del órgano o tejido comprende el sistema nervioso central (por ejemplo, cerebro, tronco cerebral, médula espinal). En realizaciones específicas, el compartimento del órgano o tejido comprende el cerebro o una parte del mismo, por ejemplo, el parénquima el cerebro.

Se pueden emplear varios métodos para visualizar la entidad detectable en el sujeto, órgano o tejido. Los métodos no invasivos a modo de ejemplo incluyen la radiografía, tal como la fluoroscopia y las radiografías proyeccionales, exploración CT o exploración CAT (tomografía computarizada (CT) o tomografía axial computarizada (CAT)), o empleando exploración CT por rayos X, tomografía de emisión de positrones (PET), o tomografía computarizada de emisión de un único protón (SPECT), y ciertos tipos de creación de imágenes por resonancia magnética (MRI), especialmente los que utilizan agentes de contraste, incluyendo las combinaciones de los mismos.

Simplemente a modo de ejemplo, se puede llevar a cabo la PETG con agentes de contraste de emisión de positrones o radioisótopos tales como ^{18}F , se puede llevar a cabo la SPECT con agentes de contraste de emisión gamma o radioisótopos tales como ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tl}$, ^{123}I , y ^{67}Ga , y la MRI se puede llevar a cabo con agentes de contraste o radioisótopos tales como ^3H , ^{13}C , o, ^{17}O , ^{23}Na , ^{31}P , y ^{129}Xe , y Gd (gadolinio; complejos de Gd (III) orgánico quelado). Cualquiera de uno o más de estos agentes de contraste a modo de ejemplo o radioisótopos se pueden conjugar con o incorporarse de otra manera en un polipéptido p97 y administrarse a un sujeto con fines de creación de imágenes. Por ejemplo, se pueden marcar directamente los polipéptidos p97 con uno o más de estos radioisótopos, o conjugados con moléculas (por ejemplo, moléculas pequeñas) que comprenden uno o más de estos agentes de contraste radioisotópicos, o cualquier otro descrito en el presente documento.

Ejemplos

Ejemplo 1

DIGESTIÓN DE P97 HUMANO CON HIDROXILAMINA

Incluso aunque los estudios previos han demostrado que la MTf soluble es capaz de suministrar hierro, paclitaxel y adriamicina a través de la BBB en el cerebro, era deseable determinar si una versión menor de la MTf soluble era capaz de mantener su capacidad de cruzar la BBB y funcionar más eficazmente.

Analizando la secuencia de la MTf soluble (véase la Figura 1; los restos 20-709 de la MTf humana de longitud completa), se determinó que la hidroxilamina, un compuesto inorgánico podría acortar la secuencia de MTf soluble significativamente sin afectar su sitio de unión al hierro. Uno de los fragmentos resultantes de MTf era de aproximadamente 60-70 kDa de tamaño (véase la Figura 2). Se predijo que la digestión completa de MTf con hidroxilamina resultaría en cuatro fragmentos (~ 60-70 kDa, ~ 2,5 kDa, ~ 5,5 kDa, y ~ 5,8 kDa), cuyos tamaños se basan en la migración esperada en una 1-D de gel SDS-PAGE. Los fragmentos completamente digeridos de la MTf soluble incluye los restos de aminoácidos 1-564 (SEQ ID NO: 1), restos 565-586 (SEQ ID NO: 2), restos 587-637 (SEQ ID NO: 3) y restos 638-690 (SEQ ID NO: 4).

También se predijeron los fragmentos parcialmente digeridos. Por ejemplo, los fragmentos parcialmente digeridos de la MTf soluble incluye los restos de aminoácidos 1-586 (SEQ ID NO: 5), restos 1-637 (SEQ ID NO: 6), restos 565-637 (SEQ ID NO: 7), restos 565-690 (SEQ ID NO: 8), y restos 587-690 (SEQ ID NO: 9).

La digestión se llevó a cabo disolviendo 5 g de hidrocloreto de hidroxilamina (Sigma: 255580) en 5 M de NaOH. El

pH se ajustó a 9,0. El p97 humano se mezcló con una solución de hidroxilamina, a una concentración final de 2,4 M de hidroxilamina. La mezcla se incubó durante 2-3 días a 42 °C. La reacción se terminó añadiendo 0,1 volúmenes de ácido acético o acidificando la mezcla a pH de 4,5 con ácido acético glacial. La mezcla se enfrió a 4 °C. Entonces se dializó contra un 5 % de ácido acético O/N. A continuación se dializó contra PBS O/N.

5

Ejemplo 2

BIODISTRIBUCIÓN Y FARMACOCINÉTICA DEL FRAGMENTO DE P97 DE 60 KD.

10 Con el fin de determinar si el fragmento de p97 mantenía la capacidad del p97 de longitud completa para atravesar la BBB, el fragmento de MTf se radiomarcó con ¹²⁵I y se suministra en los ratones mediante inyección en la vena caudal (Figura 3). Los estudios de biodistribución y farmacocinética descritos en el presente documento demuestran que el fragmento de MTf era capaz de absorberse rápidamente del suero al igual que la MTf, aunque una cantidad significativa de IgG permanecía en la circulación después de la primera 0,5 hora (Figura 4).

15

La distribución cerebral de MTf, el fragmento de MTf y la IgG de control se analizó durante un tiempo de 24 horas después de una única inyección I.V. Los datos se presentan como el porcentaje de dosis inyectada normalizada al peso muscular (%ID/g BM; Figura 5), así como la relación entre los recuentos radioactivos (CPM) en un gramo de tejido con respecto a un microlitro de suero (Vd; Figura 6). Estos resultados demostraban que el fragmento de MTf sigue un perfil similar que la MTf con una disminución gradual durante un periodo de 24 horas. Cuando la distribución de la MTf, el fragmento de MTf y la IgG se normalizaba a los niveles del suero (Vd), los resultados demuestran que la MTf y el fragmento de MTf se distribuyen en el cerebro 5x más que la IgG. En conjunto, estos datos sugieren que el fragmento de MTf es capaz de atravesar la BBB y acumularse en el cerebro de maneja similar a la de la MTf. Se llevaron a cabo análisis similares estudiando el corazón, hígado, riñón, pulmón y bazo, como se muestra en las Figuras 9-18.

20

25

Estos resultados sugieren fuertemente que los fragmentos de MTf tienen potencial como alternativa a la MTf de longitud completa o soluble como vehículo de suministro farmacológico. Una ventaja de este sería reducir el tamaño total del vehículo y la cantidad de proteína por molécula del "fármaco terapéutico" que se tendrá que suministrar en cada dosis terapéutica.

30

El alcance completo de los equivalentes para los que dichas reivindicaciones están legitimadas. En consecuencia las reivindicaciones no se limitan por la divulgación.

