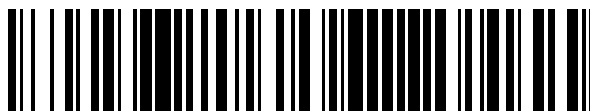


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 674 567**

51 Int. Cl.:

C12N 15/62 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.05.2011 PCT/US2011/037459**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.11.2011 WO11146902**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.05.2011 E 11729797 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018 EP 2571992**

54 Título: **Proteínas de fusión biespecíficas**

30 Prioridad:

21.05.2010 US 347040 P
20.05.2011 US 201113068808
20.05.2011 US 201113112907

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
02.07.2018

73 Titular/es:

MERRIMACK PHARMACEUTICALS, INC. (100.0%)
One Kendall Square Suite B7201
Cambridge, MA 02139, US

72 Inventor/es:

NIELSEN, ULRIK;
WICKHAM, THOMAS;
SCHOEBERL, BIRGIT;
HARMS, BRIAN;
LINGGI, BRYAN;
ONSUM, MATTHEW;
DELABARRE, BYRON y
LIPPOW, SHAUN, M.

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

Observaciones :

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

ES 2 674 567 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

Proteínas de fusión biespecíficas

5 **Campo técnico**

La presente invención se refiere, en general, a proteínas de fusión que tienen usos terapéuticos y, más específicamente, a proteínas de fusión biespecíficas, a composiciones farmacéuticas que comprenden dichas proteínas de fusión y a métodos para el uso de dichas proteínas de fusión para reparar tejido dañado.

10

Antecedentes

La regeneración de tejido es una ciencia multidisciplinar en la que el objetivo es restaurar la función biológica de tejidos dañados o enfermos. La regeneración de tejidos aborda problemas clínicos importantes, tales como infarto de miocardio. El infarto de miocardio, conocido habitualmente como ataque de corazón, se produce cuando una obstrucción en las arterias coronarias corta el flujo sanguíneo a parte del corazón. La falta resultante de oxígeno produce daños tisulares irreversibles (necrosis y apoptosis), debido a la incapacidad del corazón para activar suficientemente los programas de regeneración endógena y autoreparación. Dicho daño tisular es una causa principal de insuficiencia cardíaca congestiva, una afección en la que el corazón ya no es capaz de bombear sangre con eficacia. En Estados Unidos, hay más de un millón de ataques cardíacos todos los años y casi 5 millones de personas están afectadas por insuficiencia cardíaca congestiva.

15

20

25

No hay tratamientos eficaces para regenerar el tejido cardíaco dañado. Las terapias actuales para la insuficiencia cardíaca congestiva, se centran en la prevención de arritmias, la progresión de la arteriosclerosis y el infarto de miocardio recurrente, pero no abordan el daño tisular subyacente. Más de la mitad de los pacientes con un diagnóstico de insuficiencia cardíaca congestiva mueren en un plazo de cinco años desde el diagnóstico.

30

La terapia con células madre es una nueva estrategia potencial para la reparación cardíaca. En el laboratorio, es posible generar células musculares cardíacas a partir de células madre. Esto sugiere que podrían usarse células madre para reparar tejido dañado, tal como tejido cardíaco, en un paciente; sin embargo, actualmente no hay disponibles tratamientos terapéuticos basados en dicho enfoque. Una dificultad que se ha encontrado en la terapia de células madre es la de dirigir un número suficiente de células madre al tejido dañado para producir una reparación clínicamente significativa.

35

Hay, por lo tanto, una necesidad en la técnica de métodos para reparar o regenerar tejidos dañados, y para mejorar el direccionamiento de células tales como células madre para facilitar la reparación del tejido. La presente invención satisface estas necesidades y proporciona otras ventajas relacionadas.

Sumario de la invención

40

La presente divulgación proporciona proteínas de fusión biespecíficas, moléculas de ácido nucleico que codifican proteínas de fusión biespecíficas y métodos terapéuticos que emplean tales proteínas de fusión biespecíficas. En ciertos aspectos, la presente divulgación proporciona proteínas de fusión biespecíficas que comprenden: (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con una célula dañada de un tejido, en el que la molécula es intracelular en una célula viable y expuesta al espacio extracelular en la célula dañada; y (b) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor del factor de crecimiento asociado con una superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador al receptor del factor de crecimiento, el dominio activador se une al receptor del factor de crecimiento para modular la regeneración o la supervivencia del tejido. En algunas realizaciones, la proteína biespecífica comprende además un modulador de la semivida peptídica. Un aspecto de la invención proporciona una proteína de fusión biespecífica como se establece en la reivindicación 1.

45

50

55

60

En ciertos aspectos de la divulgación, la proteína biespecífica de fusión comprende (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con una célula dañada de un tejido, en el que la molécula es intracelular en una célula viable y expuesta al espacio extracelular en la célula dañada; (b) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador a la molécula asociada a la superficie, el dominio activador se une a la molécula asociada a la superficie para modular la regeneración o la supervivencia del tejido; y (c) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

65

En otros aspectos de la divulgación, la proteína biespecífica de fusión comprende (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con un tejido; (b) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador a la molécula, el dominio activador se une a la molécula para modular la regeneración o la supervivencia del tejido; y (c) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida

modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

5 En otros aspectos de la divulgación, la proteína biespecífica de fusión comprende (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con un tejido; (b) un dominio unión tiene una especificidad de unión a un molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio unión a la molécula, el dominio de unión se une a la molécula para estimular la regeneración o la supervivencia del tejido; y (c) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

10 Todavía otros aspectos de la divulgación se refieren a una proteína de fusión que comprende (a) al menos un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a al menos una molécula diana asociada con un tejido; (b) al menos un dominio activador que tiene una especificidad de unión al menos a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador a la molécula, el dominio activador se une a la molécula para estimular la regeneración o la supervivencia del tejido; y (c) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína de fusión.

15 En algunas realizaciones, el dominio activador o el dominio de unión se une específicamente a un receptor del factor de crecimiento, receptor de citocinas o antígeno asociado a las células madre. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento no tiene una actividad biológica. El dominio de direccionamiento y el dominio activador pueden unirse a diferentes moléculas en una misma célula o pueden unir diferentes moléculas en diferentes células.

20 En algunas realizaciones, el dominio activador se selecciona entre el grupo que consiste en: factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento epidérmico (EGF), neuregulina/herregulina (NRG/HRG), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), timosina, factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de células madre (SCF)/factor de crecimiento de mastocitos (MGF), periostina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), factor derivado de células estromales (SDF), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de tetracarcinoma (TDGF), factor de crecimiento neural beta (NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), trombotopoyetina (TPO), proteína morfogenética ósea (BMP), activina A, betacelulina, beta-catenina, homólogo dickkopf 1 (DKK1), eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HBEGF), insulina, interleucina (IL) factor inhibidor de la leucemia (LIF), proteína 1 quimiotáctica de monocitos (MCP1/CCl2), pleiotrofina (PTN), factor transformante de crecimiento (TGF), factor de necrosis tumoral (TNF), Wnt, un anticuerpo que tiene una especificidad para un receptor activador, variantes de los mismos, isoformas de los mismos, fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio activador comprende una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 o 50-64.

30 El dominio de direccionamiento puede estar en el extremo amino y el dominio activador en el extremo carboxi de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento está en el extremo carboxi y el dominio activador está en el extremo amino de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento está en el extremo carboxi y el dominio activador está en el extremo amino de la proteína de fusión.

45 En algunas realizaciones, el modulador de la semivida es una proteína no inmunogénica. El modulador de la semivida puede comprender una secuencia de una de seroalbúmina humana, el dominio III de la seroalbúmina humana, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, el dominio Fc del anticuerpo de transtiretina, la versión monocatenaria del dominio Fc de anticuerpo, secuencias ricas en prolina, alanina y/o serina, variantes de los mismos, fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos. Por ejemplo, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 80 % a una secuencia de aminoácidos de la seroalbúmina. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida tiene una secuencia descrita en cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105.

50 En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento se une a una molécula diana seleccionada del grupo de miosina, miosina cardíaca, ADN, fosfatidilserina, P-selectina, ICAM-1, c-Met (receptor del HGF), variantes de los mismos, fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento se une a la molécula diana con una constante de disociación K_d que varía desde 10^{-6} M a 10^{-12} M. El dominio de direccionamiento se puede seleccionar del grupo de anexina, sinaptotagmina, anticuerpo anti-fosfatidilserina, PS4A7, lactadherina, anticuerpo anti-miosina, anticuerpo anti-ADN, aDNAS11, aDNAS12, variantes de los mismos, fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1-2, 30-31, 72-73, 76-83 o 85-86. En algunas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo scFv que tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 73, 76-80. En algunas realizaciones, la anexina es anexina V y tiene la secuencia descrita en las SEC ID. NOs 31, 81, 82 o 83. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento comprende una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31 o 72-86.

65 En algunas realizaciones, la proteína biespecífica de fusión comprende además un conector que une el modulador de la semivida a la proteína de fusión. la proteína biespecífica de fusión puede exhibir una semivida *in vivo* de entre

2 horas y 6 horas, entre 6 horas y 24 horas, más de 24 horas o más de una semana.

5 En algunas realizaciones, la proteína de fusión estimula el reclutamiento celular, la inhibición de la apoptosis y/o la inducción de la proliferación celular. En algunas realizaciones, la proteína de fusión previene el daño celular, estimula el crecimiento celular, estimula la motilidad las células madre y/o estimula la diferenciación de las células madre. En algunas realizaciones, la proteína de fusión estimula la regeneración tisular. El tejido puede ser un tejido cardíaco, tejido renal, hueso, cartílago, articulaciones, piel, tejido hepático, tejido pancreático, células sanguíneas, tejido pulmonar o sistema nervioso.

10 En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un polipéptido líder. El polipéptido líder puede comprender una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 41,42, 87-91 o 244.

15 En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende además un marcador de afinidad de polipéptido. En algunas realizaciones, el marcador de afinidad está en el extremo amino de la proteína de fusión, en el extremo carboxi de la proteína de fusión o en el medio de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende un polipéptido que comprende hexahistidina. El polipéptido que comprende hexahistidina puede tener una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 43, 44 o 92-94.

20 Los agentes de unión biespecíficos proporcionados en el presente documento no están necesariamente limitados a dos especificidades de unión. En determinadas realizaciones, además del dominio de direccionamiento, la proteína biespecífica de fusión comprende dos o más dominios activadores que están unidos directa o indirectamente a través de enlaces peptídicos. En determinadas realizaciones, además del dominio activador, la proteína biespecífica de fusión comprende dos o más dominios de direccionamiento que están unidos directa o indirectamente a través de enlaces peptídicos.

25 En otros aspectos, la presente divulgación proporciona composiciones farmacéuticas, que comprenden una proteína de fusión biespecífica como se ha descrito anteriormente en combinación con un vehículo fisiológicamente aceptable.

30 En aún aspectos adicionales, se proporcionan métodos para tratar el daño tisular patológico en un paciente, que comprenden administrar una composición farmacéutica a un paciente que padece daño tisular patológico y, de este modo, disminuir el daño tisular patológico en el paciente.

35 Los aspectos de la divulgación se refieren a un método de estimulación de la regeneración o supervivencia de tejido en un sujeto, comprendiendo el método (a) proporcionar una proteína de fusión biespecífica que comprende (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con una célula dañada de un tejido, en el que la molécula es intracelular en una célula viable y expuesta al espacio extracelular en la célula dañada; y (ii) un dominio activador que tiene una especificidad de unión al receptor del factor de crecimiento; y (b)) administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína biespecífica de fusión de modo que el dominio de direccionamiento se une específicamente a la molécula diana asociada con la célula dañada del tejido, dirigiendo de este modo la proteína biespecífica de fusión a una primera célula del tejido y, de modo que, tras la exposición del dominio activador al receptor del factor de crecimiento, el dominio activador activa específicamente el receptor del factor de crecimiento de una segunda célula para estimular la regeneración tisular.

45 En algunas realizaciones, el método de estimulación de la regeneración o supervivencia tisular en un sujeto comprende (a) proporcionar una proteína de fusión biespecífica que comprende (i) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana; (ii) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor; (iii) un modulador de la semivida, en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión; y (b)) administrar a un paciente que lo necesite una cantidad terapéuticamente eficaz de la proteína biespecífica de fusión de modo que el dominio de direccionamiento se une específicamente a la molécula diana, dirigiendo de este modo la proteína biespecífica de fusión a una primera célula de un tejido y, de modo que, tras la exposición del dominio activador al receptor del factor de crecimiento, el dominio activador activa específicamente el receptor de una segunda célula del tejido para estimular la regeneración tisular.

50 En algunas realizaciones, la primera y la segunda células son iguales. Todavía en otras realizaciones, la primera y la segunda células son diferentes. En algunas realizaciones, la primera célula es una célula viable y la segunda célula es una célula dañada. Todavía en otras realizaciones, la primera célula es una célula dañada la segunda célula es una célula viable. En algunas realizaciones, el método comprende además administrar células madre al paciente.

60 En determinadas realizaciones, el daño tisular patológico es daño al tejido cardíaco asociado con infarto de miocardio. En otras realizaciones, el daño tisular patológico es daño al tejido renal. En otras realizaciones, el daño tisular patológico está en hueso, cartílago, articulaciones, piel, tejido hepático, tejido pancreático, células sanguíneas, tejido pulmonar o sistema nervioso. En determinadas realizaciones, tales métodos comprenden además la administración de células madre al paciente.

65

También se proporcionan en el presente documento moléculas de ácido nucleico que codifican una proteína de fusión biespecífica como se ha descrito anteriormente. En determinadas realizaciones, la molécula de ácido nucleico es ADN y el ADN comprende además secuencias reguladoras de la transcripción y la traducción unidas operativamente a la secuencia de codificación de la proteína biespecífica de fusión, de modo que la transcripción y traducción de la secuencia de codificación se produce en al menos un tipo de célula eucariótica.

Estos y otros aspectos de la presente divulgación serán evidentes tras la referencia a la siguiente descripción detallada.

10 DESCRIPCIÓN DEL LISTADO DE SECUENCIAS

- La SEQ ID NO:1 es la secuencia de aminoácidos del cFv SI-1 anti-ADN.
- La SEQ ID NO:2 es la secuencia de aminoácidos del cFv SI-22 anti-ADN.
- 15 La SEQ ID NO:3 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde a la IGF-I humana de tipo silvestre (forma madura).
- La SEQ ID NO:4 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la IGF-1 humana con sustitución D12A.
- La SEQ ID NO:5 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la IGF-1 humana con sustitución E9A.
- 20 La SEQ ID NO:6 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio N-K1 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:7 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio K1 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:8 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la fusión N-K2 de la cadena alfa del HGF.
- 25 La SEQ ID NO:9 es la secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio K2 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:10 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de seroalbúmina humana (HSA) con sustituciones C34S y N503Q.
- 30 La SEQ ID NO:11 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q.
- La SEQ ID NO:12 es la secuencia de aminoácidos de la HSA.
- La SEQ ID NO: 13 es la secuencia de ácido nucleico de la HSA.
- La SEQ ID NO: 14 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q y un conector polipeptídico.
- 35 La SEQ ID NO: 15 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q y un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO:16 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q y un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO: 17 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q y un conector polipeptídico.
- 40 La SEQ ID NO:18 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustituciones C34S y N503Q y un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO: 19 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO:20 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con un conector polipeptídico.
- 45 La SEQ ID NO:21 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO:22 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO:23 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con un conector polipeptídico.
- La SEQ ID NO:24 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustitución C34S, dominio I.
- La SEQ ID NO:25 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA, dominio II.
- 50 La SEQ ID NO:26 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con sustitución N503Q, dominio III.
- La SEQ ID NO:27 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA, dominio I.
- La SEQ ID NO:28 es la secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA, dominio III.
- La SEQ ID NO:29 es la secuencia de aminoácidos de alfa-fetoproteína humana.
- La SEQ ID NO:30 es la secuencia de aminoácidos de scFv anti-fosfatidilserina PS4A7.
- 55 La SEQ ID NO:31 es la secuencia de aminoácidos de anexina V humana (AnxV).
- La SEQ ID NO:32 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento que corresponde al dominio N-K1 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:33 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento que corresponde al dominio K1 de la cadena alfa del HGF humano.
- 60 La SEQ ID NO:34 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento que corresponde al dominio N-K2 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:35 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento que corresponde al dominio K2 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO:36 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde al monómero de VEGF humano.
- 65 La SEQ ID NO:37 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde

- al dímero de VEGF humano.
- La SEQ ID NO:38 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde a FGF2.
- 5 La SEQ ID NO:39 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde a NRG1 alfa humano, dominio similar a EGF.
- La SEQ ID NO:40 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde a NRG1 alfa humano, secuencia completa.
- La SEQ ID NO:41 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido líder de la proteína biespecífica de fusión.
- 10 La SEQ ID NO:42 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido líder de la proteína biespecífica de fusión.
- La SEQ ID NO:43 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que comprende hexahistidina en C-terminal.
- La SEQ ID NO:44 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido que comprende hexahistidina en C-terminal.
- 15 La SEQ ID NO:45 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA.
- La SEQ ID NO: 46 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con polipéptidos conectores cortos en N-terminal y C-terminal.
- La SEQ ID NO: 47 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con polipéptidos conectores cortos en N-terminal y C-terminal.
- 20 La SEQ ID NO: 48 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con polipéptidos conectores cortos en N-terminal y C-terminal.
- La SEQ ID NO: 49 es una secuencia de aminoácidos de un enlazador de HSA con polipéptidos conectores cortos en N-terminal y C-terminal.
- La SEQ ID NO: 50 es una secuencia de aminoácidos de una variante de un polipéptido de factor de crecimiento correspondiente al FGF2 humano.
- 25 La SEQ ID NO: 51 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO: 52 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio K1 de la cadena alfa del HGF humano.
- 30 La SEQ ID NO: 53 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio N-K2 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO: 54 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio K2 de la cadena alfa del HGF humano.
- La SEQ ID NO: 55 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio extracelular de NRG1 beta humano.
- 35 La SEQ ID NO: 56 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento correspondiente al dominio similar a EGF de NRG1 beta humano.
- La SEQ ID NO: 57 es una secuencia de aminoácidos de LA periostina humana de longitud completa.
- La SEQ ID NO: 58 es una secuencia de aminoácidos de una región de periostina humana.
- 40 La SEQ ID NO: 59 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido de factor de crecimiento correspondiente a la proteína morfogenética ósea 2 humano.
- La SEQ ID NO 60 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a una proteína morfogenética ósea 2 humana de cadena sencilla.
- La SEQ ID NO 61 es una secuencia de aminoácidos de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al factor de crecimiento endotelial vascular B.
- 45 La SEQ ID NO 62 es una secuencia de aminoácidos de parte del factor de crecimiento endotelial vascular humano B.
- La SEQ ID NO 63 es una secuencia de aminoácidos de parte del factor de crecimiento endotelial vascular humano B.
- La SEQ ID NO 64 es una secuencia de aminoácidos de parte del factor de crecimiento endotelial vascular humano B.
- 50 La SEQ ID NO 65 es una secuencia amino del dominio III de la seroalbúmina humana (HSA).
- La SEQ ID NO 66 es una secuencia de aminoácidos de una proteína de unión a la vitamina D modificada (mVDBP).
- La SEQ ID NO 67 es una secuencia amino del dominio III de una seroalbúmina humana modificada.
- 55 La SEQ ID NO 68 es una secuencia amino de la AFP humana.
- La SEQ ID NO 69 es una secuencia amino de una AFP modificada.
- La SEQ ID NO 70 es una secuencia amino del anticuerpo humano de dominio de unión a la albúmina (albudAb).
- La SEQ ID NO 71 es una secuencia de aminoácidos de una forma variante monomérica de Fc, denominado scFc.
- 60 La SEQ ID NO 72 es una secuencia de aminoácidos de la sinaptotagmina I.
- La SEQ ID NO 73 es una secuencia de aminoácidos de un anticuerpo scFv anti-ADN.
- La SEQ ID NO 74 es una secuencia de aminoácidos de una variante de sinaptotagmina I de no unión.
- La SEQ ID NO 75 es una secuencia de aminoácidos de una variante de scFv de no unión (DAscFv).
- La SEQ ID NO 76 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo cFv anti-miosina B7scFv.
- 65 La SEQ ID NO 77 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo cFv anti-miosina FD2.
- La SEQ ID NO 78 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo cFv anti-miosina MCA1.

ES 2 674 567 T3

- La SEQ ID NO 79 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo cFv anti-miosina MCB11.
La SEQ ID NO 80 es una secuencia de aminoácidos del anticuerpo cFv anti-miosina S3F5.
La SEQ ID NO 81 es una secuencia de aminoácidos de una variante de anexina V humana (AnxVmC315S).
La SEQ ID NO 82 es una secuencia de aminoácidos de una variante de anexina V humana (AnxVm3).
5 La SEQ ID NO 83 es una secuencia de aminoácidos de una variante de anexina V humana (AnxV23).
La SEQ ID NO 84 es una secuencia de aminoácidos de una variante de no unión de la anexina V humana (AnxVm1234).
La SEQ ID NO 85 es una secuencia de aminoácidos de una variante de lactadherina.
La SEQ ID NO 86 es una secuencia de aminoácidos de una variante de lactadherina.
10 La SEQ ID NO 87 es una secuencia de aminoácidos del factor de apareamiento alfa.
La SEQ ID NO 88 es una secuencia de aminoácidos del polipéptido líder de app8.
La SEQ ID NO 89 es una secuencia de aminoácidos del péptido señal aga2.
La SEQ ID NO 90 es una secuencia de aminoácidos del péptido señal SUC2.
La SEQ ID NO 91 es una secuencia de aminoácidos de un péptido señal sintético.
15 La SEQ ID NO 92 es una secuencia de aminoácidos de un marcador de hexahistidina.
La SEQ ID NO 93 es una secuencia de aminoácidos de un marcador de hexahistidina.
La SEQ ID NO 94 es una secuencia de aminoácidos de un marcador de hexahistidina.
Las SEQ ID NOs 95 a 104 y las SEQ ID NO 182 a 184 corresponden a la secuencia de aminoácidos de un enlazador polipeptídico.
20 La SEQ ID NO 105 es una secuencia de aminoácidos de la secuencia rica en prolina, alanina y/o serina.
La SEQ ID NO 106 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 107 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 108 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aPS4A7_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 109 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aPS4A7_mHSA_IGF1.
25 La SEQ ID NO 110 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_HGF (NK1).
La SEQ ID NO 111 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_HGF(NK1).
La SEQ ID NO 112 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aPS4A7_mHSA_HGF (NK1).
La SEQ ID NO 113 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aPS4A7_mHSA_HGF(NK1).
La SEQ ID NO 114 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_IGF1.
30 La SEQ ID NO 115 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 116 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_NRG1b(EGF).
La SEQ ID NO 117 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_NRG1b(EGF).
35 La SEQ ID NO 118 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_FGF2.
La SEQ ID NO 119 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_FGF2.
La SEQ ID NO 120 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_NRG1b(EGF).
La SEQ ID NO 121 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_NRG1b(EGF).
La SEQ ID NO 122 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión FGF2_mHSA_AnXVm1234.
40 La SEQ ID NO 123 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión FGF2_mHSA_AnXVm1234.
La SEQ ID NO 124 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_FGF2.
La SEQ ID NO 125 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_FGF2.
La SEQ ID NO 126 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_NRG1b(EGF).
La SEQ ID NO 127 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_NRG1b(EGF).
45 La SEQ ID NO 128 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_VEGFB (111).
La SEQ ID NO 129 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_VEGFB (111).
La SEQ ID NO 130 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_VEGFB (167).
La SEQ ID NO 131 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_VEGFB (167).
La SEQ ID NO 132 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_HGF (NK1).
50 La SEQ ID NO 133 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_HGF (NK1).
La SEQ ID NO 134 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 135 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión AnxV_mHSA_IGF1.
La SEQ ID NO 136 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 137 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV.
55 La SEQ ID NO 138 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXVm1234.
La SEQ ID NO 139 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXVm1234.
La SEQ ID NO 140 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión HGF (NK1)_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 141 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión HGF (NK1)_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 142 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión NRG1b (EGF)_mHSA_AnXV.
60 La SEQ ID NO 143 es una secuencia de ácido nucleico de la proteínas de fusión NRG1b (EGF)_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 144 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión FGF2_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 145 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión FGF2_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 146 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión VEGFB(167)_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 14 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VEGFB (167)_mHSA_AnXV.
65 La SEQ ID NO 148 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión VEGFB(111)_mHSA_AnXV.
La SEQ ID NO 149 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión VEGFB (111)_mHSA_AnXV.

- La SEQ ID NO 150 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_B7scFv.
 La SEQ ID NO 151 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_B7scFv.
 La SEQ ID NO 152 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_Syt1.
 La SEQ ID NO 153 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_Syt1.
 5 La SEQ ID NO 154 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_aDNASI1.
 La SEQ ID NO 155 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_aDNASI1.
 La SEQ ID NO 156 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_B7scFv.
 La SEQ ID NO 157 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_B7scFv.
 La SEQ ID NO 158 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_Syt1.
 10 La SEQ ID NO 159 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_Syt1.
 La SEQ ID NO 160 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_aDNASI1.
 La SEQ ID NO 161 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_aDNASI1.
 La SEQ ID NO 162 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión FGF2_mHSA_B7scFv.
 15 La SEQ ID NO 163 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión FGF2_mHSA_B7scFv.
 La SEQ ID NO 164 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión FGF2_mHSA_Syt1.
 La SEQ ID NO 165 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión FGF2_mHSA_Syt1.
 La SEQ ID NO 166 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión FGF2_mHSA_aDNASI1.
 La SEQ ID NO 167 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión FGF2_mHSA_aDNASI1.
 20 La SEQ ID NO 168 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_IGF1.
 La SEQ ID NO 169 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_IGF1.
 La SEQ ID NO 170 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Syt1_mHSA_IGF1.
 La SEQ ID NO 171 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión Syt1_mHSA_IGF1.
 La SEQ ID NO 172 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_IGF1.
 25 La SEQ ID NO 173 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión aDNASI1_mHSA_IGF1.
 La SEQ ID NO 174 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_NRG1b(EGF).
 La SEQ ID NO 175 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_NRG1b(EGF).
 La SEQ ID NO 176 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Syt1_mHSA_NRG1b(EGF).
 La SEQ ID NO 177 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión Syt1_mHSA_NRG1b(EGF).
 30 La SEQ ID NO 178 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_FGF2.
 La SEQ ID NO 179 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión B7scFv_mHSA_FGF2.
 La SEQ ID NO 180 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión Syt1_mHSA_FGF2.
 La SEQ ID NO 181 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión Syt1_mHSA_FGF2.
 La SEQ ID NO 185 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión IGF1_mHSA_DAscFv.
 35 La SEQ ID NO 186 es una secuencia de ácido nucleico de la proteína de fusión IGF1_mHSA_DAscFv.
 Las SEQ ID NO SEQ ID NO:187-190 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al FGF2 humano (SEQ ID NO:38).
 Las SEQ ID NOs 191-94 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio N-K1 de la cadena alfa del HGF (SEQ ID NO: 6, La SEQ ID NO: 32).
 40 Las SEQ ID NOs 195-197 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a una IGF-I humana de tipo salvaje (SEQ ID NO 3).
 La SEQ ID NO:198 es una secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento que corresponde a NRG1 alfa humano, secuencia completa (SEQ ID NO 40).
 La SEQ ID NO:199 es una secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento que
 45 corresponde a NRG1 alfa humano, dominio similar a EGF (SEQ ID NO 39).
 Las SEQ ID NOs 200-202 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dominio similar a EGF de NRG1 humano (SEQ ID NO 56).
 La SEQ ID NO 203 es la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a una región de periostina humana (SEQ ID NO 58).
 50 La SEQ ID NO 204 es la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la proteína 2 morfogenética ósea humana (SEQ ID NO 59).
 La SEQ ID NO 205 es la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a la proteína 2 morfogenética ósea humana de cadena sencilla (SEQ ID NO 60).
 La SEQ ID NO 206 es la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente a un monómero alfa de VEGF humano (SEQ ID NO 36).
 55 La SEQ ID NO 207 es la secuencia de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al dímero del VEGF alfa humano (SEQ ID NO 37).
 Las SEQ ID NOs 208-209 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al factor B de crecimiento endotelial vascular (SEQ ID NO 61).
 60 Las SEQ ID NOs 210-211 son las secuencias de ácido nucleico de un polipéptido del factor de crecimiento correspondiente al factor B de crecimiento endotelial vascular humano.
 Las SEQ ID NOs 212-214 son las secuencias de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente al enlazador de la seroalbúmina humana (HSA) con sustituciones C34S y N503Q (SEQ ID NO 10).
 La SEQ ID NO 215 es una secuencia de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente al dominio III de una seroalbúmina humana modificada (SEQ ID NO 67).
 65 La SEQ ID NO 216 es una secuencia de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente a una

- AFP modificada (SEQ ID NO 69).
- La SEQ ID NO 217 es una secuencia de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente al anticuerpo humano del dominio de unión a la albúmina (SEQ ID NO 70).
- La SEQ ID NO 218 es una secuencia de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente a la forma de variante monomérica de Fc, denominado scFc (SEQ ID NO 71).
- La SEQ ID NO 219 es una secuencia de ácido nucleico de un modulador de la semivida correspondiente a una proteína de unión a la vitamina D modificada, mVDBP (SEQ ID NO 66).
- Las SEQ ID NOs 220-221 son secuencias de ácido nucleico correspondientes al anticuerpo scFv anti-ADN (SEQ ID NO 73).
- La SEQ ID NO 222 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al scFv SI-1 anti-ADN (SEQ ID NO 1).
- La SEQ ID NO 223 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al anticuerpo B7scFv anti-miosina scFv (SEQ ID NO 76).
- La SEQ ID NO 224 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al scFv antifosfatidilserina PS4A7 (SEQ ID NO 30).
- Las SEQ ID NOs 225-227 son secuencias de ácido nucleico correspondientes a la anexina V humana (SEQ ID NO 31).
- La SEQ ID NO 228 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a una variante de la anexina V humana (C315S, SEQ ID NO 81).
- Las SEQ ID NOs 229-230 son secuencias de ácido nucleico correspondientes a una variante de la anexina V humana AnxV3, SEC ID N° 82).
- Las SEQ ID NOs 231-232 son secuencias de ácido nucleico correspondientes a una variante no internalizante de la anexina V (AnxVm23, SEQ ID NO 83).
- Las SEQ ID NOs 233-234 son secuencias de ácido nucleico correspondientes a una variante de no unión de la anexina V (AnxVm1234, SEQ ID NO 84).
- La SEQ ID NO 235 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a sinaptotagmina I (SEQ ID NO 72).
- Las SEQ ID NOs 236-237 son secuencias de ácido nucleico correspondientes a la variante scFv de no unión (DAscFv; SEQ ID No 75).
- La SEQ ID NOs 238 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a un polipéptido líder.
- La SEQ ID NO 239 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al factor alfa de apareamiento.
- La SEQ ID NO 240 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al polipéptido líder de app8.
- La SEQ ID NO 241 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido señal aga2.
- La SEQ ID NO 242 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente al péptido señal SUC2.
- La SEQ ID NO 243 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a un péptido señal sintético.
- La SEQ ID NO: 244 es una secuencia de aminoácidos correspondiente a la secuencia señal del factor alfa.
- La SEQ ID NO 245 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la secuencia señal del factor alfa.
- La SEQ ID NO 246 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión DAscFv_mHSA_IGF1.
- La SEQ ID NO 247 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión DAscFv_mHSA_IGF1.
- La SEQ ID NO 248 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión DAscFv_mHSA_HGF (NK1).
- La SEQ ID NO 249 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión DAscFv_mHSA_HGF(NK1).
- La SEQ ID NO 250 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA.
- La SEQ ID NO 251 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión AnxVm1234_mHSA.
- La SEQ ID NO 252 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxV_mHSA.
- La SEQ ID NO 253 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión AnxV_mHSA.
- La SEQ ID NO 254 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234.
- La SEQ ID NO 255 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234.
- La SEQ ID NO 256 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm23_mHSA.
- La SEQ ID NO 257 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión AnxVm23_mHSA.
- La SEQ ID NO 258 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_VEGFB(111).
- La SEQ ID NO 259 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_VEGFB(111).
- La SEQ ID NO 260 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_VEGFB(167).
- La SEQ ID NO 261 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_VEGFB(167).
- La SEQ ID NO 262 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_HGF (NK1).
- La SEQ ID NO 263 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_HGF(NK1).
- La SEQ ID NO 264 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_FGF2.
- La SEQ ID NO 265 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión AnxVm1234_mHSA_FGF2.
- La SEQ ID NO 266 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión mHSA_AnXV.

La SEQ ID NO 267 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión mHSA_AnxV.
 La SEQ ID NO 268 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión mHSA_AnxVm23.
 La SEQ ID NO 269 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión mHSA_AnxVm23.
 5 La SEQ ID NO 270 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión mHSA_AnxVm1234.
 La SEQ ID NO 271 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a las proteínas de fusión mHSA_AnxVm1234.
 La SEQ ID NO 272 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión HGF(NK1)_mHSA_AnxVm1234.
 10 La SEQ ID NO 273 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión HGF(NK1)_mHSA_AnxVm1234.
 La SEQ ID NO 274 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión VEGFB (167)_mHSA_AnxVm1234.
 La SEQ ID NO 275 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión VEGFB(167)_mHSA_AnxVm1234.
 15 La SEQ ID NO 276 es una secuencia de aminoácidos de la proteína de fusión VEGFB (111)_mHSA_AnxVm1234.
 La SEQ ID NO 277 es una secuencia de ácido nucleico correspondiente a la proteína de fusión VEGFB(111)_mHSA_AnxVm1234.

20 **Breve descripción de los dibujos**

La figura 1 es un SDS-PAGE de las proteínas de fusión IGF1_mHSA_AnxV (136), IGF1_mHSA_AnxVm1234 (138), NRG1b(EGF)_mHSA_AnxV (142) y NRG1b(EGF)_mHSA_AnxVm1234 purificadas.
 25 La Figura 2 es una citometría de flujo de anexina V-FITC más yoduro de propidio (PI) como control positivo de detección de la apoptosis en células cardíacas apoptóticas.
 La figura 3 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 2.
 La figura 4 es una citometría de flujo de IGF1_mHSA_AnxV más yoduro de propidio en células cardíacas apoptóticas.
 30 La figura 5 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 4.
 La figura 6 es una citometría de flujo de IGF1_mHSA_AnxVm1234 más yoduro de propidio en células cardíacas apoptóticas.
 La figura 7 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 6.
 La figura 8 es la citometría de flujo del control positivo de la detección de apoptosis con Anexina V-FITC más propidio en células cardíacas apoptóticas.
 35 La figura 9 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 8.
 La figura 10 es una citometría de flujo de IGF1_mHSA_AnxV más yoduro de propidio en células cardíacas apoptóticas, sin prebloqueo con IGF1.
 La figura 11 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 10.
 La figura 12 es una citometría de flujo de IGF1_mHSA_AnxVm1234 más yoduro de propidio en células cardíacas apoptóticas, sin prebloqueo con IGF1.
 40 La figura 13 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 12.
 La figura 14 es una citometría de flujo de IGF1_mHSA_AnxV más yoduro de propidio en células cardíacas apoptóticas, con prebloqueo con 10 min, IGF1 800 nM.
 La figura 15 es un histograma de citometría de flujo para los canales FITC y PI que se muestran en la figura 14.
 45 La Figura 16 es un gráfico que muestra que las células cardíacas derivadas de ESC presentan una población apoptótica, con o sin tratamiento con doxorubicina. Ann-HSA = AnxV_mHSA. M1234-Ann-HSA = AnxVm1234_mHSA.
 La Figura 17 es una citometría de flujo que muestra la unión específica de AnxV_mHSA y no de AnxVm1234_mHSA, a células cardíacas derivadas de CES apoptóticas.
 50 La figura 18 es una citometría de flujo que muestra la unión específica de AnxV_mHSA_NRG1b (EGF) a células cardíacas derivadas de ESC apoptóticas.
 La figura 19 son gráficos que muestran la unión específica de IGF1_mHSA_Syt1 e IGF1_mHSA_AnxV a fosfatidilserina.
 La figura 20 son gráficos que muestran la unión específica de aDNASI1_mHSA_FGF2, aDNASI1_mHSA_NRG1b(EGF), y IGF1_mHSA_aDNASI1 a DNA.
 55 La figura 21 es un gráfico que muestra la estimulación de pAkt en células DU145 por proteína de fusión, NRG1b(EGF)_mHSA_AnxV y control positivo, NRG1b(EGF).
 La figura 22 es un gráfico que muestra la estimulación de pAkt en células DU145 por proteína de fusión, AnxV_mHSA_NRG1b(EGF) y control positivo, NRG1b(EGF).
 60 La figura 23 es un gráfico que muestra la estimulación de pAkt en células DU145 por proteína de fusión IGF1_mHSA_AnxV, proteína de fusión IGF1_mHSA_AnxVm1234 y control positivo, IGF1.
 La figura 24 es un gráfico que muestra la estimulación de pAkt en células DU145 por la proteína de fusión IGF1_mHSA_B7scFv y control positivo, IGF1.
 La figura 25 es un gráfico que muestra la estimulación mediante respuesta a la dosis de pAkt en células cardíacas por IGF1 e IGF1_mHSA_AnxV.
 65 La figura 26 es un gráfico que muestra la estimulación de pErk en cardiomiocitos derivados de ESC por FGF2 y

AnxV_mHSA_FGF2

La figura 27 es un gráfico que muestra los niveles de pAkt inducidos por proteínas premezcladas con células HL-1 apoptóticas (barras negras) y con células HL-1 no tratadas (barras grises).

5 La figura 28 muestra una disección del corazón utilizada para la preparación de 2 corazones por grupo mediante determinaciones ELISA. El recuadro en la esquina superior derecha muestra una sección transversal de la sección B1. Las secciones B1-infarto y B2 contienen la mayor parte o toda la región del infarto o la región cercana, mientras que las secciones A y B1-remota contienen principalmente tejido sano. LV: ventrículo izquierdo.

10 La figura 29 es un gráfico que muestra la medición de las proteínas de fusión IGF1_mHSA_AnXV y de no unión IGF1_mHSA_AnXVm1234 en el corazón tres veces después de la dosificación. Las barras negras representan la concentración de proteína encontrada en las regiones infartadas más las regiones limítrofes y las barras grises representan la concentración de proteína encontrada en las regiones no infartadas. Se muestran dos ratones por grupo. El grupo 2 corresponde a los ratones a los que se ha administrado la proteína de direccionamiento IGF1_mHSA_AnXV, el grupo 3 corresponde a los ratones a los que se ha administrado la variante de no unión IGF1_mHSA_AnXVm1234.

15 La figura 30 son microfotografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de secciones de corazón 24 horas después de tratar a un ratón con IGF1_mHSA_AnXV.

20 La figura 31 son microfotografías representativas de la tinción inmunohistoquímica de secciones de corazón que muestran tejido infartado y las áreas limítrofe de un ratón tratado con IGF1_mHSA_AnXVm1234. El punto de tiempo fue 24 horas después de la dosificación.

La figura 32 son microfotografías de controles usados para demostrar la especificidad de la tinción de proteína que contiene HSA o tejido que produce HSA por el anticuerpo anti-HSA primario usado en experimentos con ratones.

25 Descripción detallada de la invención

Los aspectos de la divulgación se refieren a una proteína de fusión biespecífica que comprende dos dominios de unión, un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana o célula diana específica y un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor que modula la regeneración tisular. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento sirve para dirigir la proteína biespecífica de fusión a una célula o tejido diana, mientras que el dominio activador sirve para activar una célula para estimular la regeneración del tejido diana. Como se usa en el presente documento, una "proteína biespecífica" se refiere a una proteína de fusión capaz de unirse específicamente a dos o más moléculas específicas.

35 En algunas realizaciones, la proteína de biespecífica comprende (1) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con una célula dañada de un tejido, en el que la molécula es intracelular en una célula viable y expuesta al espacio extracelular en la célula dañada; y (2) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor del factor de crecimiento o un receptor de citocinas de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador al receptor del factor de crecimiento o receptor de citocinas, el dominio activador se une al receptor del factor de crecimiento o al receptor de citocinas para modular la regeneración o la supervivencia del tejido.

45 En algunas realizaciones, la proteína biespecífica de fusión comprende (1) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con una célula dañada de un tejido, en el que la molécula es intracelular en una célula viable y expuesta al espacio extracelular en la célula dañada; (2) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio activador a la molécula asociada a la membrana, el dominio activador se une a la molécula asociada a la membrana para modular la regeneración del tejido y (3) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

50 En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas comprenden: (1) un dominio polipeptídico de direccionamiento que se une a una molécula asociada a isquemia; y (2) un dominio activador, tal como un polipéptido del factor de crecimiento o un polipéptido de citocina para estimular la regeneración o la supervivencia tisular.

55 En algunas realizaciones, la proteína biespecífica de fusión comprende (1) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada con un tejido; (2) un dominio activador (por ejemplo, un dominio activador) que tiene una especificidad de unión a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio unión a la molécula, el dominio de unión se une a la molécula para estimular la regeneración o la supervivencia del tejido; y (3) un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

60 En determinadas realizaciones, la proteína biespecífica de fusión un modulador de la semivida (HLM). En algunas realizaciones, el HLM es un polipéptido. El HLM puede tener dos extremos, un extremo N y un extremo C, y se une en un extremo a través de un enlace peptídico al dominio polipeptídico de direccionamiento y se une en el otro extremo a través de un enlace peptídico al dominio activador. En otras realizaciones, el modulador de la semivida is joined en un extremo (extremo N o extremo C) al dominio activador o al dominio de direccionamiento. Por

consiguiente, el modulador de la semivida puede estar en el extremo N o en el extremo C de la proteína biespecífica de fusión. El modulador de la semivida se puede unir al dominio de direccionamiento o al dominio activador a través de enlaces peptídicos.

5 Otros aspectos de la divulgación se refieren a proteínas de fusión que comprenden (1) al menos un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a al menos una molécula diana asociada con un tejido; (2) al menos un dominio de unión (tal como un dominio activador) que tiene una especificidad de unión al menos a una molécula asociada con la superficie de una célula en el tejido, en el que al exponer el dominio unión a la molécula, el dominio de unión se une a la molécula para estimular la regeneración del tejido; y (3) opcionalmente, un modulador de la semivida en el que el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína de fusión. En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende dos o más dominios de direccionamiento, teniendo cada dominio de direccionamiento una afinidad de unión por una molécula diana asociada a un tejido. Cada uno de los dominios de direccionamiento puede tener la misma especificidad de unión (por ejemplo, una especificidad de unión por la misma molécula diana) o una especificidad de unión diferente (por ejemplo, una especificidad de unión por una molécula diana diferente). En algunas realizaciones, la proteína de fusión comprende dos o más dominios activadores. Cada uno de los dominios activadores puede tener la misma especificidad de unión (por ejemplo, una especificidad de unión al mismo receptor en la célula) o especificidad de unión diferente (por ejemplo, una especificidad de unión para un receptor diferente en una célula).

20 Un experto en la materia apreciará que tales proteínas de fusión biespecíficas pueden encontrar uso en la regeneración de tejidos. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión biespecíficas se pueden usar en células enfermas, después de una lesión en un tejido u órgano o después de un acontecimiento en el que las células de un tejido pueden resultar dañadas. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión biespecíficas pueden activar células que expresan uno o más factores de crecimiento y/o citocinas (por ejemplo, quimiocina) y/o integrina. En otras realizaciones, la proteína de fusión biespecífica encuentra uso, por ejemplo, en el reclutamiento de células que expresan uno o más receptores de factores de crecimiento y/o citocinas (por ejemplo, quimiocina) y/o integrinas (por ejemplo, células madre, células progenitoras o células del sistema inmunitario) al tejido, por ejemplo, después de una lesión, o un acontecimiento en el cual las células de un tejido pueden resultar dañadas o pueden volverse disfuncionales (por ejemplo, disfunción de las células beta en la diabetes). Sin embargo, *in vivo*, la administración de tales proteínas de fusión biespecíficas puede usarse para facilitar la reparación o regeneración del tejido u órgano dañado.

35 En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas desveladas en el presente documento pueden encontrar uso en la modulación de la supervivencia del tejido. Por ejemplo, las proteínas biespecíficas pueden mejorar o mantener la viabilidad de una célula. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión biespecíficas pueden activar la ruta de pro-supervivencia o de supervivencia celular. En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas pueden modular la apoptosis.

40 En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas pueden tener (a) un dominio polipeptídico diana en el que el dominio de direccionamiento se une a una molécula diana dirigiendo así a la proteína biespecífica de fusión a una primera célula de un tejido y (b) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor. Al exponer el dominio activador al receptor, el dominio activador puede activar el receptor de una segunda célula para estimular el reclutamiento celular, la inhibición de la apoptosis, la inducción de la proliferación celular, la activación de la ruta pro-supervivencia, la regeneración, la supervivencia del tejido. Un experto en la técnica apreciará que la proteína biespecífica de fusión se puede unir a una primera población celular y actuar sobre la misma población celular (por ejemplo, de manera autocrina) o sobre una población celular diferente (por ejemplo, de manera paracrina). En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento se une específicamente a una molécula diana asociada con una primera población celular dañada y el dominio activador se une específicamente a un receptor de una segunda población celular de células viables. Aún en algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento se une específicamente a una molécula diana específica en la superficie de una primera población celular dañada y el dominio activador se une específicamente a una segunda población celular. La primera célula puede ser una célula viable o una célula "en riesgo". Como se usa en el presente documento, célula "en riesgo" se refiere a una célula viable que aún no ha sufrido apoptosis o que no está dañada pero que está en riesgo de dañarse.

55 En algunas realizaciones, la proteína biespecífica tiene dos dominios de unión diferentes (tales como dominio de direccionamiento y dominio activador) que se unen a diferentes moléculas en diferentes células en un tejido u órgano. Todavía en otras realizaciones, la proteína biespecífica tiene dos dominios de unión diferentes que se unen a diferentes moléculas en la misma célula diana en un tejido, seleccionándose el dominio de direccionamiento de modo que se una específicamente a una célula diana y el dominio activador seleccionado para estimular la regeneración tisular.

65 El término "polipéptido" se usa en el presente documento para referirse a una molécula que consiste en múltiples restos de aminoácidos unidos por enlaces peptídicos. Este término no tiene ninguna implicación en cuanto al número de restos de aminoácidos así unidos.

El término "biespecífico", tal como se usa en el presente documento, se refiere a la capacidad de la proteína de

fusión para interactuar con dos ligandos diferentes: una molécula diana (unida al dominio polipeptídico de direccionamiento) y un receptor para el dominio activador. Las propiedades de unión del dominio polipeptídico de direccionamiento y el dominio activador se discuten con más detalle a continuación.

5 Como se usa en el presente documento, la expresión "molécula diana" se refiere a cualquier molécula que está asociada con un tejido (por ejemplo, tejido enfermo o dañado). Se entiende que una "célula diana" es una célula a la que se puede unir específicamente una proteína biespecífica o un dominio de direccionamiento de la misma. Las moléculas diana preferidas están expuestas o enriquecidas en el exterior de una célula diana. En algunas realizaciones, la molécula diana está asociada con una célula dañada, estando la molécula diana intracelular en una
10 célula viable o no dañada y estando expuesta al espacio extracelular en una célula dañada. Dichas moléculas incluyen, por ejemplo, moléculas que están expuestas en células que experimentan necrosis (tales como ADN) o apoptosis (por ejemplo, fosfatidilserina), miosina (incluidos los subtipos específicos del tipo de tejido de los mismos), ICAM-1 o P-selectina. Todavía en otras realizaciones, la molécula diana es una molécula que está presente o enriquecida en la superficie de una célula o tejido enfermo o disfuncional en comparación con el nivel detectado en
15 una célula o tejido sano o funcional.

Las células están rodeadas por una membrana plasmática (o membrana celular) que comprende una bicapa lipídica. Se puede considerar que la membrana celular tiene una superficie orientada hacia el citosol (lado citosólico o interior de la célula) y una superficie que mira hacia el exterior de la célula o el espacio extracelular. Durante la apoptosis se
20 produce movimiento transbicapa de fosfolípidos aniónicos desde la capa interna a la externa de la membrana plasmática. La proteína de unión a fosfolípidos aniónicos, tal como anexina V, sinaptotagmina I o lactadherina, pueden usarse para detectar la presencia de fosfatidilserina en la capa externa de la membrana celular. La fosfatidilserina es un fosfolípido, que generalmente está restringido al lado citosólico de la membrana en células viables o no dañadas, y que se expone en la superficie celular externa o en el espacio extracelular en la apoptosis.
25 La fosfatidilserina se ha usado como un marcador en estudios de imagen *in vivo* (véase la Tabla 2).