35

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> Jefferies, Wilfred

<120> FRAGMENTOS P97 CON ACTIVIDAD DE TRANSFERENCIA

40

<130> BIOA-004/01WO 315702-2013

<150> US 61/515.792

<151> 05-08-2011

45

<160> 13

<170> PatentIn versión 3.5

50

<210> 1

<211> 564

<212> PRT

<213> *Homo sapiens*

55

<400> 1

ES 2 654 111 T3

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

ES 2 654 111 T3

Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr
 420 425 430

Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu
 435 440 445

Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro
 450 455 460

Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile
 465 470 475 480

Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn
 485 490 495

Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu
 500 505 510

Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly
 515 520 525

Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu
 530 535 540

Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe
 545 550 555 560

Asp Asn Thr Asn

<210> 2
 <211> 22
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 2

Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Cys Pro Asn
 20

10

<210> 3
 <211> 51
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 3

ES 2 654 111 T3

Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg
 85 90 95
 Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His
 100 105 110
 Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala
 130 135 140
 Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu Thr
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly
 165 170 175
 Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr Ser
 180 185 190
 Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 195 200 205
 Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr Leu Pro Ser
 210 215 220
 Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu Cys Arg Asp
 225 230 235 240
 Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg
 245 250 255
 Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu
 260 265 270
 Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser His Glu Gly
 275 280 285
 Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu
 290 295 300
 Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr
 305 310 315 320
 Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys Gly Leu

ES 2 654 111 T3

				325						330						335
Leu	Cys	Asp	Pro	Asn	Arg	Leu	Pro	Pro	Tyr	Leu	Arg	Trp	Cys	Val	Leu	
			340					345					350			
Ser	Thr	Pro	Glu	Ile	Gln	Lys	Cys	Gly	Asp	Met	Ala	Val	Ala	Phe	Arg	
		355					360					365				
Arg	Gln	Arg	Leu	Lys	Pro	Glu	Ile	Gln	Cys	Val	Ser	Ala	Lys	Ser	Pro	
	370					375					380					
Gln	His	Cys	Met	Glu	Arg	Ile	Gln	Ala	Glu	Gln	Val	Asp	Ala	Val	Thr	
385					390					395					400	
Leu	Ser	Gly	Glu	Asp	Ile	Tyr	Thr	Ala	Gly	Lys	Lys	Tyr	Gly	Leu	Val	
				405					410					415		
Pro	Ala	Ala	Gly	Glu	His	Tyr	Ala	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Asn	Ser	Tyr	
			420					425					430			
Tyr	Val	Val	Ala	Val	Val	Arg	Arg	Asp	Ser	Ser	His	Ala	Phe	Thr	Leu	
		435					440					445				
Asp	Glu	Leu	Arg	Gly	Lys	Arg	Ser	Cys	His	Ala	Gly	Phe	Gly	Ser	Pro	
	450					455					460					
Ala	Gly	Trp	Asp	Val	Pro	Val	Gly	Ala	Leu	Ile	Gln	Arg	Gly	Phe	Ile	
465					470					475					480	
Arg	Pro	Lys	Asp	Cys	Asp	Val	Leu	Thr	Ala	Val	Ser	Glu	Phe	Phe	Asn	
				485					490						495	
Ala	Ser	Cys	Val	Pro	Val	Asn	Asn	Pro	Lys	Asn	Tyr	Pro	Ser	Ser	Leu	
			500					505					510			
Cys	Ala	Leu	Cys	Val	Gly	Asp	Glu	Gln	Gly	Arg	Asn	Lys	Cys	Val	Gly	
		515					520					525				
Asn	Ser	Gln	Glu	Arg	Tyr	Tyr	Gly	Tyr	Arg	Gly	Ala	Phe	Arg	Cys	Leu	
	530					535					540					
Val	Glu	Asn	Ala	Gly	Asp	Val	Ala	Phe	Val	Arg	His	Thr	Thr	Val	Phe	
545					550					555					560	
Asp	Asn	Thr	Asn	Gly	His	Asn	Ser	Glu	Pro	Trp	Ala	Ala	Glu	Leu	Arg	
				565					570					575		

ES 2 654 111 T3

Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn
 580 585

<210> 6
 <211> 637
 5 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 6

Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu Gln His Lys
 1 5 10 15

Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser
 20 25 30

Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val Gln Leu Ile
 35 40 45

Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Ile Tyr
 50 55 60

Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr
 65 70 75 80

Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg
 85 90 95

Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His
 100 105 110

Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu
 115 120 125

Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala
 130 135 140

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

Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly
 165 170 175

Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr Ser
 180 185 190

Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 195 200 205

ES 2 654 111 T3

Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr Leu Pro Ser
 210 215 220
 Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu Cys Arg Asp
 225 230 235 240
 Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg
 245 250 255
 Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu
 260 265 270
 Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser His Glu Gly
 275 280 285
 Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu
 290 295 300
 Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr
 305 310 315 320
 Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys Gly Leu
 325 330 335
 Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp Cys Val Leu
 340 345 350
 Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg
 355 360 365
 Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Lys Ser Pro
 370 375 380
 Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr
 385 390 395 400
 Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Lys Tyr Gly Leu Val
 405 410 415
 Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr
 420 425 430
 Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu
 435 440 445
 Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro
 450 455 460

ES 2 654 111 T3

Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile
 465 470 475 480

Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn
 485 490 495

Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu
 500 505 510

Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly
 515 520 525

Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu
 530 535 540

Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe
 545 550 555 560

Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg
 565 570 575

Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val
 580 585 590

Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val
 595 600 605

Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp
 610 615 620

Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
 625 630 635

<210> 7
 <211> 73
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5

<400> 7

Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala
 20 25 30

Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val Met Val Arg Pro
 35 40 45

10

ES 2 654 111 T3

Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp
 50 55 60

Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
 65 70

5 <210> 8
 <211> 126
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 8

Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr
 1 5 10 15

Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala
 20 25 30

Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val Met Val Arg Pro
 35 40 45

Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp
 50 55 60

Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser
 65 70 75 80

Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg
 85 90 95

Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu
 100 105 110

Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met Ser Ser Gln Gln Cys
 115 120 125

10
 <210> 9
 <211> 104
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 9

Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln
 1 5 10 15

Ile Pro Pro His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr
 20 25 30

ES 2 654 111 T3

Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His
 35 40 45

Asn Lys Asn Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln
 50 55 60

Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu
 65 70 75 80

Lys Thr Thr Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu
 85 90 95

Glu Gly Met Ser Ser Gln Gln Cys
 100

5 <210> 10
 <211> 14
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

10 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(14)
 <223> Cebador

15 <400> 10
 gcggacttcc tcgg 14

20 <210> 11
 <211> 13
 <212> ADN
 <213> *Homo sapiens*

25 <220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(13)
 <223> Cebador

30 <400> 11
 tcgagagctt cct 13

35 <210> 12
 <211> 690
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 12

Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu Gln His Lys
 1 5 10 15

Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser
 20 25 30

ES 2 654 111 T3

Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val Gln Leu Ile
 35 40 45
 Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Ile Tyr
 50 55 60
 Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr
 65 70 75 80
 Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg
 85 90 95
 Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His
 100 105 110
 Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu
 115 120 125
 Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala
 130 135 140
 Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu Thr
 145 150 155 160
 Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly
 165 170 175
 Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr Ser
 180 185 190
 Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 195 200 205
 Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys Thr Leu Pro Ser
 210 215 220
 Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu Leu Cys Arg Asp
 225 230 235 240
 Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg
 245 250 255
 Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu
 260 265 270
 Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg Leu Phe Ser His Glu Gly

ES 2 654 111 T3

Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu
 290 295 300

Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr
 305 310 315 320

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys Gly Leu
 325 330 335

Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg Trp Cys Val Leu
 340 345 350

Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg
 355 360 365

Arg Gln Arg Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Lys Ser Pro
 370 375 380

Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr
 385 390 395 400

Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Lys Tyr Gly Leu Val
 405 410 415

Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr
 420 425 430

Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu
 435 440 445

Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro
 450 455 460

Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile
 465 470 475 480

Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn
 485 490 495

Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu
 500 505 510

Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly
 515 520 525

ES 2 654 111 T3

Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu
530 535 540

Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe
545 550 555 560

Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg
565 570 575

Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val
580 585 590

Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val
595 600 605

Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp
610 615 620

Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Lys
625 630 635 640

Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp
645 650 655

Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Arg Gly
660 665 670

Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met Ser Ser Gln
675 680 685

Gln Cys
690

<210> 13
<211> 690
<212> PRT
<213> *Mus musculus*

5

<400> 13

Val Met Glu Val Gln Trp Cys Thr Ile Ser Asp Ala Glu Gln Gln Lys
1 5 10 15

Cys Lys Asp Met Ser Glu Ala Phe Gln Gly Ala Gly Ile Arg Pro Ser
20 25 30

Leu Leu Cys Val Gln Gly Asn Ser Ala Asp His Cys Val Gln Leu Ile
35 40 45

10

ES 2 654 111 T3

Lys Glu Gln Lys Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly Ala Ile Tyr
 50 55 60

Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr
 65 70 75 80

Asp Gln Asp Ile Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg
 85 90 95

Asn Ser Asn Val Thr Ile Asn Thr Leu Lys Gly Val Lys Ser Cys His
 100 105 110

Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu
 115 120 125

Val Glu Ser Gly His Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys Ala
 130 135 140

Val Gly Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Thr Gly Glu Thr
 145 150 155 160

Ser His Ser Glu Ser Leu Cys Arg Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly
 165 170 175

His Asn Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg Tyr Tyr Asp Tyr Ser
 180 185 190

Gly Ala Phe Arg Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val
 195 200 205

Lys His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Asn Thr Leu Pro Ser
 210 215 220

Trp Gly Lys Ser Leu Met Ser Glu Asp Phe Gln Leu Leu Cys Arg Asp
 225 230 235 240

Gly Ser Arg Ala Asp Ile Thr Glu Trp Arg Arg Cys His Leu Ala Lys
 245 250 255

Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg Gly Asp Met Asp Gly Gly Leu
 260 265 270

Ile Phe Gln Leu Leu Asn Glu Gly Gln Leu Leu Phe Ser His Glu Asp
 275 280 285

Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Lys Ala Tyr Ser Gln Lys Asn Leu
 290 295 300

ES 2 654 111 T3

Leu Phe Lys Asp Ser Thr Leu Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Asn
 305 310 315 320

Tyr Glu Ala Trp Leu Gly Gln Glu Tyr Leu Gln Ala Met Lys Gly Leu
 325 330 335

Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro His Tyr Leu Arg Trp Cys Val Leu
 340 345 350

Ser Ala Pro Glu Ile Gln Lys Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Ser
 355 360 365

Arg Gln Asn Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Glu Ser Pro
 370 375 380

Glu His Cys Met Glu Gln Ile Gln Ala Gly His Thr Asp Ala Val Thr
 385 390 395 400

Leu Arg Gly Glu Asp Ile Tyr Arg Ala Gly Lys Val Tyr Gly Leu Val
 405 410 415

Pro Ala Ala Gly Glu Leu Tyr Ala Glu Glu Asp Arg Ser Asn Ser Tyr
 420 425 430

Phe Val Val Ala Val Ala Arg Arg Asp Ser Ser Tyr Ser Phe Thr Leu
 435 440 445

Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Pro Tyr Leu Gly Ser Pro
 450 455 460

Ala Gly Trp Glu Val Pro Ile Gly Ser Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile
 465 470 475 480

Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Gln Phe Phe Asn
 485 490 495

Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ala Leu
 500 505 510

Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Lys Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly
 515 520 525

Ser Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Ser Gly Ala Phe Arg Cys Leu
 530 535 540

Val Glu His Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys His Thr Thr Val Phe
 545 550 555 560

ES 2 654 111 T3

Glu Asn Thr Asn Gly His Asn Pro Glu Pro Trp Ala Ser His Leu Arg
 565 570 575

Trp Gln Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val
 580 585 590

Asp Gln Phe Gln Ala Cys Asn Leu Ala Gln Met Pro Ser His Ala Val
 595 600 605

Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp
 610 615 620

Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Gln
 625 630 635 640

Met Phe Asp Ser Ser Lys Tyr His Ser Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp
 645 650 655

Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Arg Glu Lys Thr Thr Tyr Leu Asp
 660 665 670

Trp Leu Gly Pro Asp Tyr Val Val Ala Leu Glu Gly Met Leu Ser Gln
 675 680 685

Gln Cys
 690

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, que comprende un polipéptido p97 aislado que consiste en (a) una secuencia de aminoácidos seleccionada de entre el grupo que consiste en SEQ ID NO: 1 y 5-6, (b) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos un 97 % de identidad a lo largo de su longitud con una secuencia de (a), o (c) una secuencia de aminoácidos que difiere de una secuencia de (a) por la adición o la eliminación de 1, 2, 3, 4, o 5 restos del extremo N y/o del extremo C, donde el polipéptido p97 está unido covalente u operativamente a un agente para formar un conjugado p97-agente, y en donde el polipéptido p97 es capaz de unirse al receptor del p97.
2. El conjugado de la reivindicación 1, en el que el polipéptido p97 consiste en una secuencia de aminoácido seleccionada de entre el grupo que consiste en las SEQ ID NO: 1 y 5-6.
3. El conjugado de las reivindicaciones 1 o 2, en el que el agente es una molécula pequeña, un polipéptido o un marcador (entidad detectable).
4. El conjugado de la reivindicación 3, en el que la molécula pequeña es un agente citotóxico o quimioterápico o anti-angiogénico seleccionado de entre uno o más de agentes alquilantes, anti-metabolitos, antraciclina, antibióticos anti-tumorales, platinos, inhibidores de la topoisomerasa tipo I, inhibidores de la topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca y taxanos.
5. El conjugado de la reivindicación 3, en el que la molécula pequeña se selecciona de entre uno o más de clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalan, procarbacin, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfan, daunorrubicina, doxorubicina, gefitinib, erlotinib idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecina, irinotecan, topotecan, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus, everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, paclitaxel, imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudil, SB-681323, semaxanib, donapizil, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasigilina, naltrexona, lubiprostona, safinamida, istradefilina, pimavanserina, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina, bexaroteno, acetato de glatirímero, fingolimod y mitoxantrona, incluyendo sales y ácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.
6. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de unión al antígeno del mismo.
7. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo o el fragmento de unión al antígeno del mismo se unen específicamente a uno o más de Her2/neu humano, Her1/EGFR, CD20, VEGF, CD52, CD33, CTLA-4, tenascina, alfa-4 (α 4) integrina, IL-12, IL-23, la subunidad p40 de IL-12/IL-23, amiloide β ($A\beta$), Huntingtina, CD25, factor de crecimiento nervioso (NGF), TrkA, TNF- α , TNF- β o α -sinucleína.
8. El conjugado de la reivindicación 6, en el que el anticuerpo se selecciona de entre uno o más de trastuzumab, cetuximab, daclizumab, tanezumab, 3F8, abagovomab, adalimumab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatuzumab (mertansina), brentuximab vedotin, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, certolizumab, citatuzumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetan), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicin), girentuximab, glembatumumab (vedotin), golimumab, ibritumomab tiuxetan, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, infliximab, intetumumab, inotuzumab ozogamicin, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radioactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilatumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, tucotuzumab (celmoleucina), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab y zalutumumab, incluyendo fragmentos de unión al antígeno del mismo.
9. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido es un interferón- β polipeptídico, o un fragmento o una variante activos del mismo.
10. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el polipéptido se asocia a una enfermedad de almacenamiento lisosómico.
11. El conjugado de la reivindicación 10, en el que el polipéptido se selecciona de entre uno o más de aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, α -galactosidasa A, ceramidasa ácida, α -L-