En algunas realizaciones, la molécula diana es una "molécula asociada a isquemia". Una "molécula asociada a la isquemia" es cualquier molécula que se detecta a un nivel que es significativamente mayor (por ejemplo, al menos 2 veces mayor) después de isquemia o hipoxia. Se puede usar cualquier ensayo de unión adecuado para identificar
30 moléculas asociadas a isquemia, incluidas las proporcionadas en el presente documento. El aumento en el nivel de la molécula que se detecta puede ser el resultado de una regulación positiva o disminución del recambio o puede deberse a una mayor accesibilidad (por ejemplo, resultante del daño celular). En determinadas realizaciones, la molécula asociada a isquemia se detecta en una célula de tejido postisquémico a un nivel significativamente más alto (por ejemplo, al menos 2 veces mayor) que en una célula del mismo tejido que no ha sufrido un acontecimiento
35 isquémico (es decir, la molécula es específica o está enriquecida en el tejido postisquémico). En realizaciones adicionales, la molécula asociada a isquemia está asociada con daño celular (es decir, la molécula se detecta a un nivel significativamente más alto en las células que están dañadas que en las células no dañadas del mismo tipo). Ciertas moléculas asociadas a la isquemia están enriquecidas (2 veces o más) en el corazón después de un acontecimiento isquémico (o en un sistema modelo que se usa para imitar la isquemia en el corazón). Dichas
40 moléculas incluyen, por ejemplo, las moléculas expuestas sobre los miocitos u otras células cardíacas que experimentan necrosis (tales como ADN) o apoptosis (por ejemplo, fosfatidilserina) o moléculas que están enriquecidas en tejido cardíaco cicatrizado, tal como colágeno (colágeno I, III), miosina (incluidos los subtipos específicos del tipo de célula), u otras proteínas de la matriz extracelular que están enriquecidas en corazones postisquémicos. Tales moléculas se pueden identificar sobre la base del enriquecimiento después de la isquemia-reperusión
45 *in vivo* o en isquemia-reperusión simulada *in vitro*, o después de la exposición a condiciones tales como hipoxia, disminución de ATP, aumento de especies de oxígeno reactivo (ROS) o producción de óxido nítrico sintasa (NOS) o inanición sérica de células cultivadas *in vitro*.

El dominio polipeptídico de direccionamiento

50 La unión a la molécula diana asociada con un tejido (por ejemplo, la molécula asociada a isquemia) está mediada por el dominio polipeptídico de direccionamiento. Este dominio puede ser cualquier secuencia polipeptídica que cumpla esta función. Preferentemente, la unión del dominio de direccionamiento a la molécula diana no tiene una actividad biológica. Tal como se usa en el presente documento, "actividad biológica" se refiere a una actividad
55 conocida definida realizada por exposición de una molécula a un dominio de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento es un polipéptido no anticuerpo de origen natural que tiene una afinidad de unión a la molécula diana, fragmento del mismo o variante del mismo. Todavía en otras realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende una o más regiones variables de anticuerpo.
60 Un experto en la materia apreciará que se contempla cualquier dominio de direccionamiento capaz de unirse directa o indirectamente a la molécula diana.

En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento es anexina V (SEQ ID NO: 31), fragmento de la misma o variante de la misma (SEQ ID NO: 81-83). La anexina V se une a la fosfatidilserina (PS). En algunas realizaciones, la
65 anexina V se modifica para sustituir la cisteína 315 por serina o alanina para reducir la formación de dímeros. En algunas realizaciones, la anexina V se modifica para reducir la internalización de la anexina V mientras se mantiene

la afinidad de unión a la fosfatidilserina. En algunas realizaciones, uno o más restos de anexina V pueden alterarse para modificar la unión para lograr una velocidad de asociación de la unión a la molécula diana más favorecida o una velocidad de disociación de la unión a la molécula diana más favorecida. En algunas realizaciones, pueden usarse variantes de anexina V en las que D144 se sustituyó por N y/o E228 se sustituyó por A (véase Mira, 1997; Kenis, 2004; Kenis 2010 y Ungthum, 2010).

En otras realizaciones, el dominio de direccionamiento es sinaptotagmina I, fragmento de la misma o variante de la misma. Se ha demostrado que la sinaptotagmina I (Syt1) se une a la fosfatidilserina de una manera dependiente de Ca (2+) con una afinidad de unión de aproximadamente 5 a 40 nM. En algunas realizaciones, uno de los dos dominios C2 de la sinaptotagmina (por ejemplo, C2B) puede usarse como dominio de direccionamiento. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento es un dominio C2 de proteínas dirigidas a membrana dependientes de Ca²⁺ implicadas en la transducción de señal o el tráfico de membrana (por ejemplo, proteína cinasa C, factores de coagulación de la sangre V y VIII). En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento tiene la secuencia descrita en la SEQ ID. NO: 72. La lactadherina, también conocida como glóbulo de grasa láctea-EGF 8, es una glicoproteína de unión a fosfatidilserina de 45 kDa secretada por los macrófagos. La lactadherina contiene dominios de tipo EGF en el extremo amino y dos dominios C en el extremo carboxi. Por consiguiente, en algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento comprende el dominio C de la lactadherina, fragmento de la misma o variante de la misma. En algunas realizaciones, uno o más residuos del dominio C2 pueden alterarse para modificar la unión para lograr una velocidad de asociación de la unión a la molécula diana más favorecida o para lograr una velocidad de disociación de la unión a la molécula diana más favorecida. En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento tiene la secuencia descrita en las SEQ ID. NO: 85 o 86. En algunas realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende una mucina 1 y 4 de inmunoglobulina de células T (proteína TIM). En otras realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende un anticuerpo 3G4 o dominio de anticuerpo capaz de unirse indirectamente a fosfatidilserina a través de la 2-glucoproteína 1 plasmática. Todavía en otras realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende un anticuerpo anti-fosfatidilserina (por ejemplo, PS4A7, SEC ID NO. 30) o dominio de anticuerpo capaz de unirse a la fosfatidilserina.

En algunas realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende un polipéptido que se une a la molécula diana. Dichos polipéptidos representativos comprenden o tienen las secuencias proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NO: 31, 72, 81-83 u 85-86. Representativas de tales secuencias de ácidos nucleicos de polipéptidos comprenden o tienen las secuencias proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NO: 225-232 o 235.

El polipéptido nativo se puede usar como dominios de direccionamiento. Será evidente, sin embargo, que también se pueden usar porciones de dichas secuencias nativas y polipéptidos que tienen secuencias alteradas, con la condición de que dichos polipéptidos conserven la capacidad de unirse a la molécula diana con una afinidad de unión apropiada (Kd) como se describe con más detalles a continuación.

Tal como se usa en el presente documento, un "anticuerpo" es una proteína que consiste en uno o más polipéptidos sustancialmente codificados por genes de inmunoglobulina. Un anticuerpo típico es un tetrámero que está compuesto por dos pares idénticos de cadenas polipeptídicas, teniendo cada par una cadena "ligera" (aproximadamente 25 kD) y una cadena "pesada" (aproximadamente 50-70 kD). "V_L" y V_H"se refieren a estas cadenas ligeras y pesadas, respectivamente. Una "región variable de anticuerpo" es una región N-terminal de una cadena variable de anticuerpo (V_L o V_H) que comprende residuos de aminoácidos que son los principales responsables del reconocimiento del antígeno. Los expertos en la técnica pueden identificar fácilmente una región variable de anticuerpo y determinar el tamaño mínimo necesario para conferir reconocimiento de antígeno. Normalmente, una región variable de anticuerpo comprende al menos 70 residuos de aminoácidos, y, más frecuentemente, al menos 100 residuos de aminoácidos. Un polipéptido que comprende una región variable de anticuerpo puede comprender (pero no es necesario) otras secuencias de cadena ligera y/o pesada, y puede (pero no es necesario) comprender adicionalmente secuencias no derivadas de anticuerpo. Será evidente que la secuencia de una región variable de anticuerpo puede ser de origen natural o puede modificarse usando técnicas estándar, siempre que se conserve la función (reconocimiento de antígeno). Ciertos polipéptidos que comprenden una región variable de anticuerpo son anticuerpos monocatenarios (anticuerpos que existen como una única cadena polipeptídica), más preferentemente anticuerpos Fv de cadena única (scFv) en los que está unida una región de cadena pesada variable y una región de cadena ligera variable (directamente o a través de un enlazador peptídico) para formar un polipéptido continuo. El anticuerpo scFv puede sintetizarse químicamente o puede expresarse a partir de un ácido nucleico que incluye secuencias de codificación de V_H y V_L unidas directamente o unidas mediante un enlazador que codifica un péptido.

"Unión" o "unión específica" se usan indistintamente en el presente documento e indica que una proteína biespecífica exhibe afinidad sustancial por una molécula específica (por ejemplo, el dominio de direccionamiento exhibe afinidad sustancial por una molécula diana, o un dominio activador exhibe afinidad sustancial por una molécula asociada a la superficie de una célula, tal como un receptor) o una célula o tejido que porta la molécula y se dice que ocurre cuando la proteína de fusión (o el dominio polipeptídico de direccionamiento del mismo o el dominio activador del mismo) tiene una afinidad sustancial por la molécula específica y es selectivo porque no muestra una reactividad cruzada significativa con otras moléculas. La unión sustancial preferida incluye unión con

una constante de disociación (K_d) de 10^{-6} , 10^{-7} , 10^{-8} , 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} M o mejor. Por ejemplo, la K_{re} de una interacción anticuerpo-antígeno indica la concentración de anticuerpo (expresada como molaridad) a la cual el 50 % de las moléculas de anticuerpo y antígeno se unen en equilibrio termodinámico. Por lo tanto, a una concentración de antígeno fija adecuada, el 50 % de un anticuerpo de afinidad mayor (es decir, más fuerte) se unirá a moléculas de antígeno a una concentración de anticuerpo inferior que la requerida para lograr el mismo porcentaje de unión con un anticuerpo de afinidad menor. K_d es también la proporción de las tasas cinéticas de asociación y disociación (k_{on} y k_{off}); es decir, $K_d = k_{off}/k_{on}$. Por lo tanto, un valor de K_d más bajo indica una afinidad más alta (más fuerte). Tal como se usa en el presente documento, las afinidades "mejores" son afinidades más fuertes, y se identifican mediante constantes de disociación de menor valor numérico que sus comparadores, siendo una K_d de 10^{-10} M de menor valor numérico y, por tanto, representando una afinidad mejor que K_d de 10^{-9} M. Las afinidades mejores (es decir, con un valor de K_d menor y, por lo tanto, más fuerte) que 10^{-7} , preferentemente mejor que 10^{-8} M, son generalmente preferidas. También se contemplan valores intermedios a los expuestos en el presente documento, y la afinidad de unión preferida se puede indicar como un intervalo de constantes de disociación, por ejemplo, las afinidades de unión preferidas para los anticuerpos descritos en el presente documento están representados por valores de K_d que varían de 10^{-6} a 10^{-12} M (es decir, micromolar a picomolar), preferentemente de 10^{-7} a 10^{-12} M, más preferentemente de 10^{-8} a 10^{-12} M o mejor. Un anticuerpo que "no muestra reactividad cruzada significativa" es uno que no se unirá apreciablemente a un antígeno no diana. Por ejemplo, en una realización, un anticuerpo que se une específica y selectivamente a la miosina cardíaca exhibirá al menos dos, y preferentemente tres, o cuatro o más órdenes de magnitud mejor de afinidad de unión (es decir, unión que exhibe dos, tres o cuatro o más órdenes de magnitud menores del valor de K_d) para la miosina cardíaca que para las moléculas de miosina distintas de la miosina cardíaca o para proteínas o péptidos que no sean miosina. La afinidad de unión y la selectividad se pueden determinar usando cualquier método reconocido en la técnica para determinar tales características, incluyendo, por ejemplo, el uso del análisis de Scatchard y/o ensayos de unión competitiva (competición).

La unión se puede evaluar y los valores de K_d se pueden determinar usando diversas técnicas conocidas en la materia. Por ejemplo, la unión a una molécula de ADN asociada a isquemia se evalúa habitualmente recubriendo un soporte sólido apropiado (por ejemplo, perlas, placa de ELISA o chip BIACORE) con fragmentos de ADN diana. Para un dominio polipeptídico de direccionamiento que se une a cualquier secuencia de ADN, los fragmentos de ADN (monocatenarios o bicatenarios) de 10 pares de bases o mayores se inmovilizan en el sustrato sólido. Para un dominio polipeptídico dirigido que se une a una secuencia específica o complejo de ADN (por ejemplo, complejo ADN-histona) se inmoviliza la diana correspondiente adecuada. Antes de agregar la molécula asociada a la isquemia, los sitios de unión no específicos para la proteína se bloquean con BSA, leche o cualquier otro bloqueador apropiado. Los pocillos recubiertos o pocillos recubiertos con una molécula no diana sirven como controles de la especificidad. Se incuban concentraciones crecientes de la proteína biespecífica de fusión (o dominio polipeptídico de direccionamiento) con sustrato recubierto con la diana o sustrato de control. Una proteína de fusión o dominio que no se une a la diana también se analiza como un control de la especificidad. La unión dependiente de la dosis específica de la diana de la proteína biespecífica de fusión (o del dominio polipeptídico de direccionamiento) se evalúa midiendo la cantidad de proteína de fusión biespecífica (o dominio polipeptídico de direccionamiento) que se une a la diana frente a los controles en función del aumento de la dosis utilizando protocolos estándar correspondientes al soporte sólido y la tecnología de unión utilizada. Los protocolos representativos incluyen los descritos en Wassaf y col., *Anal. Biochem.* 351 (2): 241-53 (2006); Epub 2006 Feb 10 (BIACORE); y Murray y Brown, *J. Immunol. Methods.* 127(1):25-8 (1990) (ELISA). Además, también se pueden realizar estudios que varían la cantidad de molécula diana inmovilizada o que incluyen niveles crecientes de molécula diana soluble como competidor para controlar la unión y la especificidad.

La afinidad de unión y las velocidades cinéticas de activación y desactivación de la molécula diana se miden usando técnicas estándar y se comparan con otras moléculas de control negativo (por ejemplo, proteína de fusión con polipéptido de direccionamiento irrelevante o proteína de fusión que carece de un polipéptido de direccionamiento o proteínas de fusión con polipéptido de direccionamiento que no es de unión y moléculas de control positivo (por ejemplo, anticuerpo parental que está dirigido a la molécula diana, u otros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que se sabe que se unen a la molécula diana). Por ejemplo, el polipéptido de direccionamiento no de unión puede ser una variante de no unión de la anexina V (SEQ ID NO: 84, secuencia de ácido nucleico SEQ ID NOs 233-234), una variante de no unión de la sinaptotagmina (SEQ ID NO: 74) o un scFv no de unión (SEQ ID NO: 75; secuencia de ácido nucleico SEQ ID NOs 236-237).

En determinadas realizaciones, la K_d se determina usando un biosensor (por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, BIACore) o análisis especular resonante (IASys)). Dichas determinaciones se pueden realizar según lo descrito por Hefta et al., *Measuring Affinity Using Biosensors*, en "Antibody Engineering: A Practical Approach," McCafferty et al. (eds), pág. 99-116 (Oxford University Press, 1996), y las referencias descritas en el mismo. Brevemente, las velocidades cinéticas de activación y desactivación (k_{en} y $k_{apagado}$) se determinan usando un chip sensor al que se ha acoplado la molécula asociada a la isquemia. Para evaluar la asociación (k_{on}), soluciones de diferentes concentraciones de proteína de fusión biespecífica (o dominio polipeptídico de direccionamiento) fluyen a través del chip, mientras la unión se monitoriza usando detección sensible a la masa. Usando el sistema BIACore system (GE Healthcare; Piscataway, NJ), k_{on} es la pendiente de la gráfica de dR/dt frente a R , donde R es la señal observada. Después de la unión, la disociación se observa pasando una solución tampón a través del chip, y la k_{off} se determina de manera análoga. La K_d se calcula después usando la ecuación:

$$K_d = k_{off}/k_{on}$$

En el contexto de la presente divulgación, una proteína de fusión biespecífica se une a la molécula diana si se une con una K_d inferior a 10^{-8} M, preferentemente inferior a 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M o 10^{-10} M. Además, la unión de la proteína biespecífica de fusión a la molécula diana en este ensayo es significativamente mayor (por ejemplo, al menos 2, 10 o 100 veces mayor) que la unión de la proteína biespecífica de fusión a los controles negativos. Preferentemente, la unión a la diana inmovilizada también puede competir usando una diana soluble en exceso.

Tal como se ha señalado anteriormente, ciertas moléculas diana son específicas de (o enriquecidas en) células dañadas. Moléculas diana representativas incluyen, pero sin limitación, fosfatidilserina, ADN, miosina, miosina cardíaca, c-Met (receptor del HGF), fosfatidilserina, P-selectina e ICAM-1. La unión a las células dañadas está convenientemente demostrada *in vitro* usando células cultivadas que están expuestas a condiciones que inducen necrosis o apoptosis. Por ejemplo, la necrosis puede inducirse en cardiomiocitos cultivados mediante isquemia/reperfusión simulada y monitorizarse usando un ensayo de liberación de LDH, o ensayo de azul tripán seguido de la sustracción del número de células que experimentan apoptosis, esencialmente como se describe en Shan et al., Am. J. Physiol. Cell. Physiol. 294:833-841 (2008). Este ensayo cuantifica las células muertas totales y la diferencia entre el total y el número de células apoptóticas se atribuye a la necrosis, como se analiza con más detalle a continuación. Las condiciones que inducen apoptosis incluyen la exposición a H_2O_2 , y la apoptosis puede monitorizarse usando cualquiera de diversas técnicas conocidas en la materia, incluyendo, por ejemplo, unión a anexina V, escisión de secuencias peptídicas diana por caspasas conocidas que se activan por apoptosis o escalonado de ADN (medido mediante ensayo TUNEL, esencialmente como se describe en Kuramochi, J. Biol. Chem. 279(49): 51141:-47 (2004)). La unión a las células que han sufrido necrosis o apoptosis se puede evaluar añadiendo proteína de fusión biespecífica marcada fluorescentemente (o dominio polipeptídico de direccionamiento) o proteínas de control apropiadas a las células después de la inducción de apoptosis o necrosis. Después de la incubación de las proteínas con las células durante tiempos que van desde unos minutos hasta un día, las células se lavan y luego se mide la fluorescencia unida a las células usando inmunofluorescencia, citometría de flujo o técnicas similares. Como alternativa, se pueden usar otros métodos para detectar la proteína biespecífica de fusión unida (o dominio polipeptídico de direccionamiento), incluyendo radiomarcaje o el uso de enzimas conjugadas con la proteína biespecífica de fusión (o dominio polipeptídico de direccionamiento) o con anticuerpos que se unen a la proteína de fusión (o dominio polipeptídico de direccionamiento), que es una práctica común en los protocolos de ELISA. La proteína biespecífica de fusión (o dominio polipeptídico de direccionamiento) se une a las células diana si se detecta una unión a las células tras la isquemia (por ejemplo, células que sufren necrosis o apoptosis) significativamente mayor (por ejemplo, 2 veces mayor), en comparación con las células que no han experimentado daños (por ejemplo, células que no experimentan apoptosis o necrosis).

El direccionamiento *in vivo* puede demostrarse induciendo, por ejemplo, isquemia en un modelo animal y comparando el nivel de proteína de fusión biespecífica administrada (o dominio polipeptídico de direccionamiento) en un tejido diana antes y después de la isquemia. El direccionamiento *in vivo* a las células dañadas puede demostrarse induciendo daños tisulares en un modelo animal, administrando la proteína biespecífica de fusión (o el dominio polipeptídico de direccionamiento) y comparando el nivel de proteína de fusión biespecífica (o dominio polipeptídico e direccionamiento) en las células dañadas frente a no dañadas. En una realización, las proteínas de fusión biespecíficas están diseñadas para dirigirse a áreas de daño tisular después de lesión por isquemia-reperfusión. En tal caso, la demostración del direccionamiento *in vivo* puede lograrse induciendo daño tisular, preferentemente mediante un método que causa isquemia seguido del restablecimiento de la irrigación sanguínea. Numerosos métodos están disponibles para hacerlo en diferentes tejidos. Por ejemplo, el flujo de sangre a la extremidad posterior del ratón se puede bloquear transitoriamente con un simple torniquete. Como alternativa, se puede emplear una pinza temporal en la arteria que conduce al riñón. Se puede inducir lesión por isquemia-reperfusión en el corazón a través del bloqueo temporal de la arteria coronaria como se demuestra en ratones, ratas, perros y cerdos. Los métodos representativos para inducir daño tisular en un modelo animal se resumen en la Tabla 1.

Tabla 1. Métodos representativos utilizados para inducir daño por isquemia-reperfusión

Órgano o tejido	Métodos utilizados para inducir daño	Referencia
Corazón	Ratón: arteria descendente anterior izquierda (LAD) pinzada durante hasta 30 minutos seguida de reperfusión Rata: ligadura de la arteria coronaria	Dumont et al., Circulation 102(13):1564-8 (2000) Davis, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 23:103 (21):8155-60 (2006)
Riñón	Ratón: Arteria renal pinzada con sutura pediátrica durante 1-6 h	Chen et al., FASEB J. 4(12): 3033-39 (1990)
Hígado	Perro: El pedículo hepático y la arteria hepática (cerca de la arteria celíaca) se pinzaron transversalmente con pinzas vasculares. Cerdo: Detalles en la referencia	Miranda et al., Braz. J. Med. Biol. Res. 40 (6):857-65 (2007) Kobayashi et al., World J. Gastroenterol. 13(25):3487-92 (2007)

Extremidad posterior	Zbinden et al., Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 292: H1891-H1897 (2007)
----------------------	--

Los modelos animales para la lesión por isquemia-reperfusión se detallan adicionalmente en las siguientes referencias:

5 Greenberg et al., Capítulo 7. Mouse models of ischemic angiogenesis and ischemia-reperfusion injury. *Methods Enzymol.* 444:159-74 (2008).

10 Chimenti et al., Myocardial infarction: animal models. *Methods Mol. Med.* 98:217-26 (2004). Black SC, In vivo models de myocardial ischemia and reperfusion injury: application to drug discovery and evaluation. *J. Pharmacol. Toxicol. Methods* 43 (2): 153-67 (2000).

15 La especificidad del direccionamiento puede establecerse comparando la deposición de la proteína biespecífica de fusión (o del dominio polipeptídico de direccionamiento) en el riñón pinzado frente al no pinzado, como se muestra en Chen et al., *FASEB J.* 4(12): 3033-39 (1990), o en la extremidad posterior tratada frente a no tratada como se muestra en Zbinden et al., *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 292: H1891-H1897 (2007)), usando proteína de fusión biespecífica radiomarcada (o dominio polipeptídico de direccionamiento). Como alternativa, la proteína biespecífica de fusión (o dominio polipeptídico de direccionamiento) puede detectarse en tejido homogeneizado usando ELISA, o pueden formarse imágenes en tiempo real utilizando proteína de fusión biespecífica (o dominio polipeptídico de direccionamiento) marcada con el metal apropiado para formación de imágenes (por ejemplo, Tc99, Y o Gd). La deposición específica en el área dañada del corazón se puede medir como se describe en Dumont et al., *Circulation* 102(13):1564-8 (2000). Los métodos representativos para demostrar el direccionamiento de las proteínas al tejido dañado se muestran en la Tabla 2.

Tabla 2. Demostración del direccionamiento al tejido dañado

Órgano o tejido dañado diana	Métodos utilizados para demostrar la liberación dirigida	Referencia
Corazón	Seres humanos: Marcaje con Tc99 de anexina V, seguido de obtención de imágenes en seres humanos usando SPECT en pacientes con infarto de miocardio seguido de intentos de reperfusión a través de angioplastia o trombólisis	Hofstra et al., <i>The Lancet</i> 356 (9225): 209-12 (2000)
Corazón	Ratón: Marcaje fluorescente de anexina V en el modelo murino de isquemia reperfusión con distribución en el miocardio detectada histológicamente	Dumont et al., <i>Circulation</i> 102(13): 1564-8 (2000)
Corazón	Seres humanos: Marcaje con Tc99 de anexina V, seguido de obtención de imágenes en seres humanos usando SPECT en pacientes que están sufriendo rechazo de trasplante cardíaco	Hofstra et al., <i>The Lancet</i> 356 (9225): 209-12 (2000)
Corazón	Ratón: Obtención de imágenes del factor de crecimiento marcado fluorescentemente en el tejido cardíaco mediante microscopía confocal	Urbanek, <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> 102 (24): 8692-97 (2005)
Riñón dañado diana usando anticuerpo radiomarcado frente al ADN	Radiografías de riñón pinzado frente a no pinzado Microautorradiografías para mostrar la localización de estructuras celulares específicas en el riñón Imágenes de ratones enteros usando anticuerpos marcados con I131 frente al ADN (frente al control marcado) Biodistribución del anticuerpo marcado con I125 para mostrar la deposición en tejidos no diana	Chen et al., <i>FASEB J.</i> 4 (12):3033-9 (1990)

25 Tal como se ha señalado anteriormente, ciertos dominios polipeptídicos de direccionamiento comprenden un anticuerpo que se une a la molécula diana (por ejemplo, ADN, miosina, miosina cardíaca, c-Met, P-selectina, ICAM-1). En algunas realizaciones, el dominio de direccionamiento es un anticuerpo anti-miosina (por ejemplo, R11D-10 contra la miosina cardíaca humana, 2G4-sD7 contra la cadena pesada de la miosina cardíaca, 1B2 y 5C2 contra la cadena pesada de la miosina cardíaca humana, 2F4 contra la miosina cardíaca humana, anticuerpos monoclonales contra la miosina, anticuerpo B7, B7 scFv, u otros anticuerpos conocidos en la técnica). En algunas realizaciones, ciertos dominios polipeptídicos de direccionamiento comprenden un anticuerpo scFv que se une a la molécula diana. Por ejemplo, el dominio de direccionamiento puede ser un SI-1 scFv anti-ADNA (aADNSI1, SEQ ID NO: 1 o 73) y un SI-22 scFv anti-ADN (aADNS122, SEQ ID NO: 2). Anticuerpos representativos de estos y anticuerpos scFv comprenden o tienen las secuencias proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NO: 1, 2, 30, 73 y 76-80. En algunas realizaciones, secuencias de ácido nucleico de dichos anticuerpos y anticuerpos scFv representativos

comprenden o tienen las secuencias proporcionadas en el presente documento como SEQ ID NOs220 -224.

Será evidente que también, o como alternativa, pueden usarse anticuerpos funcionalmente relacionados como dominio polipeptídico de direccionamiento. Los anticuerpos interactúan con antígenos diana predominantemente a través de residuos de aminoácidos que se localizan en las seis regiones de complementariedad (CDR) de las cadenas pesada y la ligera. Por este motivo, las secuencias de aminoácidos dentro de las CDR son más diversas entre anticuerpos individuales que las secuencias fuera de las CDR. Debido a que las secuencias de CDR son responsables de la mayoría de las interacciones anticuerpo-antígeno, es posible generar anticuerpos modificados que imitan las propiedades de un anticuerpo original mediante la combinación de secuencias de CDR de un anticuerpo con secuencias marco de un anticuerpo diferente. Dichas secuencias estructurales se puede obtener de bases de datos de ADN públicos que incluye las secuencias génicas de anticuerpo germinal.

Por lo tanto, una o más CDR de una secuencia de dominio polipeptídico de direccionamiento proporcionadas en el presente documento pueden usarse para crear anticuerpos funcionalmente relacionados que conservan las características de unión del dominio polipeptídico de direccionamiento original. En una realización, una o más regiones CDR seleccionadas de las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 73 y 76-80 se combinan de forma recombinante con regiones marco humanas conocidas y CDR para crear dominios polipeptídicos de direccionamiento modificados de forma recombinante adicionales. Las regiones marco variables de las cadenas pesada y ligera se pueden derivar de secuencias de anticuerpos iguales o diferentes. Las regiones CDR se identifican fácilmente usando alineaciones con secuencias conocidas en bases de datos tales como Vbase e IMGT. Los dominios polipeptídicos de direccionamiento resultantes comparten una o más CDR con los dominios polipeptídicos de direccionamiento de las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 73 y 76-80. En determinadas realizaciones, el dominio polipeptídico de direccionamiento comprende al menos una CDR de una secuencia tal como se cita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 73 y 76-80.

Es bien conocido en la materia que los dominios de CDR3 de las cadenas pesada y ligera del anticuerpo desempeñan un papel particularmente importante en la especificidad/afinidad de unión de un anticuerpo por un antígeno. Por consiguiente, en determinadas realizaciones, se generan anticuerpos que incluyen las CDR3 de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos particulares descritos en el presente documento. Los anticuerpos pueden incluir adicionalmente CDR1 y/o CDR2 de las cadenas pesada y/o ligera de los anticuerpos descritos en el presente documento.

Las regiones CDR 1, 2 y/o 3 de los anticuerpos modificados por ingeniería descritos anteriormente pueden comprender la o las secuencias de aminoácidos exactas como las descritas en el presente documento. Sin embargo, el experto en la técnica apreciará que puede ser posible alguna desviación de las secuencias CDR exactas, particularmente para las secuencias CDR1 y CDR2, que pueden tolerar más variación que las secuencias CDR3 sin alterar la especificidad del epítipo (tales desviaciones son, por ejemplo, sustituciones conservadoras de aminoácidos). Por consiguiente, en otra realización, el anticuerpo modificado por ingeniería genética puede estar compuesto por una o más CDR1 y CDR2 que son, por ejemplo, 80 %, 90 %, 95 %, 98 %, 99 % o 99,5 % idénticas a las CDR correspondientes de un anticuerpo citado en el presente documento.

En otra realización, uno o más residuos de una CDR pueden alterarse para modificar la unión para lograr una velocidad de asociación de la unión más favorecida, o una velocidad de disociación de la unión más favorecida. Usando esta estrategia, se puede obtener un anticuerpo que tiene una afinidad de unión ultraalta (por ejemplo, $K_d = 10^{-10}$ o menos). Las técnicas de maduración de afinidad, bien conocidas en la materia, se pueden usar para alterar la región o regiones de CDR, seguido de detección selectiva del cambio deseado en la unión de las moléculas de unión resultantes. Por consiguiente, como las CDR (s) se alteran, los cambios en la afinidad de unión así como en la inmunogenicidad pueden monitorizarse y puntuarse de manera que se logre un anticuerpo optimizado para la mejor unión combinada y baja inmunogenicidad.

También pueden realizarse modificaciones dentro de una o más de las regiones marco o de unión (es decir, residuos que no son CDR) de las regiones variables de las cadenas pesada y/o ligera de un anticuerpo, siempre que la afinidad de unión al antígeno posterior a estas modificaciones no haya disminuido sustancialmente.

El dominio activador

El dominio activador es cualquier polipéptido que modula de forma detectable la actividad de una red celular o recluta células de una ubicación a otra. En algunas realizaciones, el dominio activador es capaz de activar rutas de transducción de señal uniéndose a un receptor en la superficie de una célula. En algunas realizaciones, ciertos dominios activadores son polipéptidos de factor de crecimiento, polipéptidos de citocinas (por ejemplo, un polipéptido de quimiocina) o cualquier agonista del receptor o ligandos de unión a integrina. Será evidente que tal modulación puede ser un aumento o una disminución en la actividad de la red celular, tal como la inducción de la proliferación de células, la inducción del crecimiento celular, la estimulación de la supervivencia celular y/o la inhibición de la apoptosis. En algunas realizaciones, el dominio activador puede reclutar otros factores o células (por ejemplo, células madre).

Un polipéptido del factor de crecimiento modula de forma detectable la activación de un receptor del factor de

crecimiento (tal como receptor de HGF o de IGF). Algunos de tales polipéptidos son el factor de crecimiento de hepatocitos de tipo salvaje (HGF) o la cadena alfa de HGF (por ejemplo, número de acceso de GENBANK P14210), o sus derivados, que retienen al menos el 10 % de la actividad biológica de tipo silvestre, tal como se determina midiendo la activación del receptor del factor de crecimiento correspondiente en células diana apropiadas. La activación puede evaluarse, por ejemplo, midiendo la fosforilación del receptor cinasa o las proteínas aguas abajo, tales como AKT, esencialmente como describen Nishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7018-7023 (1998). También pueden usarse ensayos MTT y CTG.

En algunas realizaciones, el dominio activador es un factor de crecimiento. En algunas realizaciones, el dominio activador comprende lo anterior o una variante de la proteína. los dominios activadores representativos incluyen, pero no se limitan a, factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento de fibroblastos 1 (FGF1), factor de crecimiento de fibroblastos 2 (FGF2, también conocido como factor de crecimiento de fibroblastos básico (bFGF)), factor de crecimiento de fibroblastos 2, 146aa (FGF2-146aa), factor de crecimiento de fibroblastos 7 (FGF7), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento similar a la insulina (IGF), factor de crecimiento similar a la insulina 1 (IGF1), factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF2), factor de crecimiento de hepatocitos (HGF), dominios del factor de crecimiento de hepatocitos NK1 (HGF-NK1), dominio del factor de crecimiento de hepatocitos K1 (HGF-K1), dominios del factor de crecimiento de hepatocitos NK2 (HGF-NK2), dominio del factor de crecimiento de hepatocitos K2 (HGF-K2), neuregulina (NRG, también conocida como heregulina (HRG)), dominio extracelular 1beta de neuregulina (NRG1beta-ECD), dominio similar a EGF 1beta de neuregulina (NRG1beta-EGF), timosina, timosina beta 4 (Tbeta4), factor estimulante de colonias de granulocitos (G-CSF), factor de células madre (SCF, también conocido como factor de crecimiento de mastocitos (MGF), periostina, factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF, también conocido como factor de crecimiento endotelial vascular-A (VEGF-A)), factor de crecimiento endotelial vascular-A-121 (VEGF-A-121), factor de crecimiento endotelial vascular-A-165 (VEGF-A-165), factor de crecimiento endotelial vascular B (VEGF-B), factor de crecimiento endotelial vascular B-167 (VEGF-B-167), factor de crecimiento endotelial vascular-C (VEGF-C), factor derivado de células estromales (SDF), factor derivado de células estromales 1 (SDF-1), factor derivado de células estromales alfa 1 (SDF-1alfa), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas AA (PDGF-AA), factor de crecimiento derivado de plaquetas AB (PDGF-AB), factor de crecimiento derivado de plaquetas BB (PDGF-BB), factor de crecimiento derivado de tetracarcinoma (TDGF), factor de crecimiento derivado de tetracarcinoma 1 (TDGF1), factor de crecimiento neural (NGF), factor de crecimiento neural beta (beta NGF), factor neurotrófico derivado de cerebro (BDNF), neurotrofina-3 (NT-3), tromboxetina (TPO), factor de crecimiento transformante beta1 (TGF- β 1), factor de crecimiento transformante beta2 (TGF- β 2), proteína morfogénica ósea (BMP), proteína morfogénica ósea 2 (BMP2), BMP-2 monocatenaria (scBMP2), proteína morfogénica ósea 3 (BMP3), proteína morfogénica ósea 4 (BMP4), activina A, betacelulina, beta-catenina, homólogo dickkopf 1 (Dkk1), eritropoyetina (EPO), hormona del crecimiento (GH), factor de crecimiento similar a EGF de unión a heparina (HBEGF), insulina, interleucina (IL), interleucina 6 (IL-6), interleucina 10 (IL-10), interleucina 33 (IL-33), factor inhibidor de la leucemia (LIF), proteína quimiotáctica monocítica 1 (MCP1, también conocida como CCL2), pleiotrofina (PTN), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), Wnt, Wnt1, Wnt2, Wnt3a, Wnt7a, Wnt8a, Wnt11 o anticuerpo que tiene una especificidad para un receptor activador, variante de los mismos, isoformas de los mismos, fragmento de los mismos y combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el dominio activador está diseñado para comprender una única cadena de un factor de crecimiento o dominio del factor de crecimiento. Por ejemplo, el dominio activador puede diseñarse para comprender dos o más copias de un dominio del factor de crecimiento (por ejemplo, BMP-2) unidos entre sí a través de un enlazador (por ejemplo, GGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 103).

Los polipéptidos representativos del factor de crecimiento tienen una secuencia como la enumerada en las SEQ ID NO: 3-9 32-40 o 50-64, en el presente documento. El factor de crecimiento representativo puede codificarse mediante las secuencias de ácido nucleico que se citan en las SEQ ID NO: 187-211, en el presente documento.

Como se ha tratado anteriormente para las CDR de algunos de los dominios polipeptídicos de direccionamiento, los dominios activadores que comparten uno o más dominios, módulos o secuencias de aminoácidos con los dominios activadores o variaciones de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 o 50-64, también se contemplan. Dichos dominios, módulos o secuencias de aminoácidos se pueden identificar y dichos dominios activadores se pueden construir usando técnicas bien conocidas. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el dominio activador comprende al menos un dominio, módulo o secuencia de aminoácidos o variación de una secuencia como se cita en las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 o 50-64. Asimismo, un polipéptido de citoquina modula la activación del receptor de citoquina correspondiente, como se determina de la misma manera.

En determinadas realizaciones, el dominio activador es un polipéptido de factor de crecimiento, que se une a un receptor del factor de crecimiento en una superficie celular. Tales receptores representativos del factor de crecimiento son receptores para el factor de crecimiento epidérmico (EGF), neuregulina/heredulina (NRG/HRG), factor de crecimiento de fibroblastos (FGF), factor de crecimiento similar a la insulina (por ejemplo, IGF-I), factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) e isoformas de los mismos (por ejemplo, VEGF-A o VEGF-C), factor de crecimiento derivado de tetracarcinoma 1 (TDGF1), factor de crecimiento transformante alfa (TGF- α), factor transformante de crecimiento beta (HGF- β) e isoformas de los mismos, por ejemplo, TGF- β 1 o TGF- β 2, tromboxetina (THPO) o periostina. Otros de estos receptores incluyen el receptor del factor de crecimiento de células madre/mastocitos (SCFR), receptor del factor de crecimiento de

hepatocitos (receptor de HGF, es decir, c-Met), ErbB-2, ErbB-3, ErbB-4, receptor del factor de crecimiento neural de alta afinidad, receptor de los factores de crecimiento BDNF/NT-3, receptor del factor de crecimiento NT-3 o receptor 1 del factor de crecimiento endotelial vascular (VEGFR-I).

5 Los receptores de citocinas representativos incluyen, por ejemplo, receptor de citocina FL, receptor de la cadena gamma común del receptor de citocinas, cadena alfa del receptor de interleucina 10, cadena beta del receptor de interleucina 10, cadena beta 1 del receptor de interleucina 12, cadena beta 2 del receptor de interleucina 12, cadena alfa 1 del receptor de interleucina 13, cadena alfa 2 del receptor de interleucina 13, receptor de interleucina 17; receptor de interleucina 17B, precursor del receptor de interleucina 21, receptor de tipo I de interleucina -1, receptor de tipo II de interleucina -1, cadena alfa del receptor de interleucina 2, cadena beta del receptor de interleucina 2, cadena alfa del receptor de interleucina 3, cadena alfa del receptor de interleucina 4, cadena alfa del receptor de interleucina 5, cadena alfa del receptor de interleucina 6, cadena beta del receptor de interleucina 6, cadena alfa del receptor de interleucina 7, receptor A de interleucina 8 de alta afinidad, receptor B de interleucina 8 de alta afinidad, receptor de interleucina 9, receptor 1 de interleucina 18, precursor similar al receptor 1 de interleucina 1, similar al receptor 2 de interleucina 1, receptor 1 de tipo toll, receptor 2 de tipo toll, receptor 5 de tipo toll, receptor 1 de quimiocina CX3C, receptor de tipo 3 de quimiocina C-X-C, receptor de tipo 4 de quimiocina C-X-C, receptor de tipo 5 de quimiocina C-X-C, receptor de tipo 6 de quimiocina C-X-C, receptor de tipo 1 de quimiocina C-C, receptor de tipo 2 de quimiocina C-C, receptor de tipo 3 de quimiocina C-C, receptor de tipo 4 de quimiocina C-C, receptor de tipo 6 de quimiocina C-C, precursor del receptor de tipo 7 de quimiocina C-C, receptor de tipo 8 de quimiocina C-C, receptor de tipo 9 de quimiocina C-C, receptor de tipo 10 de quimiocina C-C, receptor de tipo 11 de quimiocina C-C, receptor de tipo 2 de quimiocina y receptor de quimiocina XC. Todavía otros dominios activadores son receptores para la familia de transportadores de aniones orgánicos portadores de soluto, miembro 1A2 (SLCO1A2), esfingosina quinasa 1 (SPHK1), fosfoproteína secretada 1 (SPP1), también llamada osteopontina (OPN), proteína tumoral 53 (TP53), troponina T tipo 1 (TNNT1), proteína 2 similar a TSPY (TSPYL2), visfatina, dominio 1 del núcleo de cuatro disulfuros WAP (WFDC1), timosina beta 4, familia del sitio de integración de MMTV de tipo wingless, miembro 11 (WNT11). Los dominios activadores representativos incluyen, por ejemplo, resistina, factor 1 derivado de células estromales (SDF-1), gen 1 asociado a la proliferación inducida por señal (SIPA1) y cualquiera de los otros ligandos enumerados anteriormente, así como porciones y derivados de los anteriores que conservan sustancialmente la capacidad de unirse a receptores afines.

30 Las integrinas son receptores que median en la unión de una célula a otras células o tejido que la rodea. Las integrinas se unen a la superficie celular y a los componentes de la matriz extracelular tales como fibronectina, vitronectina, colágeno y laminina. Las integrinas representativas incluyen, por ejemplo, $\alpha_1\beta_1$, $\alpha_2\beta_1$, $\alpha_4\beta_1$, $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_6\beta_1$, $\alpha_L\beta_2$, $\alpha_M\beta_2$, $\alpha_{IIb}\beta_3$, $\alpha_V\beta_3$, $\alpha_V\beta_5$, $\alpha_V\beta_6$, $\alpha_6\beta_4$.

35 Como prueba inicial, la unión de una proteína de fusión biespecífica (o dominio activador de la misma) al receptor apropiado puede evaluarse usando técnicas conocidas en la materia. En un ensayo representativo, la unión se demuestra recubriendo un soporte sólido apropiado con el ectodominio recombinante del receptor apropiado. Un ectodominio de un receptor no reconocido por el dominio activador de la proteína biespecífica de fusión se usa como un control de especificidad. Un sustrato de soporte que no tiene ningún receptor inmovilizado también se usa como control. De forma similar a los métodos descritos anteriormente para la unión a la molécula asociada a isquemia, se demuestra una unión específica dependiente de la dosis al receptor usando protocolos estándar correspondientes al soporte sólido y a la tecnología de unión que se usa. Además, también se realizan estudios que varían la cantidad de receptor o que incluyen niveles crecientes de molécula diana soluble como competidor para controlar la unión y la especificidad. Como alternativa, la proteína biespecífica de fusión se inmoviliza en un soporte y la unión del ectodominio soluble del receptor o receptores correspondientes se usa para demostrar la unión específica dependiente de la dosis.

50 La afinidad de unión y las velocidades cinéticas de activación para la unión de la proteína biespecífica de fusión al receptor o receptores también se miden utilizando técnicas estándar y se comparan con otras moléculas de control negativas (proteína de fusión con el dominio activador de control irrelevante, proteína de fusión que carece de dominio activador) y moléculas de control positivo (ligando recombinante del receptor de tipo salvaje, tal como un factor de crecimiento o citocina). Los parámetros de unión en equilibrio y cinética de la proteína biespecífica de fusión también se comparan con los mismos parámetros medidos para el ligando no fusionado de tipo salvaje para determinar si la fusión del ligando a otras moléculas afecta a la unión normal del ligando a su correspondiente receptor. Tal información puede usarse para determinar la dosis efectiva de la proteína biespecífica de fusión.

60 Una proteína de fusión biespecífica se une al receptor del factor de crecimiento inmovilizado o receptor de citoquina con una afinidad significativamente mayor (por ejemplo, al menos 100 veces) que la observada para los controles negativos. Además, la unión al receptor inmovilizado puede competir usando polipéptido soluble en exceso, receptor soluble o anticuerpos que se unen al polipéptido o receptor y bloquean su interacción. Preferentemente, la proteína biespecífica de fusión se une al factor de crecimiento o receptor de citocina con una afinidad dentro de 1000 veces de la unión del ligando nativo a su receptor.

65 Una proteína de fusión biespecífica (y su dominio activador) además tiene la capacidad de mediar en la activación del receptor afín. Dicha actividad puede evaluarse, por ejemplo, usando un modelo celular de reperfusión de

isquemia, que usa cardiomiocitos cultivados, tales como miocitos ventriculares de rata neonatal (NRVM) o líneas celulares. La isquemia simulada (SI) generalmente se inicia con inhibidores metabólicos (desoxiglicosa y ditionita) y metabolitos (alto contenido de potasio, lactato, pH bajo) o por hipoxia en una cámara anaeróbica. La reperfusión se simula mediante resuspensión en un tampón oxigenado. Se ha desarrollado un modelo in vitro de isquemia de sedimentos de miocardiocitos adultos que proporciona los dos componentes principales de la isquemia-hipoxia y la acumulación de metabolitos, en ausencia de cualquier inhibidor o metabolito metabólico exógeno. La Tabla 3 muestra métodos representativos para demostrar la capacidad de una proteína de fusión biespecífica para prevenir el daño de los cardiomiocitos, promover el crecimiento, la motilidad o la diferenciación de las células madre cardíacas y/o estimular la reparación del tejido dañado.

5

10

Tabla 3. Métodos de evaluación de la actividad

Aspecto	Ensayo	Referencia
Cinética de localización y retención del dominio activador	<ul style="list-style-type: none"> • Detección del dominio activador en el lisado celular mediante ELISA • Detección del dominio activador en células mediante inmunofluorescencia (citometría de flujo o microscópica) 	Davis, Proc Natl Acad Sci USA 103(21):8155-60 (2006) Urbaneck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
Señalización por dominio activador	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de fosfo-akt o fosfo-ERK en células por citometría de flujo, inmunofluorescencia, ELISA, fosfomarcaje o Western 	Davis, Proc Natl Acad Sci USA 103(21):8155-60 (2006) Urbaneck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
Protección de las células contra la apoptosis después de la hipoxia	<ul style="list-style-type: none"> • Unión a anexina V por inmunofluorescencia o citometría de flujo 	
u otro estresante celular	<ul style="list-style-type: none"> • Detección de la actividad de caspasa • Ensayo TUNEL (número reducido de células positivas en TUNEL) • Escalonado de ADN Viabilidad celular Mejora de la viabilidad de los cardiomiocitos después de la exposición a H ₂ O ₂ . Número de células con forma de barra Evaluación por pPCR de la expresión génica	
Protección de las células contra la necrosis	Área necrótica reducida por tinción de H & E	
Reducción en la formación de cicatrices	Reducción en el número de células fibroblásticas en el área del infarto Reducción de la deposición de colágeno Reducción de otras proteínas de la matriz asociadas con la formación de cicatrices	
Migración de CSC al área del infarto	Incremento de c-kit+ dependiente del tiempo, sca-1 +, número de células MDR1+ y número que sufren transición a miocitos pequeños	Urbaneck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
Mecánica de los miocitos y fusión celular:	Frecuencia de distribución de los tamaños de los miocitos Acortamiento del pico Velocidad de acortamiento y realargamiento Evaluación de la fusión celular (número de cromosomas X)	Urbaneck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
Evaluación de la función cardíaca	Comparación de animales tratados con MI frente a no tratados con MI •LVEDP <ul style="list-style-type: none"> • LVDP • +dp/dT • Peso del LV • Volumen de la cámara • Tensión parietal diastólica • Supervivencia 	Urbaneck, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)

Regeneración del miocardio	Composición del miocardio regenerado Evaluación de células BrdU + en el área del infarto en animales tratados frente a no tratados Células miosina+ en el área del infarto en animales tratados frente a animales no tratados	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97 (2005)
Estructura cardíaca	Tamaño del infarto Fibrosis	Urbanek, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (24): 8692-97
	Hipertrofia de los cardiomiocitos	(2005)

Los factores de crecimiento nativos y las citocinas se pueden usar como dominios activadores. Será evidente, sin embargo, que también se pueden usar porciones de dichas secuencias nativas y polipéptidos que tienen secuencias alteradas, con la condición de que tales polipéptidos retuvieran la capacidad de activar el receptor afín (por ejemplo, usando uno de los ensayos discutidos a continuación), tales polipéptidos activan de forma detectable el receptor, y, preferentemente, activan el receptor en un grado que es al menos 1 % (preferentemente al menos 10 %) del observado para el ligando nativo. Ciertos dominios activadores que se unen a los receptores del factor de crecimiento se proporcionan en el presente documento en las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64. La actividad de las proteínas de fusión que comprenden tales secuencias es bien conocida en la técnica (por ejemplo, Hashino et al., J. Biochem. 119 (4): 604-609 (1996); Nishi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:7018-23 (1998)).