- fucosidasa, β -hexosaminidasa A, activador de GM2-gangliósido (GM2A), α -D-manosidasa, β -D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, α -N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa, subunidad γ de fosfotransferasa, L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparano-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetilCoA: N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, catepsina A, catepsina K, α -galactosidasa B, NPC1, NPC2, sialina y transportador de ácido siálico, incluyendo fragmentos activos y variantes de los mismos.
- 5
12. El conjugado de la reivindicación 1, que comprende el polipéptido p97 conjugado con un anticuerpo y una
10 pequeña molécula.
13. El conjugado de la reivindicación 3, en el que el agente es un agente cardiotóxico.
14. El conjugado de la reivindicación 13, en el que el agente cardiotóxico es una antraciclina/antraquinolona,
15 ciclofosfamida, antimetabolitos, agente antimicrotubular, inhibidor de la tirosina cinasa, bevacizumab o trastuzumab.
15. El conjugado de la reivindicación 13, en el que el agente cardiotóxico es ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo,
capecitabina, paclitaxel, docetaxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C,
20 erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfan, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona o mitoxantrona.

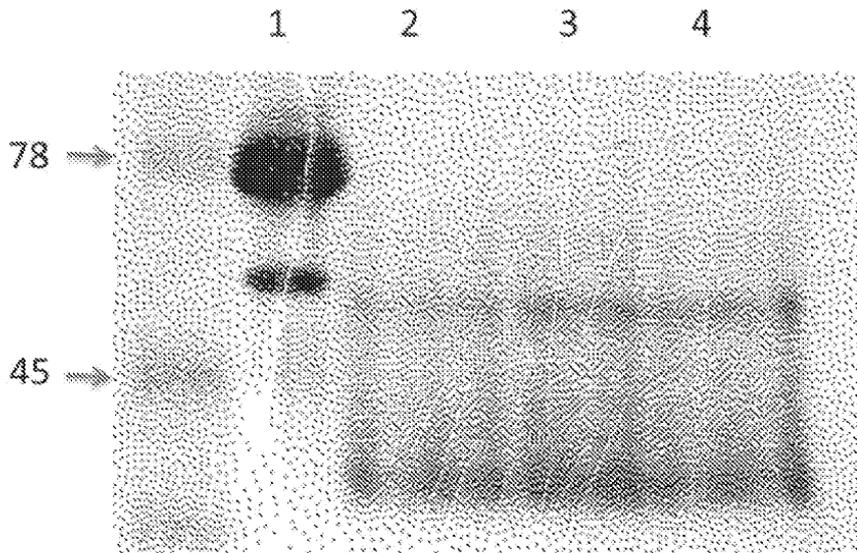


FIG. 2

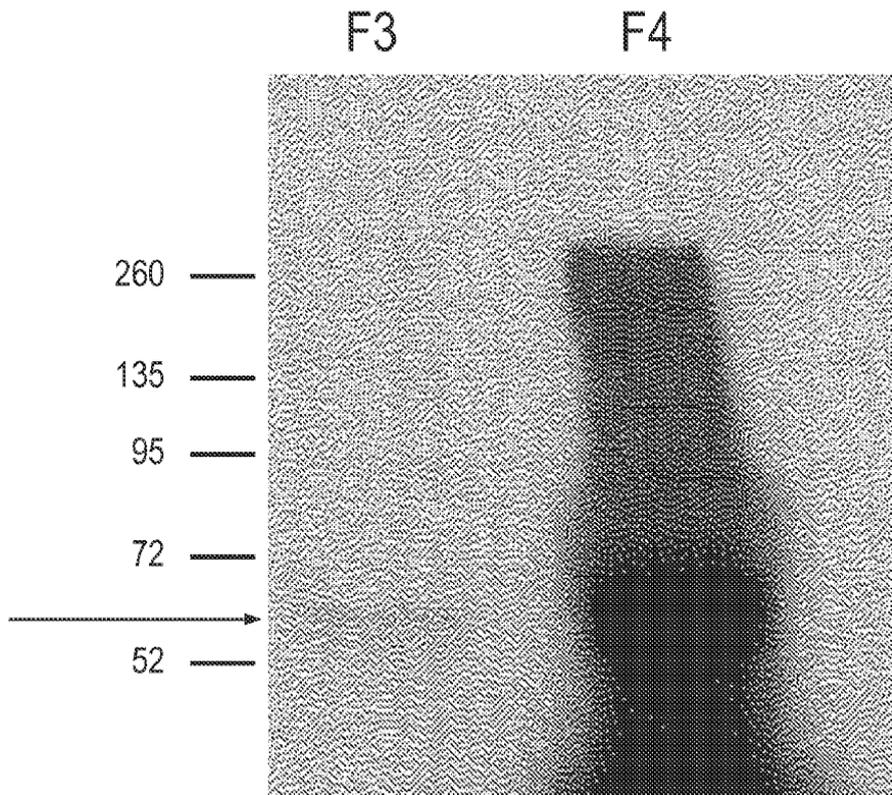


FIG. 3

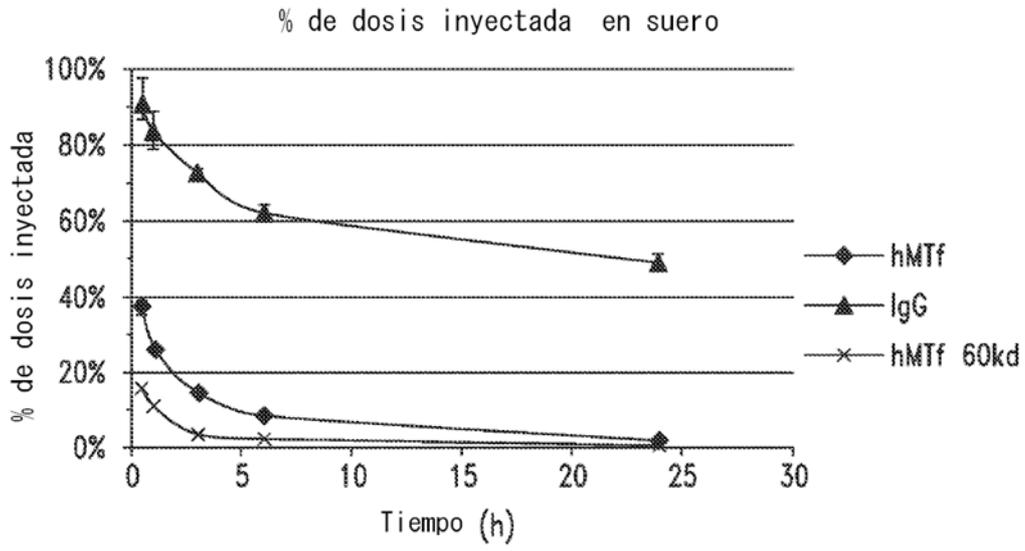


FIG. 4

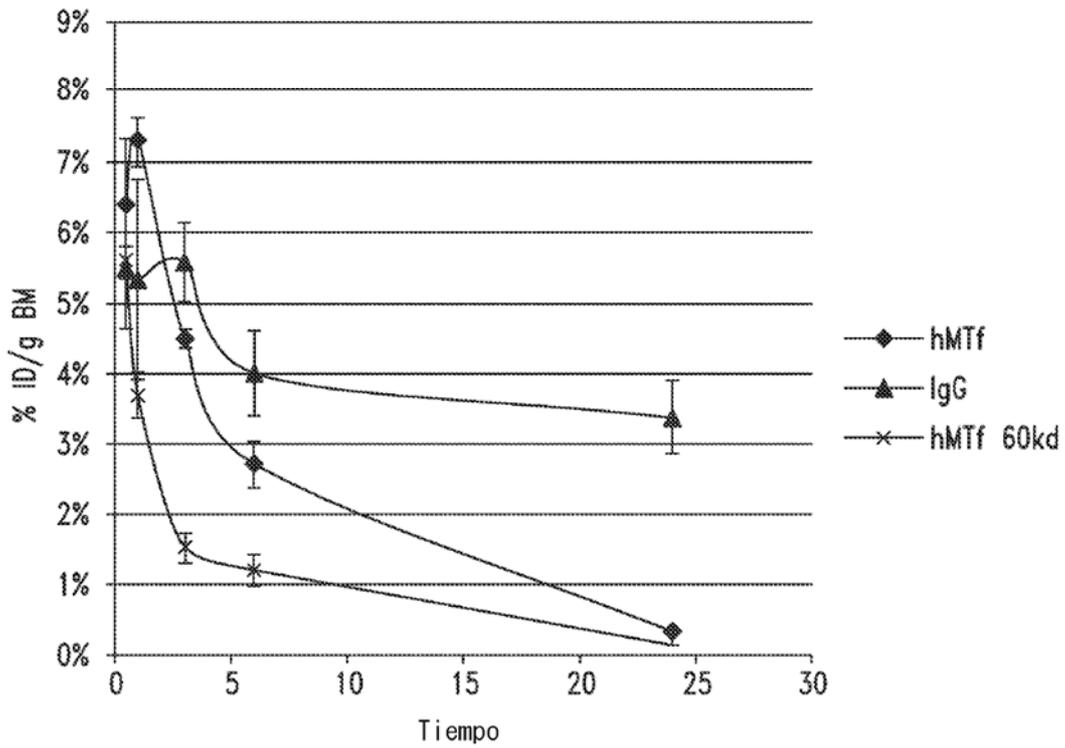


FIG. 5

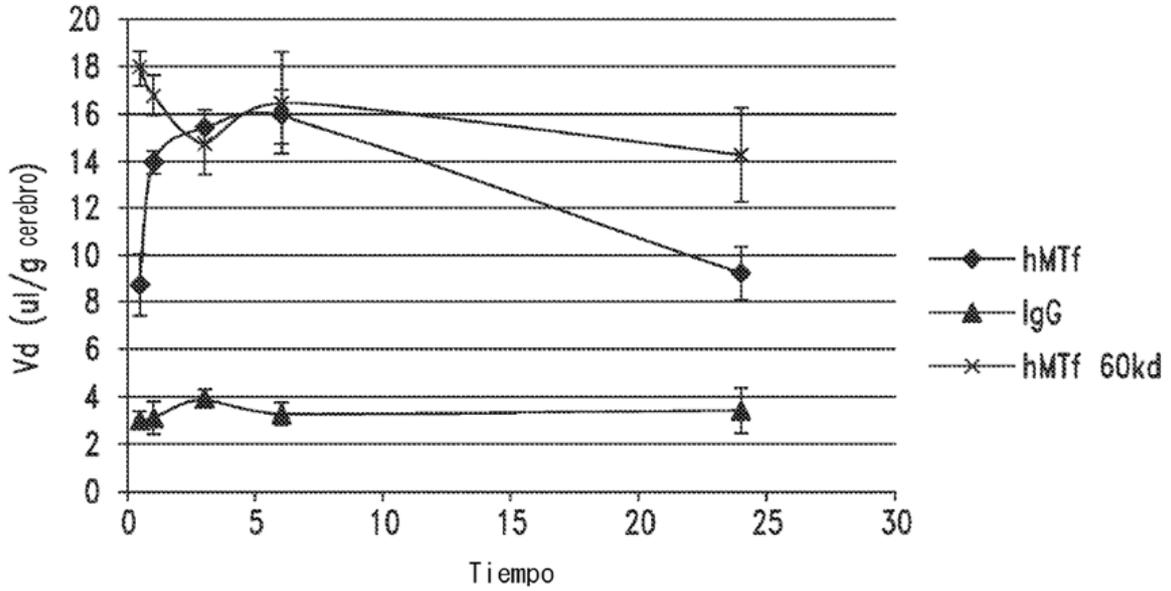


FIG. 6

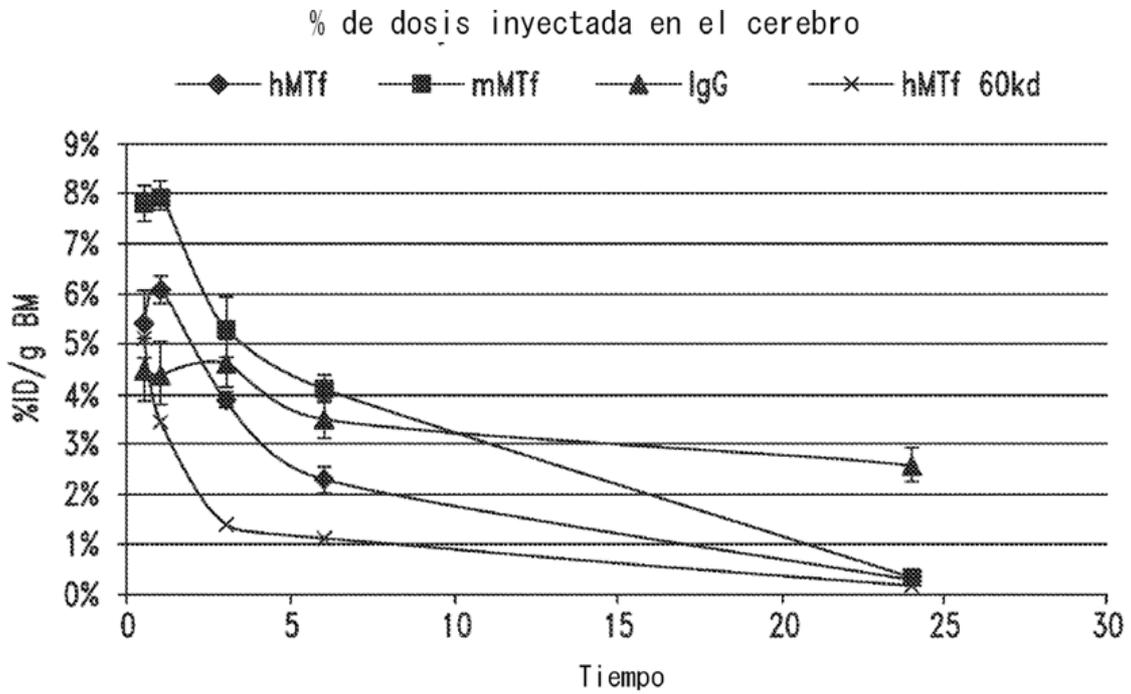


FIG. 7

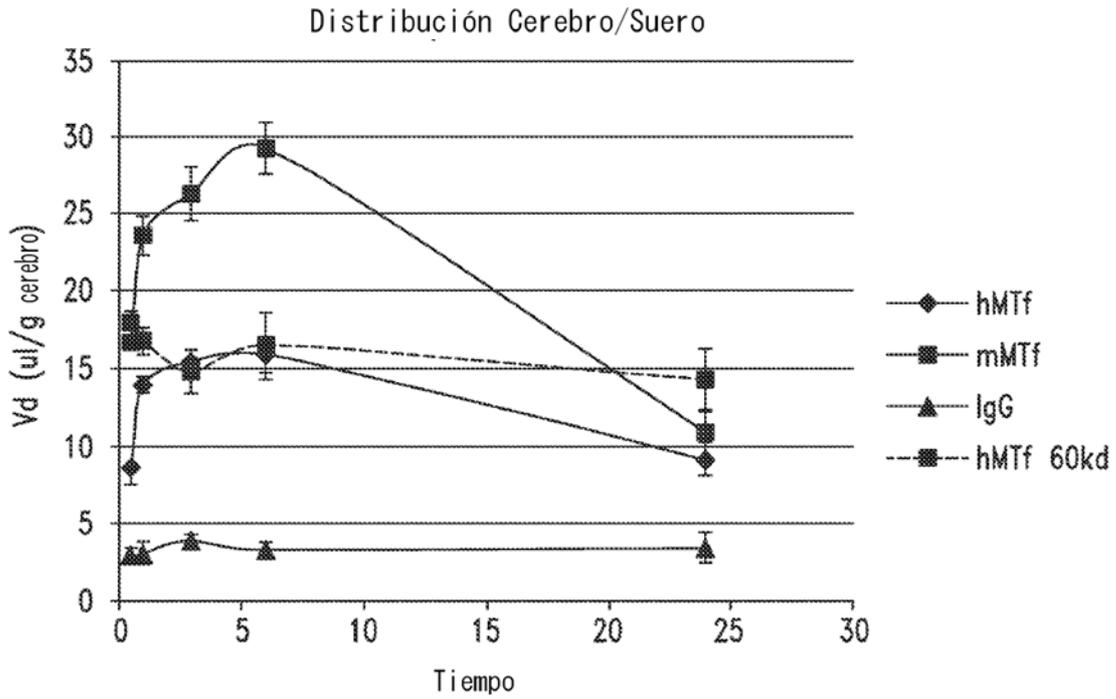


FIG. 8

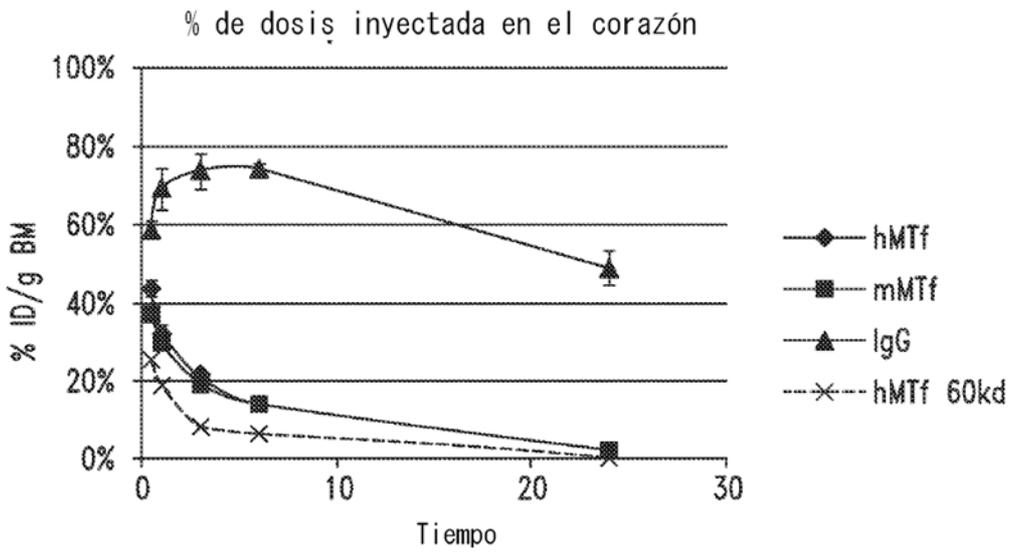


FIG. 9