Un dominio activador para una aplicación particular se puede seleccionar en función del resultado terapéutico deseado. Por ejemplo, un dominio activador que comprende FGF2, VEGF alfa, o una porción o derivado del mismo, que retiene sustancialmente la capacidad de unirse al receptor análogo, se puede usar generalmente para aumentar la angiogénesis. Para aumentar la supervivencia y para fines de diferenciación de células madre (regenerativos), se pueden usar dominios activadores que comprenden IGF, HGF o NRG1 (o una parte o derivado de los mismos).

En algunos casos, puede ser deseable evaluar la actividad tanto del dominio activador como del polipéptido de direccionamiento simultáneamente. Para este fin se puede usar convenientemente un ELISA.

El sustrato del polipéptido de direccionamiento (por ejemplo, ADN) se adsorbe a la placa de ELISA, que a continuación se bloquea con tampones apropiados que contienen BSA. A continuación, se añade la proteína biespecífica de fusión, seguido de la adición de sustrato recombinante para el dominio activador (por ejemplo, si el activador es un factor de crecimiento, el sustrato es un receptor afín recombinante o un fragmento del receptor (ectodominio)). Este sustrato se marca fluorescentemente para su detección o se detecta usando un anticuerpo marcado en una región del receptor que no afecta significativamente a la unión del ligando.

La actividad *in vivo* de la proteína biespecífica de fusión generalmente se evalúa detectando cambios de señalización en las moléculas que están reguladas por el dominio activador de la proteína biespecífica de fusión. Esto normalmente implica cambios en el estado de fosforilación del receptor de la superficie celular o mediadores aguas abajo, tales como fosfo-AKT o fosfo-ERK como se detecta mediante citometría de flujo, inmunofluorescencia, ELISA, fosfomarcaje o análisis Western de los tejidos tratados. Otras evaluaciones funcionales incluyen pruebas para el número de células viables mediante tinción e identificación morfológica, el nivel de apoptosis por unión a la anexina V (mediante inmunofluorescencia) o citometría de flujo, detección de actividad de la caspasa, ensayo TUNEL (número reducido de células positivas en TUNEL) o escalonado de ADN. En cada caso, una proteína de fusión biespecífica funciona *in vivo* si induce un cambio significativo del nivel de actividad funcional o fosforilación de la molécula regulada detectada por el ensayo (por ejemplo, de al menos 2 veces).

La reparación del tejido dañado en un paciente puede evaluarse usando cualquier patrón clínicamente relevante. Por ejemplo, la reparación del tejido infartado se puede medir mediante la cuantificación del número de células, tal como el número de miocitos, fibroblastos o la cantidad de cicatrización, o con ensayos funcionales para el rendimiento o aspectos estructurales de la función cardíaca, incluidos LVEDP, LVDP, +dp/dT, Peso del LV, Volumen de la cámara y Tensión parietal diastólica. Los métodos para tales evaluaciones son bien conocidos y ampliamente descritos en la literatura. En general, se dice que una proteína de fusión biespecífica repara el tejido dañado si resulta en un cambio significativo (por ejemplo, de al menos 2 veces) en cualquier evaluación clínica de este tipo.

Modulador de la semivida

Un experto en la materia apreciaría que las proteínas biespecíficas utilizadas en aplicaciones terapéuticas pueden no exhibir semividas séricas óptimas debido a su peso molecular relativamente bajo. En algunas aplicaciones terapéuticas, puede ser deseable modular la semivida de las proteínas biespecíficas. En algunas realizaciones, para lograr la acumulación de la proteína biespecífica en el área dañada lesionada o dañada de un órgano, la proteína biespecífica se conjuga con un modulador de la semivida. Tales moduladores de la semivida pueden aumentar la semivida *in vivo* de las proteínas de fusión. Por ejemplo, la semivida de las proteínas biespecíficas que comprenden el modulador de la semivida es de aproximadamente 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas o más. En algunas realizaciones, la semivida de las proteínas biespecíficas que comprenden el modulador de la semivida es de aproximadamente 24 horas o más. En algunas realizaciones, la semivida de las proteínas biespecíficas que

comprenden el modulador de la semivida es de aproximadamente una semana o más.

El dominio polipeptídico de direccionamiento y el dominio activador pueden estar unidos directamente a través de un enlace peptídico. En algunas realizaciones, se pueden unir a través de un modulador de la semivida. En realizaciones preferidas, el modulador de la semivida es un polipéptido. Por consiguiente, el modulador de la semivida puede tener dos extremos, un extremo N y un extremo C. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida está unido en un extremo a través de un enlace peptídico al dominio polipeptídico de direccionamiento y está unido al otro extremo a través de un enlace peptídico al dominio activador. En determinadas realizaciones, el enlazador está unido en el extremo N al extremo C del dominio polipeptídico de direccionamiento y en el extremo C al extremo N del dominio activador. En otras realizaciones, el enlazador está unido en el extremo C al dominio polipeptídico de direccionamiento y en el extremo N al extremo N del dominio activador. Sin embargo, en otras realizaciones, el modulador de la semivida está unido en uno de los extremos de la proteína biespecífica. Por ejemplo, en algunas realizaciones, el modulador de la semivida está unido en el extremo C al extremo N del dominio activador. En otras realizaciones, el modulador de la semivida está unido en el extremo C al dominio de direccionamiento. En otras realizaciones, el modulador de la semivida puede estar unido en el extremo N al extremo C del dominio activador. Todavía en otras realizaciones, el modulador de la semivida puede estar unido en el extremo N al extremo C del dominio de direccionamiento.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida está diseñado para impulsar el tamaño de la proteína biespecífica de fusión más allá de aproximadamente 70 kDa o un radio equivalente para minimizar el aclaramiento renal. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida está diseñado para extender la semivida de la proteína biespecífica de fusión a través del reciclado mediado por el receptor FcRn o mediante la unión a componentes del suero tales como seroalbúmina humana (HSA).

Preferentemente, el modulador de la semivida no es inmunogénico en seres humanos. El modulador de la semivida puede ser una proteína de suero humano o un derivado de la misma que conserva al menos el 50 % de identidad de secuencia en una región que consiste en al menos 100 aminoácidos consecutivos. Como se usa en el presente documento, "identidad de secuencia" significa, en el contexto de comparación de un polinucleótido o una secuencia de polipéptido con una secuencia de referencia, que la secuencia polinucleotídica o polipeptídica es la misma o tiene un porcentaje especificado de nucleótidos o residuos que son iguales en las localizaciones correspondientes dentro de la secuencia de referencia cuando las secuencias polinucleotídicas o polipeptídicas están óptimamente alineadas.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida puede modificarse por glicosilación de uno o más sitios de glicosilación presentes en el modulador de la semivida. Por ejemplo, los siguientes aminoácidos: asparagina, serina, se puede añadir o retirar treonina para alterar la glicosilación del modulador de la semivida. En algunas realizaciones, la glucosilación del modulador de la semivida en la proteína biespecífica puede modular la semivida de la proteína biespecífica. En algunas realizaciones, la secuencia del modulador de la semivida se modifica para reducir la glicosilación. Tal modificación comprende la sustitución de Asn (N) por Gln (Q) o Ala (A), y/o la sustitución de Ser (S) o Thr (T) por Ala (A).

La seroalbúmina humana (HSA) tiene una semivida en suero naturalmente larga, en parte debido a su unión a FcRn y al reciclado. HSA es la proteína más abundante en la sangre y tiene una seguridad demostrada en seres humanos. En algunas realizaciones, la asparagina en la posición 503 de HSA, que puede desamidarse y disminuir la semivida, puede eliminarse mediante la sustitución N503Q. En algunas realizaciones, la cisteína C34 de HSA puede sustituirse por serina o alanina (S o A) para eliminar la cisteína libre y minimizar la formación de enlaces disulfuro alternativos. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida es una versión modificada del dominio III (mHSA_dIII) de una HSA modificada con la sustitución N503Q y una glicina terminal adicional. Tal versión modificada conserva la propiedad de HSA de unirse a FcRn y aumentar la semivida en suero. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de la seroalbúmina humana (SEQ ID NO: 12). En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en las SEQ ID NO: 10, 12, 24-28, 65 o 67. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en las SEQ ID NO: 212-215.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de la alfa-fetoproteína humana (AFP) (SEQ ID NO: 29, 68). En algunas realizaciones, el sitio de glucosilación unido a N de la AFP se elimina mediante la sustitución N251Q. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en las SEQ ID NO: 29, 68 o 69. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 216.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de la proteína de unión a la vitamina D (VDPB). En algunas realizaciones, el sitio de glucosilación unido a N de la VDPB se puede eliminar mediante la sustitución N288Q o N288T. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 66. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del modulador de

la semivida comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 219.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de la transtiretina (TTR) humana. En algunas realizaciones, la transtiretina se modifica para eliminar el sitio de N-glicosilación N118. En algunas realizaciones, el modulador de la semivida es una forma monomérica de la TTR.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de Fc humana. El dominio Fc de un anticuerpo tiene una capacidad natural para unirse a FcRn, dando como resultado una semivida extendida. En algunas realizaciones, el dominio Fc de un anticuerpo se modifica por ingeniería genética para que no se una a Fc (gamma) R. En una realización de ejemplo, el dominio Fc se modifica por ingeniería genética para sustituir N397 por Q (variante N297Q). En algunas realizaciones, el modulador de la semivida es una variante forma monomérica de Fc, denominado scFc. Por ejemplo, el subconjunto de cadena pesada de IgG que dimeriza naturalmente para formar Fc es bisagra-CH2-CH3. En algunas realizaciones, el dominio Fc se modifica por ingeniería genética para formar una única cadena uniendo la bisagra -CH2-CH3 con un enlazador flexible tal como GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 104) para crear una cadena bisagra-CH2-CH3-enlazador-bisagra-CH2-CH3. En una realización de ejemplo, el Fc de cadena simple (scFc) está diseñado para sustituir N397 por Q y C220 por S (N297Q, C220S). En alguna realización, el dominio scFc comprende una secuencia descrita en la SEQ ID NO: 71. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 218.

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos de PASilación. PASylation son secuencias ricas en prolina, alanina y/o serina que imitan la PEGilación (ver WO/2008,155134). Los tramos polipeptídicos de prolina, alanina y/o serina forman dominios tridimensionales semiestructurados con gran radio hidrodinámico, reduciendo así el aclaramiento de las proteínas de fusión. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de PASilación es de aproximadamente 200, 300, 400, 500 o 600 aminoácidos de longitud. Por ejemplo, la PASilación es una repetición de 20 veces de la secuencia de aminoácidos ASPAAPAPASPAAPAPSAPA (SEQ ID NO: 105).

En algunas realizaciones, el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 70 %, 80 %, 85 %, 90 % o 95 % a una secuencia de aminoácidos del anticuerpo humano de dominio de unión a albúmina (albuAb) (SEQ ID NO: 70). Los anticuerpos del dominio de unión a la albúmina pueden aumentar la semivida de la proteína de fusión uniéndose no covalentemente a la albúmina sérica (ver WO2008/096158). En algunas realizaciones, el anticuerpo humano de dominio de unión a la albúmina se modifica por ingeniería genética para eliminar la arginina C-terminal para eliminar el sitio de la proteasa Lys-Arg Kex2. En algunas realizaciones, la secuencia de ácido nucleico del modulador de la semivida comprende la secuencia descrita en la SEQ ID NO: 217.

Tales moduladores de la semivida representativos incluyen los citados en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105.

En algunas realizaciones, los moduladores de la semivida pueden modificarse para sustituir los residuos de cisteína por residuos de serina o alanina para reducir la capacidad de formar enlaces disulfuro.

El modulador de la semivida puede incorporarse o conjugarse en una proteína de fusión biespecífica sola o usando un polipéptido conector corto (por ejemplo, de 2 a 20 residuos de aminoácidos). En algunas realizaciones, el polipéptido conector está presente en el extremo N, en el extremo C o en el extremo N y el extremo C del modulador de la semivida en uno o ambos extremos. Los polipéptidos conectores cortos adecuados para usar en el extremo N-terminal del enlazador incluyen, por ejemplo, dipéptidos tales como -Gly-Ala- (GA) y -Ala-Ser- (AS). Los polipéptidos conectores cortos adecuados para usar en el extremo C-terminal del enlazador incluyen, por ejemplo, dipéptidos tales como -Leu-Gln- (LQ) y -Thr-Gly- (TG). En algunas realizaciones, los conectores son más largos que 2 aminoácidos. Por ejemplo, los conectores tienen 5, 10, 15, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 aminoácidos de longitud. Preferentemente, tales conectores son flexibles (por ejemplo ricos en glicina) o estructurados (por ejemplo, rico en hélice alfa). En algunas realizaciones, los conectores o enlazadores polipeptídicos tienen una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244. En algunas realizaciones, los conectores están basados en proteínas humanas, tales como transtiretina.

Las SEQ ID NO: 46-49 citan el modulador de la semivida de SEQ ID NO: 45 con dipéptidos conectores representativos en los extremos N y C. Será evidente, sin embargo, que dichos polipéptidos de conector corto y el conector enumerados en las SEQ ID NO: 95-104 o 182-184, si estuvieran presentes, pueden estar situados en uno o en ambos extremos del modulador de la semivida.

Ciertos moduladores de la semivida preferidos proporcionan una semivida prolongada de la proteína biespecífica de fusión, en comparación con la proteína de fusión sin modulador de la semivida. El efecto de un modulador de la

semivida sobre la semivida se puede evaluar utilizando un ensayo que determina la estabilidad en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, la proteína biespecífica de fusión se puede incubar a 37 °C en suero (por ejemplo, suero humano) durante 120 horas, con muestras retiradas al comienzo de la incubación y cada 24 horas a partir de entonces. Los ensayos de unión como se describió anteriormente se realizan a continuación para detectar el nivel de proteína de fusión biespecífica funcional en cada punto de tiempo. Este nivel luego se compara con el nivel de proteína de fusión biespecífica construida sin modulador de la semivida (o usando un modulador de la semivida diferente) para proporcionar una comparación de la semivida.

Elementos opcionales y proteínas de fusión biespecíficas representativas

- 10 Será evidente que los elementos además de los descritos anteriormente pueden incluirse opcionalmente en las proteínas de fusión biespecíficas proporcionadas en el presente documento. Dichos elementos pueden estar presentes para varios propósitos, que incluyen facilitar la expresión, preparación o purificación de la proteína biespecífica de fusión, o realizar funciones de dirección. Por ejemplo, puede estar presente un polipéptido líder N-terminal. Los polipéptidos líder representativos comprenden o tienen una secuencia indicada en cualquiera de las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244. Una proteína de fusión biespecífica también puede, o alternativamente, comprender una etiqueta de polihistidina (por ejemplo, hexahistidina) para facilitar purificación. Dicha etiqueta comprende al menos seis restos de aminoácidos consecutivos de histidina, y puede estar situada en el extremo C o N. En determinadas realizaciones, se incluye una etiqueta de hexahistidina en el extremo C de la proteína biespecífica de fusión. Residuos de aminoácidos adicionales también pueden estar presentes en la unión de la polihistidina al resto de la proteína biespecífica de fusión. Ciertas proteínas de fusión bi-específicas proporcionadas en la presente comprenden un polipéptido que comprende polihistidina C-terminal como se describe en las SEC ID N°: 43, 44 o 92-94.
- 25 Ciertas proteínas de fusión biespecíficas tienen una estructura general que satisface uno de los siguientes (que se muestran desde la terminal N al terminal C, de izquierda a derecha):

o

Polipéptido líder (opcional)	--	Dominio activador	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Modulador de la semivida	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Dominio del polipéptido de direccionamiento	--	Polipéptido que comprende polihistidina (opcional)
------------------------------	----	-------------------	----	---------------------------------------	----	--------------------------	----	---------------------------------------	----	---	----	--

o

Polipéptido líder (opcional)	--	Modulador de la semivida	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Dominio activador	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Dominio del polipéptido de direccionamiento	--	Polipéptido que comprende polihistidina (opcional)
------------------------------	----	--------------------------	----	---------------------------------------	----	-------------------	----	---------------------------------------	----	---	----	--

o

Polipéptido líder (opcional)	--	Dominio del polipéptido de direccionamiento	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Dominio activador	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Modulador de la semivida	--	Polipéptido que comprende polihistidina (opcional)
------------------------------	----	---	----	---------------------------------------	----	-------------------	----	---------------------------------------	----	--------------------------	----	--

o

Polipéptido líder (opcional)	--	Dominio activador	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Dominio del polipéptido de direccionamiento	--	Polipéptido conector corto (opcional)	--	Modulador de la semivida	--	Polipéptido que comprende polihistidina (opcional)
------------------------------	----	-------------------	----	---------------------------------------	----	---	----	---------------------------------------	----	--------------------------	----	--

Las proteínas de fusión biespecíficas representativas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):

- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
- 5 (b) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31, 72, 73, 76-83 o 85-86);
- (c) un polipéptido conector corto opcional;
- (d) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
- 10 (e) un polipéptido conector corto opcional;
- (f) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64); y
- (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).

15 Por ejemplo, ciertas proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):

- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
- 20 (b) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31, 72, 73, 76-83 u 85-86);
- (c) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
- (d) un polipéptido conector corto opcional;
- 25 (e) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64); y
- (f) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).

30 Otras proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):

- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
- 35 (b) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64); ;
- (c) un polipéptido conector corto opcional;
- (d) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
- (e) un polipéptido conector corto opcional;
- 40 (f) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31, 72, 73, 76-83 o 85-86);
- (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).

45 Aún más proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):

- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
- 50 (b) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
- (c) un polipéptido conector corto opcional;
- (d) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64);
- (e) un polipéptido conector corto opcional;
- 55 (f) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31, 72, 73, 76-83 o 85-86);
- (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).

60 Aún más proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):

- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
- 65 (b) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);

- (c) un polipéptido conector corto opcional;
 (d) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31,72, 73, 76-83 o 85-86);
 (e) un polipéptido conector corto opcional;
- 5 (f) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64);
 (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).
- 10 Aún más proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):
- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
 (b) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31,72, 73, 76-83 o 85-86);
- 15 (c) un polipéptido conector corto opcional;
 (d) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64);
 (e) un polipéptido conector corto opcional;
- 20 (f) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
 (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).
- 25 Aún más proteínas de fusión biespecíficas comprenden (desde N-terminal hasta C-terminal):
- (a) un polipéptido líder (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42, 87-91 o 244);
 (b) un dominio activador (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 3-9, 32-40 y 50-64);
- 30 (c) un polipéptido conector corto opcional;
 (d) un dominio polipeptídico de direccionamiento (por ejemplo, que comprende o que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 1, 2, 30, 31,72, 73, 76-83 o 85-86);
 (e) un polipéptido conector corto opcional;
- 35 (f) un modulador de la semivida (por ejemplo, que comprende o tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105);
 (g) un polipéptido que comprende polihistidina (por ejemplo, un polipéptido que comprende hexahistidina, tal como un polipéptido que comprende o tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94).
- 40 En algunas realizaciones, el polipéptido conector corto comprende una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 95-104 o 182-184.
- En algunas realizaciones, el polipéptido conector corto opcional es un dipéptido (Gly-Ala; Ala-Ser; Leu-Gln; Thr-Gly) o polipéptido que tiene una secuencia de aminoácidos enumerada en las SEQ ID NO: 95-104 y 182-184.
- 45 Las proteínas de fusión biespecíficas representativas incluyen, pero sin limitación, aDNASI1_mHSA_IGF1, aPS4A7_mHSA_IGF1, aDNASI1_mHSA_HGF(NK1), aPS4A7_mHSA_HGF(NK1), AnxV_mHSA_FGF2, AnxV_mHSA_NRG1b(EGF), aDNASI1_mHSA_FGF2, aDNASI1_mHSA_NRG1b(EGF), AnxV_mHSA_VEGFB(111), AnxV_mHSA_VEGFB(167), AnxV_mHSA_HGF(NK1), AnxV_mHSA_IGF1, IGF1_mHSA_AnXV, HGF(NK1)_mHSA_A_AnXV, NRG1b(EGF)_mHSA_AnXV, FGF2_mHSA_AnXV, VEGFB(167)_mHSA_AnXV, VEGFB(111)_mHSA_AnXV, IGF1_mHSA_B7scFv, IGF1_mHSA_Syt1, IGF1_mHSA_aDNASI1, NRG1b(EGF)_mHSA_B7scFv, NRG1b(EGF)_mHSA_Syt1, NRG1b(EGF)_mHSA_aDNASI1, FGF2_mHSA_B7scFv, FGF2_mHSA_Syt1, FGF2_mHSA_aDNASI1, B7scFv_mHSA_IGF1, Syt1_mHSA_IGF1, aDNASI1_mHSA_IGF1, B7scFv_mHSA_NRG1b(EGF), Syt1_mHSA_NRG1b(EGF), B7scFv_mHSA_FGF2, Syt1_mHSA_FGF2. Las proteínas de fusión biespecíficas representativas pueden tener una secuencia descrita en las SEQ ID NOs; 106, 108, 110, 112, 118, 120, 124, 126, 128, 130, 132, 134, 136, 140, 142, 144, 146, 148, 150, 152, 154, 156, 158, 160, 162, 164, 166, 168, 170, 172, 174, 176, 178, 180, o pueden estar codificadas por el ácido nucleico que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 107, 109, 111, 113, 119, 121, 125, 127, 129, 131, 133, 135, 137, 141, 143, 145, 147, 149, 151, 153, 155, 157, 159, 161, 163, 165, 167, 169, 171, 173, 175, 179, o 181.
- 60 Las proteínas de fusión biespecíficas representativas que comprenden un polipéptido de direccionamiento que no es de unión incluyen, pero sin limitación, DAscFv_mHSA_IGF1, DAscFv_mHSA_HGF(NK1), AnxVm1234_mHSA_VEGFB(111), AnxVm1234_mHSA_VEGFB(167), AnxVm1234_mHSA_HGF-NK1, AnxVm1234_mHSA_IGF1, AnxVm1234_mHSA_NRG1b(EGF), AnxVm1234_mHSA_FGF2, HGF(NK1)_mHSA_AnXVm1234, NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234, FGF2_mHSA_AnXVm1234, VEGFB(167)_mHSA_AnXVm1234, VEGFB(111)_mHSA_AnXVm1234, IGF1_mHSA_DAscFv,
- 65

NRG1b(EGF)_mHSA_DAscFv, FGF2_mHSA_DAscFv, DAscFv_mHSA_NRG1b(EGF) y DAscFv_mHSA_FGF2. Las proteínas de fusión biespecíficas representativas pueden tener una secuencia descrita en las SEQ ID NOs 114, 116, 122, 138, 185, 246, 248, 254, 258, 260, 262, 264, 272, 274, 276 o pueden estar codificadas por nucleic ácido que tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 115, 116, 123, 139, 186, 247, 249, 255, 259, 261, 263, 265, 273, 275 o 277.

Preparación de proteínas de fusión biespecíficas

Las proteínas de fusión biespecíficas pueden sintetizarse usando técnicas estándar, que incluyen síntesis de péptidos en fase líquida y sólida y técnicas de ADN recombinante. Para la síntesis en fase sólida, el aminoácido C-terminal de la secuencia se une a un soporte insoluble, y los aminoácidos restantes se agregan en secuencia. Para polipéptidos de más de aproximadamente 50 aminoácidos, se pueden sintetizar regiones más cortas de esta manera y luego condensar para formar el polipéptido más largo. Métodos para formar enlaces peptídicos mediante la activación de un terminal carboxilo terminal (por ejemplo, mediante el uso del reactivo de acoplamiento N, N'-dicitclohexilcarbodiimida) son bien conocidos en la técnica.

Para las técnicas de ADN recombinante, el ADN que codifica la proteína biespecífica de fusión se prepara químicamente o aislando y ligando el ADN que codifica cada porción de la proteína de fusión. El ADN que codifica cada segmento de la proteína biespecífica de fusión puede aislarse a partir de genes conocidos o sintetizarse *de novo*. Los métodos para la síntesis química directa de ADN son bien conocidos en la técnica y tales síntesis se realizan rutinariamente usando un sintetizador automático. La síntesis química produce un polinucleótido monocatenario, que se convierte en ADN bicatenario por hibridación con una secuencia complementaria o usando ADN polimerasa. Si bien la síntesis química del ADN generalmente se limita a secuencias que son más cortas que la proteína biespecífica de fusión, será evidente que la proteína biespecífica de fusión completa se puede obtener por ligación de secuencias más cortas en el marco. Como alternativa, las secuencias de ADN que codifican la proteína biespecífica de fusión se preparan mediante clonación. Las técnicas de clonación son bien conocidas en la técnica, y se describen ampliamente, por ejemplo, mediante referencias estándar tales como Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (3ª ed.), Cold Spring Harbor Laboratory Press (2001). Se pueden ligar partes del ADN juntas en el marco para generar la secuencia de codificación de longitud completa.

Una vez que se obtiene el ADN que codifica la proteína biespecífica de fusión, el ADN puede clonarse en un vector para su expresión en una célula huésped procariota o eucariota. Las técnicas para incorporar ADN en dichos vectores son bien conocidas por los expertos en la materia. Dentro de dicho vector de expresión, el ADN que codifica la proteína biespecífica de fusión está operativamente unido a las secuencias de nucleótidos necesarias para la expresión (mi.gramo., un promotor adecuado y, en caso necesario, una señal de terminación). Un promotor es una secuencia de nucleótidos (normalmente localizada en 5' con respecto a la secuencia codificante) que dirige la transcripción de secuencias codificantes unidas de forma adyacente. Una señal de terminación puede ser un codón de parada para la traducción final y/o una señal de terminación de la transcripción. Elementos reguladores adicionales (s) (por ejemplo, elementos potenciadores) también pueden estar presentes dentro de un vector de expresión. Tal vector es preferentemente un vector plasmídico o viral. Preferentemente, un vector de expresión comprende además un marcador seleccionable, que confiere resistencia a una selección. Esto permite a las células integrar de manera estable el vector en sus cromosomas y crecer para formar focos, que a su vez pueden clonarse y expandirse en líneas celulares. En la técnica se conocen una amplia variedad de marcadores seleccionables, incluyendo, por ejemplo, genes que proporcionan resistencia a ampicilina, metotrexato, ácido micofenólico, el aminoglucósido G-418, higromicina y puromicina. Los expertos en la técnica conocen bien los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de proteínas que incluyen *E. coli*, otros huéspedes bacterianos, levaduras y diversas células eucariotas superiores tales como las líneas celulares COS, CHO, HeLa y mieloma.

Las células hospedadoras se transforman o transfectan con el vector que comprende el ADN que codifica la proteína biespecífica de fusión usando métodos estándar. La expresión en la célula huésped da como resultado la transcripción del ADN en el ARNm correspondiente, seguido de la traducción del ARNm para generar la proteína biespecífica de fusión.

Una vez expresada, la proteína biespecífica de fusión se puede purificar de acuerdo con procedimientos estándar, incluyendo, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio o cromatografía de columna de afinidad. Se prefieren composiciones sustancialmente puras de al menos aproximadamente 90 a 95 % de homogeneidad, y 98 a 99 % o más de homogeneidad es la más preferida para usos farmacéuticos. Una vez purificado, parcialmente o hasta la homogeneidad según se desee, si se va a usar terapéuticamente, los polipéptidos deberían estar sustancialmente libres de endotoxina.

Composiciones Farmacéuticas

La presente divulgación también proporciona composiciones farmacéuticas que comprenden al menos una proteína de fusión biespecífica como se describe aquí, junto con al menos un vehículo fisiológicamente aceptable. Tales composiciones se pueden usar para tratar pacientes que están sufriendo, o en riesgo de, daño tisular, con el fin de prevenir daño tisular, o reparar o regenerar tejido dañado. Dichos pacientes incluyen, por ejemplo, pacientes que

han sufrido infarto de miocardio, daño renal y/o accidente cerebrovascular isquémico. Si se desea, también se pueden incluir otros principios activos dentro de la composición farmacéutica, tales como células madre u otros agentes que facilitan la reparación del tejido dañado.

5 Tal como se usa en el presente documento, la expresión "fisiológicamente aceptable" significa aprobado por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la farmacopea de EE.UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales y, más particularmente, en seres humanos. El término "vehículo" se refiere a un diluyente, adyuvante, excipiente o vehículo con el que se administra la proteína biespecífica de fusión. Los vehículos fisiológicamente aceptables pueden ser líquidos estériles, como el agua y los aceites, incluidos los de origen petrolífero, animal, vegetal o sintético (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite mineral o aceite de sésamo). Un vehículo preferido es agua, cuando la composición farmacéutica se administra por vía intravenosa. Como vehículos líquidos también se pueden emplear soluciones salinas y soluciones acuosas de dextrosa y glicerol, particularmente para soluciones inyectables. Los excipientes farmacéuticos adecuados incluyen, por ejemplo, almidón, glucosa, lactosa, sacarosa, gelatina, malta, arroz, harina, creta, gel de sílice, estearato de sodio, monoestearato de glicerol, talco, cloruro de sodio, leche desnatada desecada, glicerol, propileno, glicol, agua y etanol. La composición, si se desea, puede también contener cantidades minoritarias de agentes humectantes o emulsionantes o tamponadores del pH.

20 Las composiciones farmacéuticas se pueden formular para cualquier vía de administración adecuada, incluyendo, por ejemplo, administración parenteral, intranasal, tópica, oral o local, tal como por medios transdérmicos, para tratamiento profiláctico y/o terapéutico. Estas composiciones pueden tomar cualquiera de diversas formas bien conocidas que se adaptan al modo de administración, tales como soluciones, suspensiones, emulsiones, comprimidos, píldoras, cápsulas, polvos, aerosoles y formulaciones de liberación sostenida. La composición puede formularse como un supositorio, con aglutinantes y vehículos tradicionales tales como triglicéridos. La formulación oral puede incluir vehículos estándar, tales como calidades farmacéuticas de manitol, lactosa, almidón, estearato de magnesio, sacarina sódica, celulosa, carbonato de magnesio, etc. Se describen ejemplos de modos de administración y vehículos farmacéuticos adecuados en "Remington: The Science and Practice de Pharmacy", A.R. Gennaro, ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA (21ª ed., 2005).

30 Habitualmente, las composiciones farmacéuticas proporcionadas en el presente documento se administran por vía parenteral (por ejemplo, mediante inyección intravenosa, intramuscular o subcutánea), o por ingestión oral o aplicación tópica. Para administración parenteral, la proteína biespecífica de fusión puede suspenderse o disolverse en el vehículo. Generalmente se prefiere un vehículo acuoso estéril, tal como agua, agua tamponada, solución salina o solución salina tamponada con fosfato. Además, pueden emplearse aceites no volátiles estériles como disolvente o medio de suspensión. Para este fin, puede emplearse cualquier aceite suave no volátil, incluyendo monoglicéridos o diglicéridos sintéticos. Además, los ácidos grasos tales como el ácido oleico encuentran uso en la preparación de composiciones inyectables. También se pueden incluir sustancias auxiliares farmacéuticamente aceptables para imitar las condiciones fisiológicas, tales como agentes de ajuste de pH y tamponadores, agentes de ajuste de la tonicidad, agentes de dispersión, agentes de suspensión, agentes humectantes, detergentes, conservantes, anestésicos locales y agentes tampón.

45 En una realización preferida, la composición farmacéutica se formula para administración intravenosa a un paciente (por ejemplo, un ser humano). Normalmente, las composiciones para administración intravenosa son soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición puede también incluir un agente solubilizante y un anestésico local, tal como lignocaína, para aliviar el dolor en el punto de la inyección. En general, los ingredientes se suministran tanto por separado como mezclados conjuntamente en forma de dosis unitaria, por ejemplo, como un polvo liofilizado seco o concentrado exento de agua en un recipiente sellado (por ejemplo, cerrado herméticamente), tal como una ampolla o sobrecito que indica la cantidad de principio activo. Cuando la composición se va a administrar por infusión, se puede dispensar con un frasco para infusión que contiene agua estéril de calidad farmacéutica o solución salina. Cuando la composición se administra por inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril o solución salina para que los componentes se mezclen antes de la administración.

55 Las composiciones destinadas para uso oral pueden presentarse como, por ejemplo, comprimidos, trociscos, pastillas, suspensiones acuosas u oleosas, polvos o gránulos dispersables, emulsión, cápsulas duras o blandas, o jarabes o elixires. Dichas composiciones pueden comprender adicionalmente uno o más componentes tales como agentes edulcorantes, agentes aromatizantes, agentes colorantes y agentes conservantes. Los comprimidos contienen el principio activo en mezcla con excipientes fisiológicamente aceptables que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Tales excipientes incluyen, por ejemplo, diluyentes inertes, agentes de granulación y disgregación, agentes aglutinantes y agentes lubricantes. Las formulaciones para uso oral también pueden presentarse como cápsulas de gelatina dura en las que el principio activo se mezcla con un diluyente sólido inerte, o como cápsulas de gelatina blanda en las que el principio activo se mezcla con agua o un medio oleoso. Las suspensiones acuosas comprenden los materiales activos en mezcla con uno o más excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. Tales excipientes incluyen agentes de suspensión y agentes dispersantes o humectantes. Los polvos y gránulos dispersables adecuados para la preparación de una suspensión acuosa mediante la adición de agua proporcionan el principio activo mezclado con un agente dispersante o humectante, un agente suspensor y uno o más conservantes.

Se pueden formular suspensiones oleosas suspendiendo los principios activos en un aceite vegetal (por ejemplo, aceite de cacahuete, aceite de oliva, aceite de sésamo o aceite de coco) o en un aceite mineral tal como parafina líquida. Las composiciones farmacéuticas pueden también estar en forma de emulsiones de aceite en agua. La fase oleosa puede ser un aceite vegetal o un aceite mineral o una mezcla de los mismos. Los agentes emulsionantes adecuados incluyen, por ejemplo, gomas de origen natural, fosfátidos y anhídridos de origen natural.

Las composiciones farmacéuticas se pueden esterilizar mediante técnicas de esterilización convencionales, o pueden esterilizarse por filtración. Las soluciones acuosas estériles se pueden envasar para su uso tal cual o liofilizarse, combinándose la preparación liofilizada con un vehículo acuoso estéril antes de la administración. El pH de una composición farmacéutica acuosa normalmente estará entre 3 y 11, más preferentemente entre 5 y 9 o entre 6 y 8, y de la forma más preferente entre 7 y 8, tal como entre 7 y 7,5.

Las proteínas de fusión biespecíficas proporcionadas en el presente documento están generalmente presentes en una composición farmacéutica a una concentración tal que la administración de una única dosis a un paciente libera una cantidad terapéuticamente eficaz. Una cantidad terapéuticamente eficaz es una cantidad que da como resultado un beneficio perceptible para el paciente, tal como la reparación o regeneración detectable del tejido dañado o la disminución de los síntomas de daño tisular. Las cantidades terapéuticamente eficaces se pueden aproximar a partir de las cantidades suficientes para lograr la reparación o regeneración detectable del tejido en uno o más modelos animales ilustrados en la Tabla 3. Sin embargo, será evidente que diversos factores afectarán a la cantidad terapéuticamente eficaz, incluida la actividad de la proteína biespecífica de fusión empleada; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, el sexo y la dieta del paciente; el momento y la vía de administración; la tasa de excreción; cualquier tratamiento simultáneo, tal como una combinación de fármacos; y el tipo y la gravedad del daño tisular en el paciente sometido a tratamiento. Las dosificaciones óptimas pueden establecerse usando pruebas de rutina y procedimientos que son bien conocidos en la materia. Las dosis generalmente varían de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 400 mg de proteína de fusión biespecífica por dosis (por ejemplo, 0,5 mg, 1 mg, 2 mg, 5 mg, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg o 400 mg por dosis). En general, se prefieren las composiciones que proporcionan niveles de dosificación que varían de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal por día. En determinadas realizaciones, las formas de dosificación unitaria contienen entre de aproximadamente 10 mg a aproximadamente 100 mg de la proteína biespecífica de fusión.

Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse para tratar o prevenir el daño tisular (por ejemplo, para el tratamiento del infarto de miocardio o el daño renal). Las preparaciones farmacéuticas envasadas incluyen un recipiente que contiene una cantidad terapéuticamente eficaz de al menos una composición farmacéutica como se describe en el presente documento y las instrucciones (por ejemplo, etiquetado) que indican que la composición contenida se va a usar para tratar el daño tisular (tal como infarto de miocardio o daño renal) en un paciente. Las composiciones farmacéuticas pueden envasarse en múltiples unidades de monodosis, cada una con una cantidad fija de la proteína biespecífica de fusión en un envase sellado. Como alternativa, el recipiente puede contener múltiples dosis de la composición farmacéutica.

40 Métodos de tratamiento

Las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un paciente (preferentemente un mamífero, tal como una vaca, cerdo, caballo, pollo, gato, perro o, más preferentemente, un ser humano) para tratar el daño patológico del tejido en el paciente. En el contexto de la presente divulgación, el término "tratamiento" abarca tanto la administración profiláctica como la terapéutica. En aplicaciones profilácticas, una composición farmacéutica como se describe en el presente documento se administra a un paciente susceptible o que de otro modo está en riesgo, de desarrollar daño tisular patológico, con el fin de prevenir, retrasar o reducir la gravedad del daño tisular. En aplicaciones terapéuticas, el tratamiento se realiza con el fin de reducir la gravedad del daño tisular patológico o regenerar el tejido después del daño. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en combinación con otras composiciones terapéuticas.

El daño tisular patológico representativo incluye daño del tejido cardíaco (por ejemplo, daño asociado con el infarto de miocardio), daño del tejido renal y daño tisular después de un accidente cerebrovascular isquémico (por ejemplo, isquemia cerebral, también conocida como isquemia cerebral, isquemia crítica del miembro u otra isquemia). En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se puede usar para proteger al tejido del daño y/o para regenerar el tejido y/o la irrigación sanguínea después del daño en el tejido o el órgano.

En algunas realizaciones, la composición farmacéutica se puede administrar para prevenir, retrasar, reducir o tratar enfermedades autoinmunes, por ejemplo, lupus eritematoso sistémico (LES), también conocido como lupus. El LES es una enfermedad autoinmune en la que muchos tejidos o sistemas son atacados y se inflaman, por ejemplo, articulaciones, piel, hígado, riñones, células sanguíneas, corazón, pulmones, sistema nervioso, vasos sanguíneos. El sistema inmune produce autoanticuerpos, en particular contra las proteínas nucleares y el ADN. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para proteger al tejido frente al daño y regenerar el tejido después del daño. En algunas realizaciones, la composición farmacéutica puede administrarse en combinación con tratamientos inmunosupresores existentes o de otro tipo.

5 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para prevenir, retrasar, reducir o tratar la diabetes de tipo I. En la diabetes de tipo I, el propio sistema inmunitario del cuerpo destruye las células beta productoras de insulina en el páncreas. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para regenerar células beta. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con tratamientos de la diabetes de tipo I conocidos en la técnica.

10 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para prevenir, retrasar, reducir o tratar la degeneración de un tejido u órgano. Por ejemplo, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para tratar la degeneración del cerebro, la médula espinal o los nervios, tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la esclerosis múltiple o la esclerosis lateral amiotrófica (ELA), también conocida como enfermedad de Lou Gehrig. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con tratamientos existentes conocidos en la técnica.

15 En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas se pueden administrar a un sujeto que lo necesite para prevenir, retrasar, reducir o tratar enfermedades asociadas a huesos y/o cartílagos. En algunas realizaciones, las composiciones farmacéuticas pueden usarse para regenerar tejidos de hueso y/o cartílago. Las composiciones farmacéuticas pueden administrarse en combinación con tratamientos existentes conocidos en la técnica.

20 Cualquiera de diversos sistemas de administración conocidos puede usarse para administrar una proteína de fusión biespecífica, incluyendo, por ejemplo, encapsulación en liposomas, micropartículas, microcápsulas, células recombinantes capaces de expresar la proteína biespecífica de fusión, mediada por receptor, o un vector retroviral u otro vector de ácido nucleico. la proteína biespecífica de fusión se puede administrar mediante cualquier vía conveniente, por ejemplo mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, rectal y mucosa intestinal, etc.), y se pueden administrar junto con otros agentes biológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local. Además, puede ser deseable introducir la proteína biespecífica de fusión en el sistema nervioso central mediante cualquier ruta adecuada, incluyendo inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede facilitarse con un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya. La administración pulmonar también se puede emplear, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente aerosolizante.

35 En una realización específica, puede ser deseable administrar la proteína biespecífica de fusión de la divulgación localmente en el área que necesita tratamiento; esto se puede lograr mediante, por ejemplo, infusión local durante la cirugía, aplicación tópica (por ejemplo, junto con un apósito para heridas después de la cirugía), mediante inyección, mediante un catéter, mediante un supositorio o mediante un implante, siendo dicho implante de un material poroso, no poroso o gelatinoso, incluidas membranas, tales como membranas sialásticas, o fibras. En otra realización, una vesícula, tal como un liposoma, se puede usar para administrar la proteína biespecífica de fusión. En otra realización más, la proteína biespecífica de fusión se administra en un sistema de liberación controlada; por ejemplo, dicho sistema de liberación controlada puede colocarse en o cerca de la diana terapéutica (por ejemplo, un órgano del cuerpo que ha experimentado o está en riesgo de sufrir daño tisular). El uso de tales sistemas de administración es bien conocido por los expertos en la técnica.

45 En algunas realizaciones, las proteínas de fusión biespecíficas proporcionadas en el presente documento son eficaces para tratar el daño tisular patológico al menos en parte debido a su capacidad para reclutar células madre en el tejido dañado. En determinados casos, suficientes células madre pueden residir dentro del paciente (por ejemplo, células madre cardíacas residentes). En determinadas realizaciones, sin embargo, puede ser beneficioso administrar conjuntamente células madre (por ejemplo, células madre autólogas derivadas de médula ósea). Dichas células madre pueden administrarse antes o después de la proteína biespecífica de fusión o pueden administrarse simultáneamente (en la misma composición farmacéutica o en composiciones separadas).

50 En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas proporcionadas en el presente documento son eficaces para potenciar la supervivencia del tejido. En algunas realizaciones, las proteínas biespecíficas pueden administrarse y dirigirse a un tejido u órgano específico (por ejemplo, el corazón). A continuación, las proteínas biespecíficas pueden acumularse en el tejido u órgano específico (por ejemplo, corazón en oposición a otro órgano) mediante la unión del dominio de direccionamiento a la molécula diana asociada al tejido. Una vez unida a la molécula diana, la proteína biespecífica de fusión puede disociarse de la molécula diana, alejarse y volverse a asociar a una molécula diana, un receptor del factor de crecimiento o receptor de citocina de una célula diferente del tejido en una forma paracrina (por ejemplo, una célula dañada o una célula "en riesgo").

60 Tal como se ha señalado anteriormente, la dosis óptima depende de ciertos factores conocidos en la técnica, pero generalmente varía de aproximadamente 0,5 mg a aproximadamente 400 mg de proteína de fusión biespecífica por dosis (por ejemplo, 10 mg, 50 mg, 100 mg, 200 mg, 300 mg, o 400 mg por dosis). Una dosis de proteína de fusión biespecífica (dentro de una composición farmacéutica como se ha descrito anteriormente) se puede administrar terapéuticamente a un paciente una o más veces por hora, día, semana, mes o año (por ejemplo, 2, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, o 12 veces la hora, día, semana, mes o año). Más habitualmente, se administra una única dosis al día o a la

semana que comprende una cantidad de proteína de fusión biespecífica que varía de aproximadamente 0,1 mg a aproximadamente 100 mg por kilogramo de peso corporal.

5 En otras realizaciones, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica se puede administrar a un paciente en una dosificación que varía de aproximadamente 0,1 mg a la semana a aproximadamente 2.500 mg a la semana, de aproximadamente 0,1 mg a la semana a aproximadamente 10 mg a la semana, de aproximadamente 1 mg a la semana a aproximadamente 100 mg a la semana, de aproximadamente 10 mg a la semana a aproximadamente 500 mg a la semana, de aproximadamente 100 mg a la semana a aproximadamente 2.500 mg a la semana, de aproximadamente 10 mg a la semana a aproximadamente 100 mg a la semana o de aproximadamente 100 a la semana a aproximadamente 1.000 mg a la semana. Como alternativa, una
10 composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica se puede administrar a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 mg en días alternos a aproximadamente 500 mg en días alternos, de aproximadamente 1 mg en días alternos a aproximadamente 75 mg en días alternos, de aproximadamente 10 mg en días alternos a aproximadamente 50 mg en días alternos o de aproximadamente 20 mg en días alternos a aproximadamente 40 mg en días alternos. Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica se puede administrar, como alternativa, a una dosis que varía de aproximadamente 0,1 mg tres veces a la semana a aproximadamente 100 mg tres veces a la semana, de aproximadamente 1 mg tres veces a la semana a aproximadamente 75 mg tres veces a la semana, de aproximadamente 10 mg tres veces a la semana a aproximadamente 50 mg tres veces a la semana o de aproximadamente 20 mg tres veces a la semana a
20 aproximadamente 40 mg tres veces a la semana.

En realizaciones adicionales, una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica se administra a un mamífero (por ejemplo, un ser humano) de forma continua durante 1, 2, 3 o 4 horas; 1, 2, 3 o 4 veces al día; en días alternos o cada tres, cuatro, cinco o seis días; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces a la semana; bisemanalmente; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, o
25 30 veces al mes; bimensualmente; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, o 10 veces cada seis meses; 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 veces al año; o bianualmente. Será evidente que una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión biespecífica puede administrarse, pero no es necesario, a diferentes frecuencias durante un régimen terapéutico.

30 Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no como limitación. Salvo que se especifique otra cosa, todos los reactivos y disolventes son de calidad comercial estándar y se usan sin purificación adicional. Usando modificaciones rutinarias, los expertos en la materia pueden modificar los procedimientos proporcionados en los siguientes Ejemplos para fabricar y usar otras proteínas de fusión biespecíficas y composiciones farmacéuticas dentro del alcance de la presente invención.
35

Ejemplos

Ejemplo 1. Preparación de una proteína de fusión biespecífica representativa

40 Una proteína de fusión biespecífica en la que el dominio polipeptídico de direccionamiento se une al ADN y el dominio activador se prepara con NRG1s. Los dos dominios están unidos por un enlazador de seroalbúmina humana (HSA) modificada. La NRG1 se fusiona recombinantemente con el extremo amino del enlazador de HSA que incorpora un polipéptido conector corto y el scFv anti-ADN se fusiona de forma recombinante con el extremo carboxi
45 del enlazador de HSA modificado que incorpora un polipéptido conector corto adicional. El enlazador de HSA modificado contiene dos sustituciones de aminoácidos. Un resto de cisteína en la posición 34 de la HSA nativa se muta a serina para reducir la heterogeneidad potencial de la proteína debido a la oxidación en este sitio. Un residuo de asparagina en el aminoácido 503 de la HSA nativa, que puede ser sensible a la desamidación, dando como resultado una semivida farmacológica disminuida, se muta a glutamina. El enlazador de HSA modificado confiere
50 una semivida circulante extendida en la proteína biespecífica de fusión.

Ejemplo 2. Actividad *in vitro* de una proteína de fusión biespecífica

55 La actividad de ambos componentes de la proteína biespecífica de fusión representativa preparada en el Ejemplo 1 (en la que el dominio polipeptídico de direccionamiento se une al ADN y el dominio activador es NRG1) se prueban usando un ELISA diseñado para proporcionar actividad solo cuando ambos brazos de la proteína biespecífica de fusión están unidos a sus sustratos de forma simultánea. El ELISA se realiza esencialmente como se describe en Stokes et al., J. Clin. Pathol. 35(5): 566-573 (1982) y Gripenberg et al., Scand. J. Immunol. 1:151-157 (1978). Más específicamente, se añaden de 1 a 50 ng/ml de solución de la proteína biespecífica de fusión en PBS a los pocillos
60 de una placa preadsorbida con ADN (kit de ELISA con el anticuerpo anti-DS-ADN (Alpha Diagnostic International, Dist de AutogenBioclear, Reino Unido) y se incuban y se lavan de acuerdo con las instrucciones del fabricante hasta la etapa en la que se agrega el anticuerpo de detección. En esta etapa, se añaden 100 µl de solución de 1-50 ng/ml de NRG1-β1 biotinilado de cabra anti-humano (R & D Systems BAF377) (anticuerpo frente al "brazo activador") en PBS/BSA al 1 %/Tween al 0,05 % a todos los pocillos y se incuban durante 1 hora a temperatura ambiente, se lavan
65 en PBS con Tween-20 al 0,05 %. Se añaden a cada pocillo 100 µl de estreptavidina-HRP (diluciones 1:200 de la solución madre de 2 µg/ml, (R&D Systems 890803)) diluido en PBS y se incuban 30 minutos a temperatura

ambiente. Después de un lavado final en PBS con Tween-20 al 0,05 %, se añaden 100 µl de sustrato quimioluminiscente SuperSignal ELISA Pico (según las instrucciones del fabricante, Pierce, n.º cat. 34077) y se mide la luminiscencia (representativa de señal positiva) en un lector de placas Fusion Microplate (Packard) o instrumento similar.