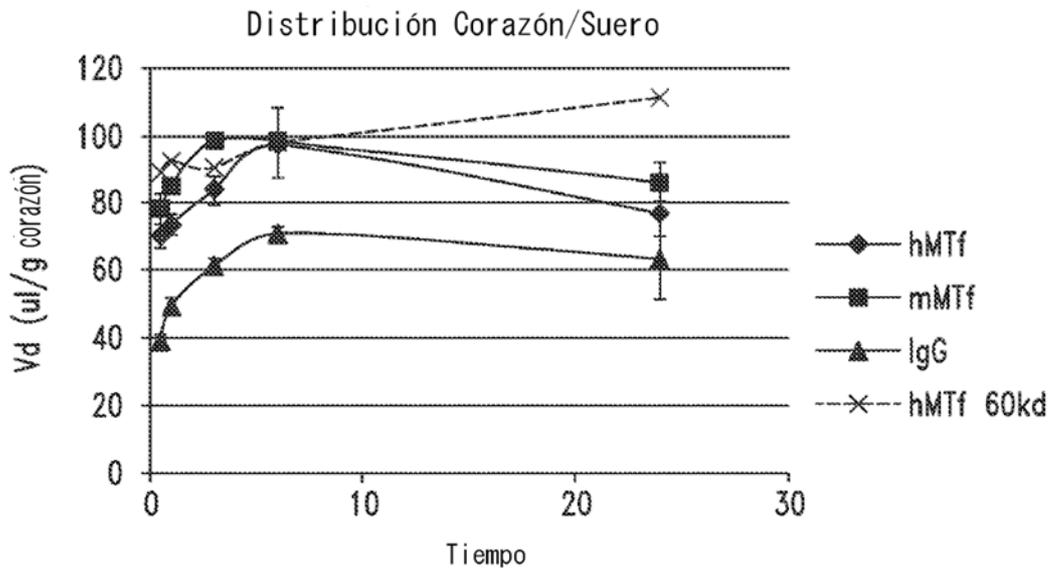


FIG. 10

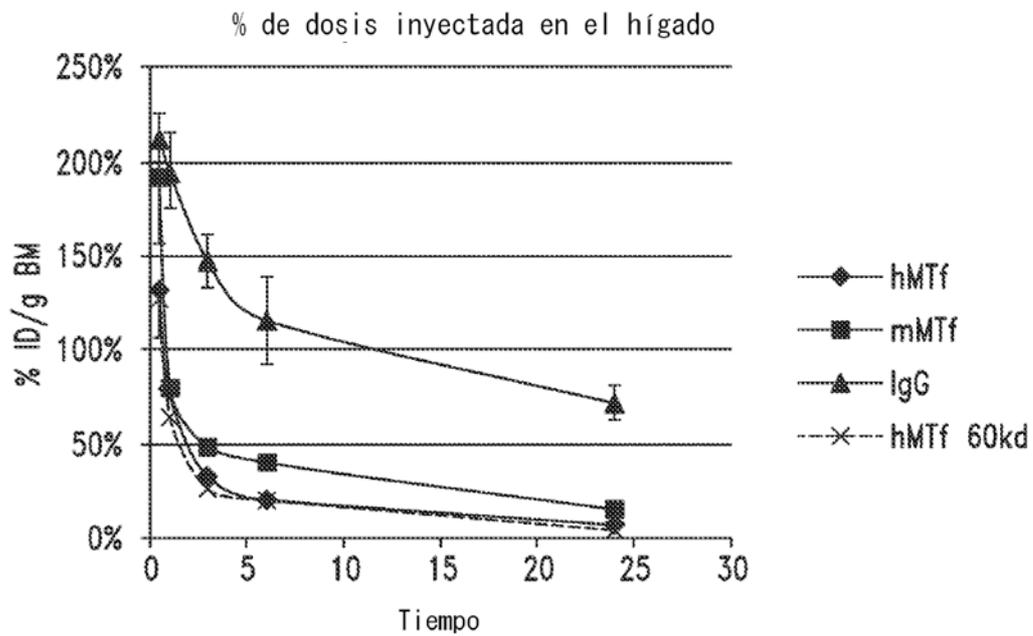


FIG. 11

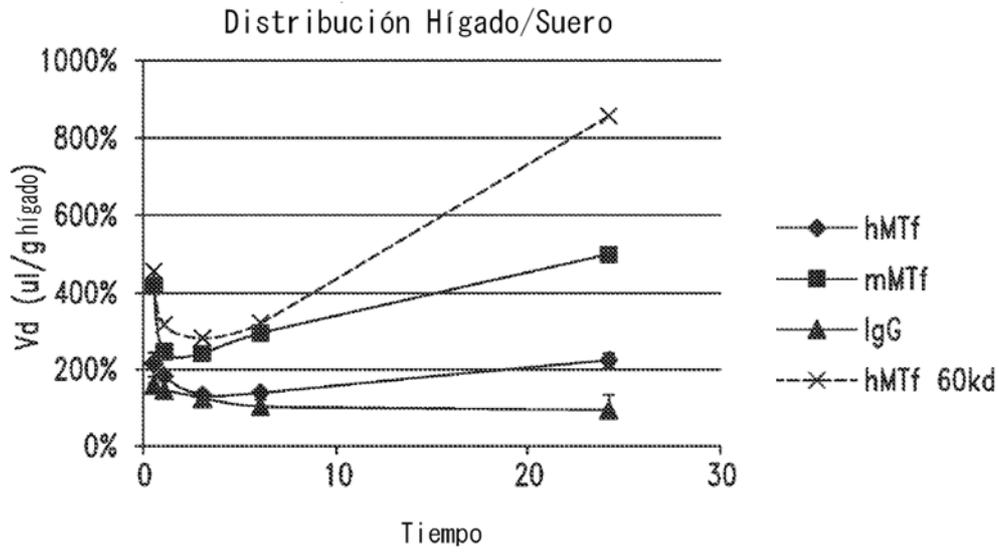


FIG. 12

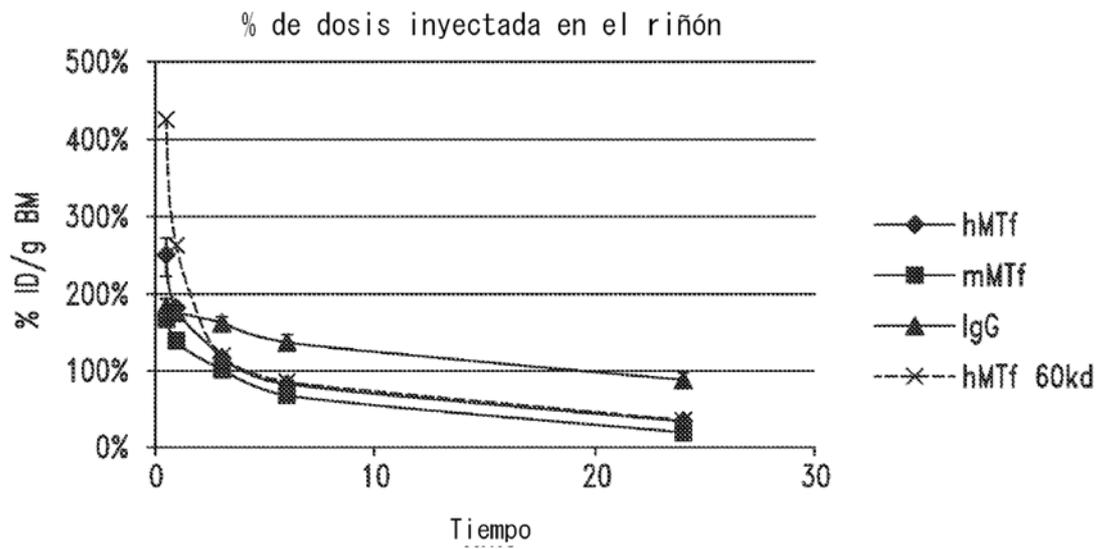


FIG. 13

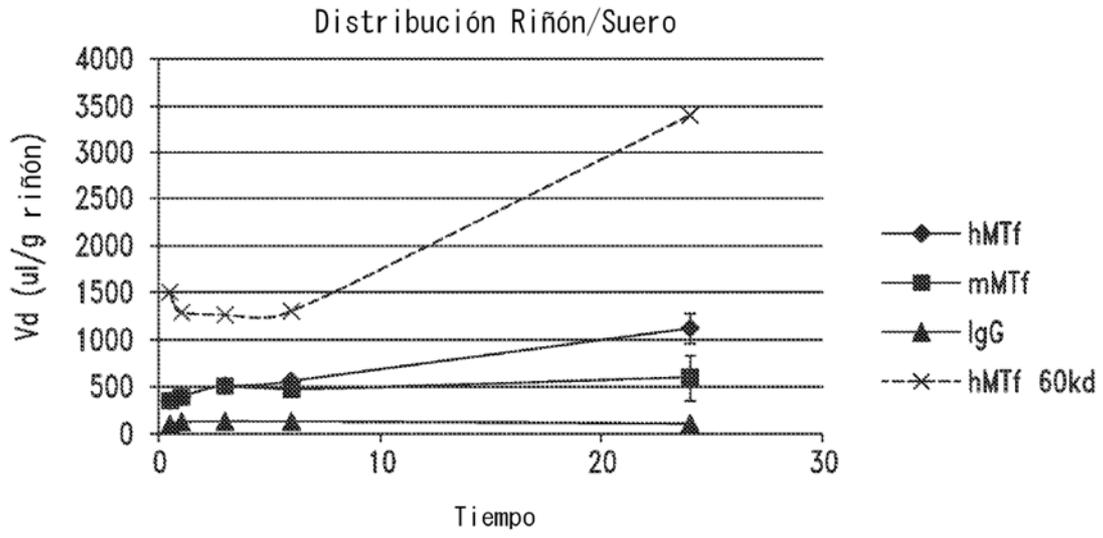


FIG. 14

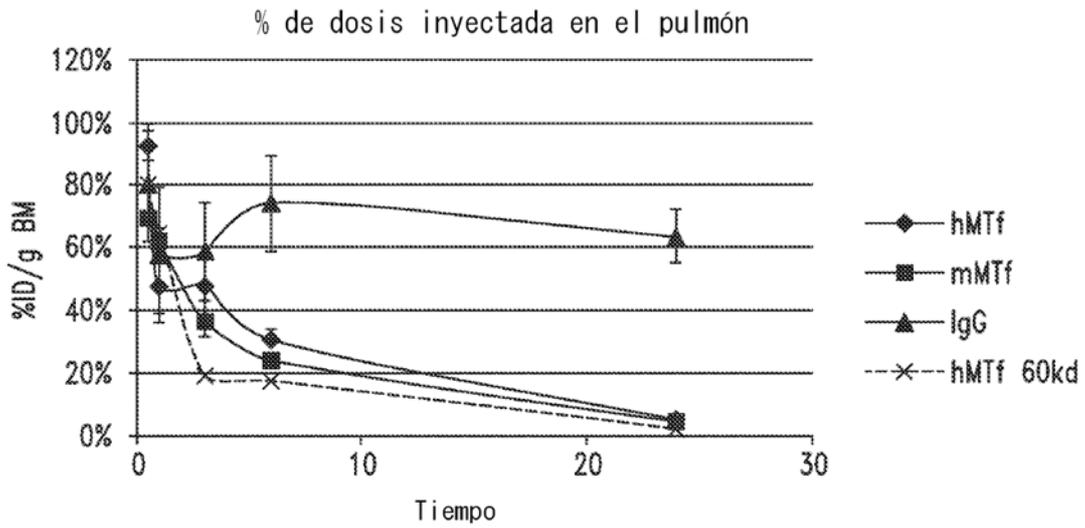


FIG. 15

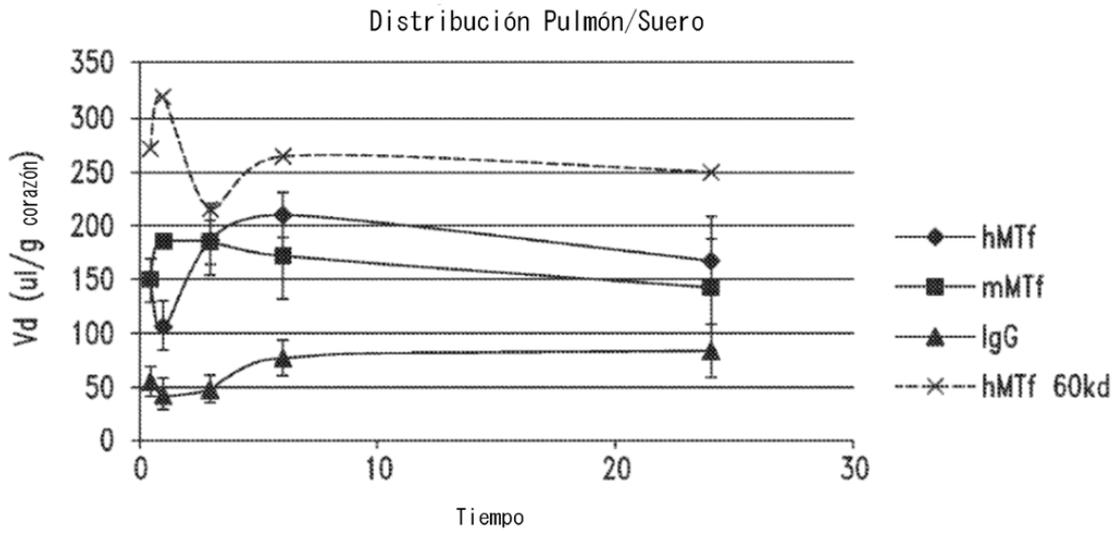


FIG. 16

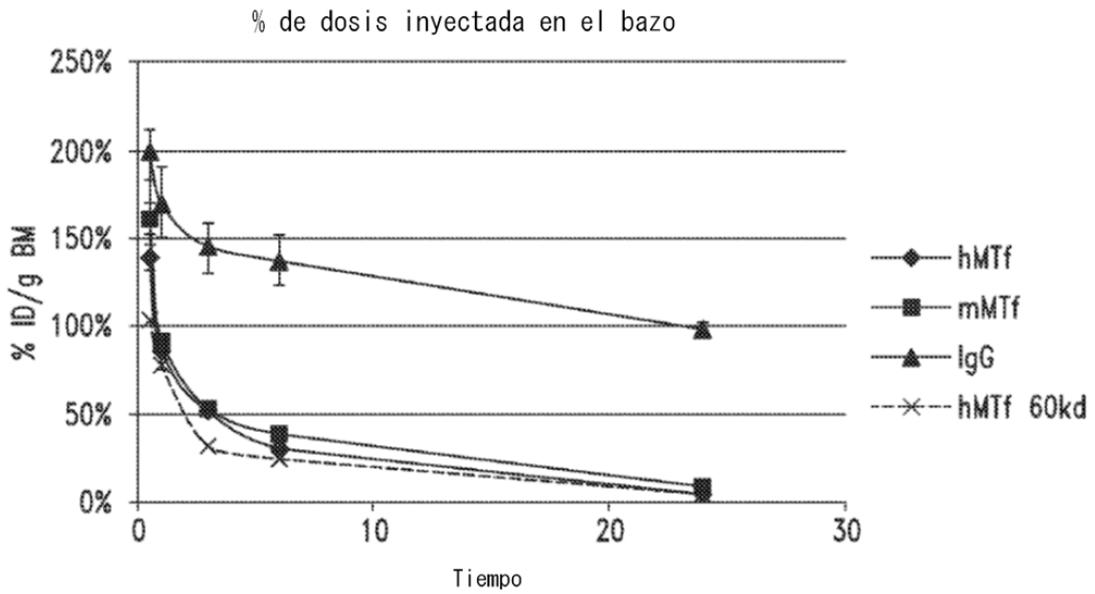


FIG. 17

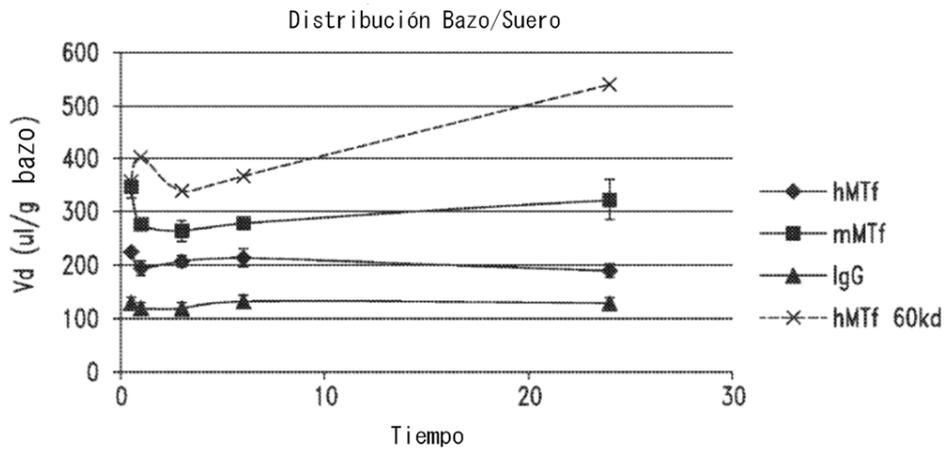


FIG. 18