5 La cantidad de señal detectada es significativamente mayor (al menos 100 veces mayor) en los pocillos con proteína de fusión biespecífica que en los pocillos sin ADN o controles negativos que contienen un brazo muerto (es decir, no contiene un dominio activador o un dominio polipeptídico de direccionamiento). Además, se observa que la señal varía con la cantidad de proteína de fusión biespecífica añadida a los pocillos.

10 **Ejemplo 3. Actividad *in vivo* de una proteína de fusión biespecífica**

15 La actividad *in vivo* de la proteína biespecífica de fusión representativa preparada en el ejemplo 1 se determina detectando cambios de señalización en una molécula que está regulada por el dominio activador de la proteína de fusión. Para el dominio activador en esta proteína de fusión NRG1, la actividad se evalúa mediante la detección de ErbB-3 fosforilado aumentado en células de corazones tratados con la fusión biespecífica en comparación con los corazones no tratados o tratados de forma simulada. El infarto de miocardio se genera en ratones C57BL/6 por ligadura de la arteria coronaria izquierda (LCA) después de la intubación endotraqueal, ventilación y toracotomía. La oclusión coronaria se confirma mediante inspección aguda del cambio de color de la pared del ventrículo izquierdo y la elevación del ST en el electrocardiograma antes del cierre del tórax. Los ratones operados de forma simulada se someten al mismo procedimiento quirúrgico sin ligadura de la LCA.

25 Se extraen los corazones de ratones normales o los que siguen a la inducción de infarto de miocardio, de ratones tratados tanto con proteína de fusión biespecífica como ratones de control, se fijan en paraformaldehído al 4 %, se incluyen, seccionan y se montan como se describe en Dhein, Mohr y Delmar, *Practical Methods in Cardiovascular Research*, 2005, pág. 473 (Springer, New York). Se usa el anticuerpo fosfo-ErbB3 (Cell Signaling Technology; Beverly, MA) para la detección de fosfo-ErbB3 mediante inmunofluorescencia. Se observa un aumento de 2 veces o más en los niveles de fosfo-ErbB3 en los corazones tratados frente a los no tratados y es indicativo de un activador funcional. El aumento está en el número (número por campo o porcentaje del total) de células que exhiben señal, la intensidad de la señal por célula o ambas.

30 **Ejemplo 4. Reparación de daños tisulares en ratones usando una proteína de fusión biespecífica**

35 Una composición que comprende la proteína biespecífica de fusión representativa del Ejemplo 1 se administra a un ratón después de un infarto de miocardio, inducido como se ha descrito anteriormente. La administración es a través de inyección intravenosa (por ejemplo, vena de la cola). Después de la administración, la función cardíaca se evalúa de la siguiente manera. Se anestesió a los ratones con hidrato de cloral (400 mg/kg de peso corporal, i.p.) y la arteria carótida derecha se canuló con un transductor de presión de micropunta (modelo SPR-671, Millar) para las mediciones de las presiones del ventrículo izquierdo (VI) y VI + y -dP/dt en la preparación de tórax cerrado. Las mediciones se comparan con las obtenidas de los ratones de control no tratados para confirmar que el tratamiento con la proteína biespecífica de fusión afecta a la función cardíaca. Se observa una mejora significativa en la función cardíaca evaluada mediante al menos una de estas mediciones.

45 **Ejemplo 5. Expresión y purificación de proteínas de fusión**

50 Se diseñaron proteínas de fusión que comprenden un dominio de direccionamiento, un modulador de la semivida y un dominio activador, se expresaron y se purificaron. Se ensamblaron diversas combinaciones de dominios de direccionamiento y dominios activadores con el modulador de la semivida de mHSA (SEQ ID 10) en diferentes orientaciones, con diferentes secuencias de polipéptidos conectores cortos y con diferentes secuencias líder polipeptídicas. Se diseñaron secuencias de ADN sintético para cada secuencia de aminoácidos, teniendo en cuenta el uso del codón del organismo de expresión previsto (por ejemplo, CHO o *Pichia pastoris*), el deseo de incluir o evitar sitios de reconocimiento de enzimas de restricción particulares y otros factores para la optimización de codones conocido en la técnica. Las secuencias de ADN se construyeron y/o se ensamblaron en plásmidos de expresión, los plásmidos se transformaron en un organismo de expresión y las proteínas de fusión se sobreexpresaron. A continuación, cada proteína de fusión se purificó usando una combinación de diferentes métodos, incluyendo cromatografía Cibacron Blue Sepharose, cromatografía de afinidad con Ni, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño.

60 El ADN que codifica proteínas de fusión completas o partes para incorporar en proteínas de fusión (por ejemplo, dominios de direccionamiento individuales, dominios de modulación de la semivida o dominios activadores) se adquirió a partir de fuentes comerciales (BioBasic, DNA 2.0). Las secuencias de aminoácidos se definieron explícitamente. Las restricciones, tales como el uso de codones y sitios de restricción (demandados o prohibidos) fueron transmitidos al proveedor. La secuencia de ADN final que codifica la proteína de interés se seleccionó entre el grupo teórico de secuencias de isocodificación por el proveedor de acuerdo con dichas restricciones, estrategias generales para evitar la baja expresión (tal como evitar la estructura secundaria alta a nivel de ARNm) y preferencias del proveedor. En algunos casos, el uso de codones se adaptó a CHO o *Pichia* solo. En otros casos, se aplicó una

5 tabla de uso de codones combinados que evita codones raros en la distribución de cualquiera de los organismos. En algunos casos, el proveedor suministró proteínas de fusión de longitud completa en un vector de expresión. En otros casos, se requirió subclonación en un vector de expresión de interés. Las manipulaciones de subclonación se realizaron usando métodos tradicionales que emplean enzimas de restricción de tipo II y ADN ligasa (New England Biolabs). La clonación molecular adicional para producir proteínas de fusión con combinaciones alternativas y orientaciones de los dominios de direccionamiento, activador y de modulación de la semivida se realizó utilizando estas técnicas, así como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR). Las proteínas de fusión se diseñaron con uno o más sitios de restricción de tipo II localizados en las uniones entre los dominios funcionales a nivel de ADN para la sustitución o reordenación fácil de cualquiera de los dominios funcionales. Cuando fue necesario, se añadieron sitios de restricción o regiones enlazadoras a las secuencias incorporándolos en los cebadores usados para la PCR.

15 En algunos casos, las proteínas se expresaron en *Pichia pastoris* usando el sistema de expresión PichiaPink (kit Invitrogen A11151). Los genes que codifican la proteína de interés se clonaron en el marco con la señal de secreción del factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* utilizando el plásmido pPink α -HC para permitir la expresión secretada de la proteína recombinante. En otros casos, las proteínas se purificaron usando el sistema clonal Selexis/CHO. Los genes que codifican la proteína de interés se clonaron en vectores Selexis y se transfirieron en células CHO-K1 policlonales para permitir la expresión de la proteína recombinante. El plásmido pPink α -HC contiene un origen de replicación (pUC) bacteriano y un marcador de resistencia (ampicilina) para la propagación y selección del plásmido circular en *E. coli*. También contiene el gen TRP2, utilizado para identificar la integración del vector linealizado durante la transformación en *Pichia*, y el gen ADE2, incluido para la complementación de la auxotrofia de adenina en *Pichia*. El promotor AOX1 asegura altos niveles de transcripción tras la inducción de metanol y la secuencia CYC1 aseguró la terminación transcripcional eficiente. La integración del plásmido en *Pichia* deficiente en ADE2 permitió tanto la selección basada en la viabilidad en medios deficientes en adenina como el cribado basado en el color de la colonia. Los integrantes de copia alta aparecían blancos, mientras que los integrantes de copia baja aparecían de color rosa o rojo debido a la acumulación de precursores de purina en la vacuola de *Pichia*. Las colonias blancas se seleccionaron para la producción de proteínas y, en algunos casos, se examinaron varias colonias para determinar la eficacia de la producción de proteínas a pequeña escala (mililitros) antes de la producción a gran escala (litros). El mapa y los detalles del plásmido pPink α -HC están disponibles en Invitrogen.

35 En otros casos, las proteínas se purificaron usando el sistema clonal Selexis/CHO. Un vector de expresión de ejemplo es pMP 20K (SELEXIS) y una línea celular de ejemplo es CHO-kl-S (SELEXIS). pMP20K emplea elementos genéticos de uso habitual. La expresión está dirigida por el promotor GAPD humano. Los elementos genéticos denominados Regiones de unión de matriz o elementos MAR controlan la organización dinámica de la cromatina y aíslan los genes cercanos del efecto de la cromatina circundante, aumentando así la expresión de genes dependiente del número de copias, independiente de la posición. Se ha demostrado que los elementos MAR mejoran la probabilidad de aislar un clon que exhibe el nivel de expresión deseado para la producción de una proteína recombinante y para aumentar la estabilidad de la producción. Además del plásmido de expresión, también se usaron plásmidos de resistencia a antibióticos (tales como pSV2-neo, SELEXIS) para seleccionar transformantes estables. Los plásmidos de expresión se linealizaron (por ejemplo, con PvuI) seguido de purificación QIAQUICK (QIAGEN). Se usó Lipofectamine LTX (Invitrogen) para la transfección en células CHO en OptiMem1 (Gibco). Las células transfectadas se recuperaron con medio F12Hams que contenía 10 % de FBS durante 2 días sin presión de selección, después, con presión de selección durante 4 días, a continuación, se cambió a medio exento de suero con presión de selección. Se utilizó HyClone® (Thermo Scientific) para los BBA fusionados con HSA, con suplementos de HT (GIBCO).

50 Después de la expresión, las proteínas se purificaron mediante una combinación de cromatografía Cibacron Blue Sepharose, cromatografía de afinidad con Ni, cromatografía de intercambio aniónico y cromatografía de exclusión por tamaño de acuerdo con las instrucciones del fabricante (GE Healthcare). La producción de proteína se controló mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE).

Expresión proteica en *Pichia pastoris* y posterior purificación por cromatografía.

55 Los genes que codifican la proteína de interés se clonaron en marco con la señal de secreción del factor de apareamiento α de *Saccharomyces cerevisiae* (SEQ ID 244, 245) usando el plásmido pPink α -HC (incluido en el kit Invitrogen A 11151) para permitir la expresión secretada de la proteína recombinante. Además, se añadió ADN que codifica un marcador de His6 al extremo 3' del gen para permitir la opción de purificación de la proteína recombinante mediante cromatografía de afinidad de Ni. Brevemente, los plásmidos se transformaron en la cepa 2 de *PichiaPink* químicamente competente (Invitrogen, n.º de catálogo A11154) y los cultivos se cultivaron a 30 °C en una incubadora en agitación en BMGY (medio de glicerol en complejo con tampón = 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, fosfato potásico 100 mM, pH 6,0, 1,34 % de base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio, sin aminoácidos, 0,0004 % de biotina, 1 % de glicerol) hasta una DO600 = 2-6. En este momento, las células se sedimentaron, se indujo la expresión proteica reemplazando los medios con BMMY (medio de metanol en complejo con tampón = 1 % de extracto de levadura, 2 % de peptona, fosfato potásico 100 mM, pH 6,0, 1,34 % de base de nitrógeno de levadura con sulfato de amonio, sin aminoácidos, 0,0004 % de biotina, 0,5-1 % de metanol) a 1/5 del

volumen de los cultivos originales. Los cultivos se cultivaron después a 20-30 °C en una incubadora con agitación durante 24-48 horas adicionales. Cada 12-24 horas, se añadió metanol adicional (a una concentración final de 0,5-1 % (v/v)) a los cultivos. En el momento de la cosecha, las células se sedimentaron por centrifugación, el sobrenadante se recogió, se filtró en condiciones estériles y se almacenó a 4 °C hasta la purificación (normalmente dentro de los 3 días de la cosecha).

Las siguientes proteínas de fusión se purificaron de acuerdo con los métodos descritos a continuación IGF1_mHSA_AnXV (SEQ ID 136, 137); IGF1_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID 138, 139); NRG1b(EGF)_mHSA_AnXV (SEQ ID 142, 143); NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID 254, 255); FGF2_mHSA_AnXV (SEQ ID 144, 145). Las proteínas recombinantes se purificaron por cromatografía de afinidad de Ni usando resina Sepharose 6 Fast Flow de Ni (GE Healthcare 17-5318-04; 1 ml de resina/50 ml de sobrenadante) por flujo de gravedad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Los flujos de estas purificaciones se intercambiaron a continuación con tampón en NaCl 50 mM, Tris 20 mM, pH 7,0, usando concentradores centrífugos y se cargaron en cartuchos HiTrap Blue HP de 1 ml (GE Healthcare, 17-0412-01) equilibrados en el mismo tampón. Las proteínas se purificaron de acuerdo con las instrucciones del fabricante usando Tris 20 mM, pH 7,0, NaCl 50 mM, octoato de sodio 30 mM como tampón de elución. Las fracciones eluidas de la cromatografía de afinidad de Ni y la cromatografía Blue Sepharose se combinaron y se concentraron/intercambiaron con tampón en PBS (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM), pH 7,2, usando concentradores centrífugos. A continuación, las muestras se cargaron en una columna de alta resolución HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 (GE Healthcare 17-1195-01) y las proteínas se eluyeron en PBS (fosfato de sodio 100 mM, NaCl 150 mM), pH 7,2, a un caudal de 1,3 ml/min. Las fracciones que contenían la proteína de interés, identificadas por (SDS-PAGE), se combinaron y se concentraron usando concentradores centrífugos.

La pureza final se evaluó mediante SDS-PAGE. La figura 1 muestra un SDS-PAGE de IGF1_mHSA_AnXV (136), IGF1_mHSA_AnXVm1234 (138), NRG1b(EGF)_mHSA_AnXV (142) y NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234. El carril 1 corresponde a los patrones de peso molecular de la proteína. Los carriles 2, 4, 6, corresponden a las muestras de proteínas en condiciones no reductoras. Los carriles 3, 5, 7, 9 corresponden a muestras de proteínas en condiciones reductoras (ditiotreitól 50 mM (DTT)). Como se muestra en la Figura 1, la proteína de fusión (SEC ID NO 136) corrió con el peso molecular (PM) correcto en gel de SDS-PAGE (PM esperado = 111 kDa). La pureza es > 80 %. En ausencia de DTT, había presente algunos dímeros (<10 % de la proteína total) y la proteína corrió como una doble banda. El truncamiento podría ser la causa del patrón de doble banda observado. Como se muestra en la figura 1, las siguientes proteínas IGF1_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID NO 138), NRG1b(EGF)_mHSA_AnXV (SEQ ID NO 142), NRG1b(EGF)_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID NO 254) corrieron con el peso molecular (PM) correcto en gel de SDS-PAGE (PM esperado = 111 kDa). La pureza de estas proteínas de fusión fue superior al 80 %. En ausencia de DTT, estaban presentes algunas formas dímeras de las proteínas (<10 % de la proteína total) y los dímeros se eliminaron con la adición de DTT.

Después de la purificación, la pureza de la proteína de fusión FGF2_mHSA_AnXV (SEQ ID NO 144) fue de aproximadamente el 50 %. La proteína de fusión corrió como una doble banda, una de las cuales está en el PM correcto (120 kDa) y una de las cuales tiene un PM menor. Este resultado puede sugerir que la banda de menor peso molecular es un producto de truncamiento.

La proteína de fusión recombinante AnXV_mHSA_FGF2 (SEQ ID NO 118) se purificó mediante cromatografía de afinidad de Ni usando resina Sepharose 6 Fast Flow de Ni (GE Healthcare 17-5318-04; 1 ml de resina/50 ml de sobrenadante) por flujo de gravedad de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El tampón de unión/lavado consistió en fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 25 mM y el tampón de elución consistió en fosfato de potasio 20 mM, pH 7,4, NaCl 500 mM, imidazol 450 mM. Después de la purificación, la pureza se evaluó mediante SDS-PAGE. La proteína de fusión corrió al PM correcto en el gel (120 kDa) y mostró una pureza superior al 80 %.

AnXV_mHSA_NRG1b(EGF) (SEQ ID 120, 121), AnXVm1234_mHSA_NRG1b(EGF) (SEQ ID 116, 117), AnXV_mHSA_IGF1 (SEQ ID 134, 135), AnXVm1234_mHSA_IGF1 (SEQ ID 114, 115), AnXVm1234_mHSA_FGF2 (SEQ ID 264, 265), IGF1_mHSA_B7scFv (SEQ ID 150, 151), aDNAS11_mHSA_FGF2 (SEQ ID 124, 125), aDNAS11_mHSA_NRG1b(EGF) (SEQ ID 126, 127), IGF1_mHSA_Syt1 (SEQ ID 152, 153), Syt1_mHSA_IGF1 (SEQ ID 170, 171), IGF1_mHSA_aDNAS11 (SEQ ID 154, 155), NRG1b(EGF)_mHSA_B7scFv (SEQ ID 156, 157) se purificaron de acuerdo con los métodos descritos más adelante. La resina Blue Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare 17-0948-03) se empaquetó en columnas Econo-pac (Bio-Rad 732-1010) (1,5 cm de diámetro interno; 4 ml de resina/columna) usando procedimientos estándar. La cromatografía se realizó usando una bomba peristáltica de 8 canales. Las columnas se equilibraron con tampón que contenía NaCl 50 mM, Tris 20 mM, pH 7,0 (tampón de lavado Blue Sepharose). La conductividad de los sobrenadantes de expresión de proteína se ajustó con agua desionizada para que coincidiera con la del tampón de lavado Blue Sepharose (como se determinó usando un medidor de la conductividad). Los sobrenadantes de cada cultivo de expresión de proteína se cargaron en las columnas a 4-5 ml/min. Las columnas se lavaron con 5-10 volúmenes de columna de tampón de lavado Blue Sepharose. La proteína se eluyó luego con 5-10 volúmenes de columna de tampón de elución de bajo contenido de sal (LS) (Tris 20 mM, pH 7,1, NaCl 50 mM, Na-Octanoato 45 mM). En algunos casos (proteínas que tienen SEQ IN Nos 120, 116, 134, 114, 264), esta etapa de elución se dividió en 5 fracciones de 1,5 ml (A1-5), seguidas de 7 fracciones de 4 ml (B1-7). Tras la elución con tampón de elución con bajo contenido de sal se eluyó proteína

adicional con 5 volúmenes de columna de tampón de elución rico en sal (HS) (Tris 20 mM, pH 7,1, NaCl 1 M, Na-Octanoato 45 mM). Las fracciones se analizaron para determinar el contenido de proteína mediante SDS-PAGE concentrado por ultrafiltración centrífuga (Sartorius-Stedim, VS2022) y se desalinizaron en fosfato de sodio 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 7,2 usando columnas PD-10 (GE 17-0851-01). Las fracciones que contienen la proteína de interés se combinaron. Las fracciones de la proteína de fusión AnxV_mHSA_NRG1b (EGF) (SEC ID 120) se analizaron mediante SDS-PAGE. La proteína de fusión purificada tenía aproximadamente un 50 % de pureza. El análisis de SDS-PAGE mostró una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM esperado (112 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. Las fracciones de la proteína de fusión 8 AnxVm1234_mHSA_NRG1b (EGF) (SEQ ID 116) se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis de SDS-PAGE mostró una pureza de aproximadamente 50 % y una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM correcto (112 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. Las fracciones de la proteína de fusión AnxV_mHSA_IGF1 (SEQ ID 134) se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis de SDS-PAGE mostró una pureza de aproximadamente 50 % y una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM correcto (111 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. Las fracciones de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_IGF1 (SEQ ID 114) se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis de SDS-PAGE mostró una pureza de aproximadamente 50 % y una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM correcto (111 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. Las fracciones de la proteína de fusión AnxVm1234_mHSA_FGF2 (SEQ ID 264) se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis de SDS-PAGE mostró una pureza de aproximadamente 50 % y una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM correcto (120 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. Las fracciones de la proteína de fusión IGF1_mHSA_B7scFv (SEQ ID 150) se analizaron mediante SDS-PAGE. El análisis SDS-PAGE mostró una pureza de más del 50 % y una doble banda en el gel. Una de las bandas estaba en el PM correcto (102 kDa) de la proteína de fusión de longitud completa y una de las bandas se caracterizó por un PM menor, lo que puede sugerir que era un producto de truncamiento. La proteína de fusión aDNASI1_mHSA_FGF2 (SEQ ID NO 124) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de menos del 20 % con una banda correspondiente en el PM correcto (110 kDa) de la proteína de longitud completa. La presencia de bandas de PM más bajo sugirió que la proteína puede escindirse o truncarse. La proteína de fusión aDNASI1_mHSA_NRG1b (EGF) (SEQ ID NO 126) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de menos del 50 % con una banda correspondiente en el PM correcto (110 kDa) de la proteína de longitud completa. La presencia de bandas de PM más bajo sugirió que la proteína puede escindirse o truncarse. La proteína de fusión IGF1_mHSA_Syt1 (SEQ ID NO 152) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de aproximadamente 50 % con una banda correspondiente al PM correcto (91 kDa) de la proteína de longitud completa. La presencia de bandas de PM más bajo sugirió que la proteína puede escindirse o truncarse. La proteína de fusión Syt1_mHSA_IGF1 (SEQ ID NO 170) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de menos del 50% con una banda correspondiente en el PM correcto (91 kDa) de la proteína de longitud completa. La presencia de bandas de PM más alto y más bajo sugirió la presencia de productos dimericos y productos de truncamiento. La proteína de fusión IGF1_mHSA_aDNASI1 (SEQ ID NO 154) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de aproximadamente el 50 % con una banda correspondiente en el PM correcto (102 kDa) de la proteína de longitud completa. La proteína de fusión NRG1b (EGF)_mHSA_B7scFv (SEQ ID NO 156) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de menos del 50 % con una banda correspondiente en el PM correcto (102 kDa) de la proteína de longitud completa y una banda de PM menor que puede corresponder a un producto de truncamiento.

Las proteínas de fusión AnxV_mHSA (SEC ID 252, 253) y AnxVm1234_MRSA (SEC ID 250, 251) se purificaron de acuerdo con los métodos descritos a continuación. Las proteínas se precipitaron del sobrenadante de expresión de *Pichia* mediante sulfato de amonio (añadido a una concentración final de 82 %). El precipitado se resuspendió en tampón PBS y se dializó frente a PBS durante la noche. Después de la diálisis, la proteína se cargó en una columna HiPrep 26/60 Sephacryl S-200 de alta resolución (GE Healthcare 17-1195-01) equilibrada en NaCl 50 mM, fosfato potásico 20 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó en el mismo tampón, las fracciones de la elución se analizaron mediante SDS-PAGE y las fracciones que contenían la proteína de interés se agruparon. Este eluato agrupado se cargó después (a un caudal de 1 ml/min) en una columna HiTrap Q Sepharose Fast Flow de 1 ml (GE Healthcare 17-5053-01) equilibrada en fosfato de potasio 20 mM, NaCl 50 mM, pH 7,0. La proteína se eluyó con tampón de elución (fosfato de potasio 20 mM, NaCl 500 mM, pH 7,0) en un gradiente de 20 volúmenes de columna a 1 ml/min. Las fracciones de IgM se combinaron y analizaron mediante SDS-PAGE. Las fracciones que contienen proteína de interés se combinaron. La pureza final se evaluó mediante SDS-PAGE en presencia y ausencia de reductor. La proteína de fusión AnxV_mHSA (SEQ ID NO 252) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de más del 90 % con una banda correspondiente al PM esperado (104 kDa) de la proteína de longitud completa. Había presente algunos dímeros (<10 % de la proteína total) pero se eliminaron en presencia de DTT. La proteína de fusión AnxVm1234_mHSA (SEQ ID NO 252) se analizó en SDS-PAGE y mostró una pureza de más del 90 % con una banda correspondiente al PM esperado (104 kDa) de la proteína de longitud completa. Había presente algunos dímeros (<10 % de la proteína total) pero se eliminaron en presencia de DTT.

65 Expresión proteica en el sistema de expresión Selexis/CHO y posterior purificación por cromatografía.

Se cultivó una línea celular Selexis CHO estable que expresaba la proteína de interés en medio sin suero a 37 °C, 5-8 % de CO₂ en una incubadora con agitación. Los medios utilizados para el crecimiento fueron: 1 l de medio de fusión Ex-Cell™ CD CHO (Sigma, 14365C-1000 ml), 40 ml de L-glutamina 200 mM (Invitrogen, 25030-081), 10 ml de suplemento 100X HT (Invitrogen, 11067-030). La densidad de siembra para las células fue 0,3-0,5 x 10⁶ células/ml. El cultivo se diluyó una vez que alcanzó 2-4 x 10⁶ células/ml, hasta que se alcanzó el volumen de cultivo deseado (6 l). La solución Cell Boost (1 l de ddH₂O, 35 g Cell Boost 5 (HyClone, 30865,01), 20 g de D-glucosa, ajuste de pH a 7,0 con NaOH) se añadió 3-5 días después de sembrar el cultivo final grande (cantidad de Cell Boost = 7-12 % del cultivo). El sobrenadante celular que contenía la proteína secretada de interés se recogió tan pronto como la viabilidad del cultivo disminuyó por debajo del 90 % (~1 semana después de diluir el cultivo hasta su volumen final). El sobrenadante celular se recogió por centrifugación y se filtró en condiciones estériles. El sobrenadante se almacenó a 4 °C si la purificación se fuera a llevar a cabo en un plazo de una semana, de lo contrario, el sobrenadante se almacenó a -80 °C.

Las proteínas de fusión aDNAS11(L23)_mHSA_HGF(NK1) (SEQ ID 110, 111), DAscFv_mHSA_IGF1 (SEQ ID 246, 247), DAscFv_mHSA_HGF(NK1) (SEQ ID 248, 249) se purificaron de acuerdo con los métodos descritos más adelante. El sobrenadante de la expresión de Selexis/CHO se diluyó 1:0,5 con ddH₂O y se pasó sobre una columna de Blue Sepharose de 5 ml dos veces. La proteína se eluyó en un tampón que contenía octanoato de Na 45 mM y luego se dializó frente a PBS. A continuación, la proteína se diluyó 1:1 con ddH₂O y se cargó en una columna de intercambio aniónico Q de 1 ml y se eluyó con gradiente superficial (gradiente = 10 % de B, donde A = 1:1 de PBS:agua, B = NaCl 1M en PBS, PBS= PBS estándar de Dulbecco, sin Mg/Ca). Las fracciones que contenían la proteína de interés se combinaron y se congelaron en alícuotas. La pureza final se evaluó mediante SDS-PAGE. Todas las proteínas purificadas mostraron una pureza superior al 90 % y corrieron como una sola banda en SDS-PAGE. La Figura 14 mostró una SDS_PAGE de la proteína de fusión aDNAS11 (L23) _mHSA_HGF (NK1) (SEC ID 110) con una única banda en el PM esperado de 114 kDa. La Figura 15 mostró una SDS_PAGE de la proteína de fusión DAscFv_mHSA_IGF1 (SEC ID 246) con una única banda en el PM esperado de 102 kDa. La Figura 15 mostró una SDS_PAGE de la proteína de fusión DAscFv_mHSA_HGF (NK1) (SEC ID 248) con una única banda en el PM esperado de 115 kDa.

Ejemplo 6. Unión específica de la proteína biespecífica de fusión a células dañadas

Se produjeron proteínas de fusión que comprenden un dominio de direccionamiento, un modulador de la semivida y un dominio activador, y se validó su capacidad para unirse específicamente a través de su dominio de direccionamiento a las células dañadas *in vitro*. El dominio de direccionamiento utilizado fue anexina V humana (AnxV, SEQ ID 31), que se une a la fosfatidilserina que queda expuesta en la superficie celular externa durante la apoptosis. Se demostró unión específica para diversas proteínas de fusión, incluyendo proteínas de fusión con diferentes dominios activadores y proteínas de fusión en diferentes orientaciones de fusión (por ejemplo, el dominio activador en N-terminal con el dominio de direccionamiento en C-terminal y el dominio de direccionamiento en N-terminal con el dominio activador en C-terminal). También se demostró la unión específica para la unión a células dañadas de diferentes tipos de células, incluidas las células del músculo cardíaco y las células cardíacas derivadas de células madre embrionarias (derivadas de ESC). En algunos casos, se dañó a las células con peróxido de hidrógeno (H₂O₂) para inducir el estrés oxidativo e imitar el estado dañado de las células *in vivo* después de un infarto de miocardio. Las proteínas de fusión que comprenden una variante de no unión de anexina V (AnxVm1234, SEC ID 84) no se unieron a las células dañadas, lo que demuestra que la unión de las proteínas de fusión se moduló mediante el dominio de direccionamiento de la anexina V. En general, estos datos demuestran la capacidad de las proteínas de fusión para administrar un dominio activador específicamente a las células dañadas a través de la unión específica de un dominio de direccionamiento fusionado.

La unión de las proteínas de fusión a las células se observó usando citometría de flujo. La muerte celular apoptótica fue inducida por estrés oxidativo del tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). Las células apoptóticas o muertas se identificaron mediante marcaje con yoduro de propidio (PI) o mediante marcaje con un kit de detección de apoptosis comercial basado en anexina V fluorescente. En algunos casos, las proteínas de fusión se marcaron covalentemente primero con un colorante fluorescente para su posterior detección. En estos casos, la unión específica de la proteína de fusión a las células apoptóticas se demostró observando que las células eran doblemente positivas para PI y la fluorescencia de la proteína de fusión, mientras que las células equivalentes incubadas con una variante de no unión de la proteína de fusión eran positivas para PI pero negativas para la fluorescencia de la proteína de fusión. En otros casos, las proteínas de fusión no se marcaron covalentemente primero y en su lugar se utilizó un anticuerpo secundario marcado fluorescentemente que se une al modulador de la semivida en la fusión de proteínas para detectar la proteína de fusión. En estos casos, la unión específica de la proteína de fusión a las células apoptóticas se demostró mostrando una fuerte correlación entre la cantidad de señal fluorescente del anticuerpo secundario de la proteína de fusión y la cantidad de señal fluorescente del kit de detección comercial basado en anexina V.

A. Unión específica de IGF1_mHSA_AnXV a las células cardíacas apoptóticas

Las proteínas de fusión IGF1_mHSA_AnXV (SEQ ID 136) e IGF1_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID 138) se expresaron y purificaron como se describe en el Ejemplo 5. Ambas proteínas se marcaron covalentemente con Alexa Fluor 488

(kit de marcaje de proteínas Alexa Fluor 488 a escala microelectrónica, Invitrogen, A30006) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se sembraron células HLM-1 (William C. Claycomb, Louisiana State University Health Sciences Center), una línea celular de músculo cardíaco con características de cardiomiocitos adultos, en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina/fibronectina (BD/Falcon, 353072) a 1:3 en medio completo (medio Claycomb (Sigma, 51800C), que contiene 10 % de SFB (Sigma, 12103C), L-glutamina 2 mM (Invitrogen/Gibco, 25030), 100 U/ml de penicilina + 100 ug/ml de estreptomina (Invitrogen/Gibco, 15070) y norepinefrina 0,1 mM (Sigma, A0937)) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Dos días más tarde, las células se volvieron a alimentar con 0,1 ml/pocillo de medio suplementado con H₂O₂ 400 µM (Sigma, H1009) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Después, el medio suplementado con H₂O₂ se aspiró de cada pocillo y se reemplazó con medio completo y las células se incubaron durante 20-24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, el medio de cada pocillo se transfirió a una placa con fondo en V de 96 pocillos (USA Scientific, 1896-1110) para recoger las células desprendidas. Las células se lavaron una vez con PBS (Sigma, D8537) y luego se digirieron con tripsina usando 40 µl de tripsina - EDTA al 0,025 % y se colocaron en una incubadora a 37 °C. La separación de células se controló bajo un microscopio y se añadieron 100 µl/pocillo de DMEM más 10 % de FBS para desactivar la tripsina. Las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 100 µl de tampón de unión (componente del kit de detección de apoptosis de Anexina V-FTTC, BD Biosciences, 556547). A continuación se añadió la proteína de fusión marcada con Alexa Fluor 488 y se incubó en la oscuridad sobre hielo durante 1 hora. La detección de control positivo de células apoptóticas se obtuvo usando un kit de detección de apoptosis de Anexina V-FITC (BD Biosciences, 556547). En ambos casos, se añadieron 3 µl de yoduro de propidio (PI) durante los últimos 15 minutos de incubación. Las células se analizaron en un citómetro de flujo BD FACSCanto II, usando controles apropiados sin teñir y de tinción única para la calibración.

Las células apoptóticas se marcaron de forma conjunta con Anexina V-FITC y yoduro de propidio (PI) del kit de detección de apoptosis BD Biosciences (Figuras 2 y 3). El 56 % de las células estaban en el cuadrante doble positivo, lo que indica apoptosis tardía o muerte celular. Las poblaciones positivas y negativas estaban bastante bien separadas.

IGF1_mHSA_AnXV (SEQ ID 136) y IGF1_mHSA_AnXVm1234 (SEQ ID 138) se marcaron cada una con Alexa Fluor 488, logrando un grado de marcaje (DOL) de 7,1 y 8,1 moles de colorante/proteína molar, respectivamente. Las células apoptóticas también se marcaron de forma conjunta con 80 ng (7,1 nM) de IGF1_mHSA_AnXV y PI (Figuras 4 y 5) u 80 ng (7,1 nM) de IGF1_mHSA_AnXVm1234 y PI (Figuras 6 y 7). Las células marcadas con IGF1_mHSA_AnXV mostraron un pico doble positivo bastante bien separado (53 % de las células), muy similar al control positivo del kit de detección de apoptosis, lo que indica que la proteína de fusión se unía específicamente a células apoptóticas o muertas. Por otro lado, las células marcadas con IGF1_mHSA_AnXVm1234 no mostraron un pico doblemente positivo (0 % de células), lo que indica que el brazo de direccionamiento de no unión no se unió a las células apoptóticas o muertas, tal como se ha diseñado. En conjunto, estos datos mostraron que una proteína de fusión que comprende anexina V (AnxV) como dominio de direccionamiento se puede unir específicamente a células cardíacas apoptóticas o muertas y, por lo tanto, se puede usar para administrar un agente o molécula fusionado que tenga un efecto biológico (por ejemplo, terapéutico), tal como un dominio activador, para tratar tejido cardíaco lesionado o dañado.

B. Unión específica de IGF1_mHSA_AnXV a las células cardíacas apoptóticas

Para verificar que la unión a células cardíacas apoptóticas observada en el Ejemplo 6A era específica del dominio de direccionamiento de AnxV en la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV y no un resultado de la unión del dominio IGF1 a receptores de IGF de superficie celular, el experimento se repitió con la inclusión de una etapa de preincubación de IGF1 para saturar y bloquear cualquiera/todos los receptores de superficie celular de IGF1. Los métodos utilizados fueron los mismos que en el Ejemplo 6A, excepto que la concentración de H₂O₂ se cambió a 200 µM. Además, después de la resuspensión de las células en el tampón de unión, pero antes de la adición de la proteína de fusión marcada con Alexa Fluor 488, se añadieron 800 nM de IGF1 (Calbiochem, 407240) y se incubaron durante 10 minutos para prebloquear cualquier/todos los receptores de la superficie celular de IGF1 con IGF1.

El control positivo de Anexina V-FITC más PI en las Figuras 8 y 9 mostró que aproximadamente el 40 % eran doblemente positivos, lo que indicaba una apoptosis tardía o una población de muerte celular. Las Figuras 10 y 11 demostraron la unión de IGF1_mHSA_AnXV a células apoptóticas, mientras que la fusión de control de no unión, IGF1_mHSA_AnXVm1234, no se unió (Figuras 12 y 13), como se muestra en el Ejemplo 6A. Después, para demostrar que IGF1_mHSA_AnXV no se unía apreciablemente a las células a través de su dominio IGF1, los ensayos se repitieron con la etapa de bloqueo de IGF1. Las Figuras 14 y 15 mostraron la unión de IGF1_mHSA_AnXV a células apoptóticas, incluso en presencia de, y después de la incubación con, IGF1 en exceso. Estos datos demostraron que el dominio de direccionamiento de AnxV era responsable de la unión específica de las fusiones de proteínas a las células apoptóticas.

C. Unión específica de AnxV_mHSA a células cardíacas apoptóticas derivadas de ESC

AnxV_mHSA (SEC ID 252) y AnXVm1234_mHSA (SEC ID 250) se conjugaron directamente con Alex Fluor 647

(Alexa Fluor 647 ácido carboxílico, éster de succinimidilo, Invitrogen, A-20006) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células cardíacas derivadas de células madre embrionarias (derivadas de ESC) (Peter Zandstra, Universidad de Toronto) se derivaron esencialmente como se describe en Yang et al (Nature 2008, 453:524-8). El protocolo se obtuvo de Bauwens CL, et al. Tissue Eng Part A. 2011 Apr 25., Geometric Control de Cardiomyogenic Induction in Human Pluripotent Stem Cells." La diferenciación basada en agregado de hESC se llevó a cabo utilizando un protocolo para la diferenciación dirigida sin suero en el linaje cardíaco que se ha descrito previamente. El tamaño del agregado de HESC se controló mediante agregación forzada de concentraciones de células definidas en inserciones AggreWell™ (STEMCELL Technologies) que contenían una superficie texturizada de micropocillos. Brevemente, una suspensión de células individuales de hESC con alimentación reducida se centrifugó en AggreWells a una densidad de 1.000 células/micropocillo. Las células se dejaron agregar en condiciones hipóxicas durante la noche en StemPro34 suplementado con Glutamax, ácido ascórbico, transferrina, pen/estrep como medio base, con la adición de inhibidor de ROCK y 0,5 ng/ml de BMP4. El día 1, el medio se reemplazó por medio base con 10 ng/ml de BMP4, 3 ng/ml de Activina A y 5 ng/ml de bFGF. El día 4, las células se extrajeron de los micropocillos, se lavaron con DMEM F12 suplementado con KOSR al 5 % y se transfirieron a placas de bajo agrupamiento en medio base con 10 ng/ml de VEGF y 150 ng/ml de Dkk1. El día 8, el medio se reemplazó con medio base con 10 ng/ml de VEGF, 150 ng/ml de Dkk1 y 5 ng/ml de bFGF. El día 12, el medio se reemplazó nuevamente (las mismas citocinas) y las células se transfirieron a condiciones normóxicas hasta el día 16.

Incluso sin tratamiento con H₂O₂ o doxorubicina, las células cardíacas exhiben una población apoptótica medible, basada en el marcaje con PI y el kit de detección de Annexin V-FITC (Figura 16). La adición adicional de doxorubicina no aumentó la fracción apoptótica. Sin embargo, la población de células apoptóticas fue suficiente para probar la unión de las proteínas de fusión dirigidas a la apoptosis. La población de células cardíacas se incubó con AnxV_mHSA o AnxVm1234_mHSA, mientras se incubaba conjuntamente con el kit de detección de Annexina V-FITC. La señal fluorescente de Alexa Fluor 647 en la fusión de AnxV_mHSA, y no de la fusión de AnxVm1234_mHSA, se correlacionó fuertemente con la señal de FITC del kit de detección de apoptosis (Figura 17), demostrando que AnxV_mHSA se une específicamente a células cardíacas derivadas de ESC apoptóticas.

D. Unión específica de AnxV_mHSA_NRG1b (EGF) a células cardíacas derivadas de ESC apoptóticas

La unión de la proteína de fusión AnxV_mHSA_NRG1b (SEC ID 120) a células cardíacas derivadas de ESC apoptóticas se demostró usando un esquema de detección secundario, en lugar de alterar primero la proteína de fusión con un fluoróforo unido covalentemente. La proteína de fusión se detectó utilizando un anticuerpo anti-HSA (purificación por afinidad de anticuerpos de albúmina de cabra anti-humanos, Bethyl Labs, A80-129A) que se marcó covalentemente con Alexa Fluor 647 (ácido carboxílico Alexa Fluor 647, éster de succinimidilo, Invitrogen, A-20006) siguiendo las instrucciones del fabricante. Las células cardíacas se incubaron con AnxV_mHSA_NRG1b (EGF), mientras se incubaba conjuntamente con el kit de detección de Annexina V-FITC como se describe en el Ejemplo 6C. La proteína de fusión se detectó con el anticuerpo secundario anti-HSA Alexa Fluor 647. La señal fluorescente del Alexa Fluor 647 se correlacionó fuertemente con la señal de FITC del kit de detección (Figura 18). Esto demostró que AnxV_mHSA_NRG1b (EGF) se une a las células cardíacas derivadas de ESC apoptóticas. Adicionalmente, un experimento de control que excluía la proteína de fusión ("Sin Ligando" en la Figura 18), pero aún incubado con reactivos de detección secundarios, no mostró ninguna correlación de la señal Alexa Fluor 647 con la señal FITC basada en apoptosis, demostrando que la señal fluorescente de Alexa Fluor 647 original se debió a la unión de la proteína de fusión en sí misma y no a la unión debida del anticuerpo secundario solo.

Ejemplo 7. Unión específica de las proteínas de fusión a sus dianas

El proceso de localizar agentes terapéuticos en un área del paciente relacionada con la enfermedad se puede lograr dirigiendo los epítomos moleculares que están restringidos a, o particularmente abundantes en, el área de interés. Por ejemplo, el infarto de miocardio puede exponer varias moléculas diana (por ejemplo, ADN, miosina cardíaca y fosfatidilserina) sobre el daño tisular que puede explotarse para este fin. Se produjeron varias proteínas de fusión que comprenden dominios de direccionamiento específicos para estas moléculas diana. En particular, la anexina V y la sinaptotagmina pueden usarse para dirigir la a fosfatidilserina, y el fragmento variable de cadena simple SI-1 (aDNASIScFv) puede usarse para dirigirse al ADN. Sin embargo, un experto en la técnica apreciará que la inclusión de un dominio de unión en una proteína de fusión puede dar como resultado la pérdida o el cambio de propiedades de cada dominio individual (por ejemplo, cambio en la afinidad de unión, cambio en la actividad biológica). Para determinar si la funcionalidad se puede mantener en las proteínas de fusión descritas en el presente documento, se desarrolló y aplicó una prueba de unión *in vitro* basada en ELISA. Esencialmente, el ensayo mostró que las proteínas de fusión competentes para el direccionamiento se mantuvieron en pocillos de microplaca, a pesar del lavado riguroso, debido a su interacción con moléculas diana afines que recubren las superficies de los pocillos. La presencia de proteína de fusión se cuantificó inmunoquímicamente. En ausencia de una molécula diana afín o la presencia de moléculas diana no afines, no se esperaba retención, en ausencia de reactividad cruzada del dominio de direccionamiento inesperada. La combinación de retención con la molécula diana afín y sin aclaramiento, se tomó como prueba de la especificidad de unión y la función de direccionamiento.

Las microplacas (Pierce 15041) se recubrieron con los epítomos de interés. La fosfatidilserina (PS, Avanti Polar Lipids 840032) se depositó evaporando a sequedad 50 µl/pocillo de una solución de 12,5 µg/ml en metanol. Se

depositó ADN (Sigma D3664) añadiendo 50 µl de una solución de ADN premezclada a 1:1 a 10 µg/ml y reactivo de recubrimiento de ADN (Pierce 17250) a los pocillos. La miosina se depositó incubando una solución de 10 µg/ml en PBS de Dulbecco. Todas las reacciones de recubrimiento se realizaron a temperatura ambiente durante 2 horas con 200 rpm de agitación. Tras el lavado, se añadieron 250 µl/well de tampón de bloqueo sin proteínas (Pierce 37572) y las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 3-4 horas. Después de un lavado adicional, se añadieron 100 µl de proteínas de fusión purificadas cromatográficamente a los pocillos a concentraciones que oscilaban entre 160 ng/ml - 20 µg/ml. La unión prosiguió durante dos horas a temperatura ambiente en Hepes 10 mM, NaCl 140 mM, CaCl₂ 2,5 mM, pH 7,4. Después de un lavado adicional, se añadieron 100 µl de anticuerpo de detección (anticuerpo frente a albúmina de cabra anti-humano conjugado con HRP, Bethyl Labs A80-129P) a los pocillos a diluciones de 1:5.000 o 1:50.000 en PBST y se incubaron durante 30-60 minutos. Después de un lavado adicional, se aplicaron 75 µl de sustrato de peroxidasa (Pierce TMB Ultra 34028) y, tras la observación del desarrollo significativo del color, la reacción se inactivó con 75 µl de solución de parada (KPL 50 - 85 - 05). La absorbancia de los pocillos se leyó a 450 nm en un lector de placas (Tecan M200 Pro). Todas las proteínas de fusión y combinaciones de anticuerpos se realizaron por triplicado. Todas las etapas de lavado consistieron en cuatro ciclos de dispensación y aspiración de 250 µl de PBST con etapas de cinco segundos de inmersión y agitación entre ciclos utilizando una lavadora de placas automática de 96 pocillos (Biotek, Elx405). Se incluyeron pocillos en blanco revestidos simulados (disolvente, reactivo de recubrimiento o solo tampón) y pocillos sin proteína de fusión como controles negativos.

Las proteínas de fusión se produjeron como se detalla en el Ejemplo 5. Se demostró que IGF1_mHSA_Syt1 (SEC ID 152) e IGF1_mHSA_AnXV (SEC ID 136) se unían específicamente a fosfatidilserina (Figura 19). Se demostró que aDNAS11_mHSA_FGF2 (SEC ID 124), aDNAS11_mHSA_NRG1b (EGF) (SEC ID 126) e IGF1_mHSA_aDNAS11 (SEC ID 154) se unían específicamente al ADN (Figura 20).

Se demostró que las proteínas de fusión se unían específicamente a las moléculas diana, demostrando la retención de unión funcional después de fusionar un dominio de direccionamiento a un modulador de la semivida y un dominio activador y también ejemplificando la amplitud de los dominios de direccionamiento (así como la diana) capaces de fusionarse en proteínas de fusión. Las dianas específicas, tales como fosfatidilserina, se pueden abordar con diversos dominios de unión, tales como anexina V y sinaptotagmina. Por el contrario, las clases de proteínas específicas, como los scFvs derivados de anticuerpos, de los cuales aDNAS11 es un miembro, tienen una gran diversidad de miembros que se unen de forma correspondiente a una gran variedad de moléculas o epítopos diana. La incorporación exitosa de scFv en proteínas de fusión es una indicación del potencial para la aplicación de la dirección derivada de anticuerpos en otras proteínas de fusión. También se demostró que el dominio aDNAS11 era funcional en la orientación de la fusión en N-terminal o C-terminal así como en las fusiones que contienen diversos dominios activadores. En conjunto, estos resultados establecen que las proteínas de fusión dirigidas no se pueden restringir a un epítipo diana específico, una clase específica de dominio de direccionamiento, una orientación traduccional específica o una molécula que contiene un dominio activador específico.

Ejemplo 8. Modulación de actividad celular

Se demostró la bioactividad de los dominios activadores de las proteínas de fusión purificadas *in vitro* midiendo la señalización aguas abajo en células estimuladas. La potencia de las proteínas de fusión se comparó con la de los dominios activadores no fusionados de tipo silvestre. Se produjeron diversas proteínas de fusión con diferentes dominios activadores, diferentes dominios de direccionamiento y diferentes orientaciones de fusión, y se demostró que eran bioactivas. Estos datos demuestran que pueden producirse proteínas de fusión que son bioactivas y capaces de señalizar rutas celulares tales como vías prosupervivencia o proliferativas.

Cada proteína de fusión se probó junto con una versión de control positivo, obtenida comercialmente, no fusionada de su dominio activador. Se usaron proteínas de fusión con dominios de direccionamiento activos (por ejemplo, AnxV) así como dominios de direccionamiento de control de no unión (por ejemplo, AnxVm1234 o DAscFv), demostrando que la actividad del dominio activador era independiente de la identidad y función del dominio de direccionamiento. Las células a estimular se cultivaron, se privaron de suero y luego se estimularon con las proteínas de fusión. Las proteínas se eliminaron por lavado y la actividad celular se midió mediante ELISA para fosfo-Akt (pAkt) o fosfo-Erk (pErk).

A. Estimulación de la actividad de AKT en células cancerosas usando proteínas de fusión NRG1b (EGF)

Las proteínas de fusión NRG1b (EGF)_mHSA_AnXV (SEQ ID 142) y AnXV_mHSA_NRG1b (EGF) (SEQ ID 120) se produjeron como se describe en el Ejemplo 5. Se obtuvo NRG1b (EGF) de tipo silvestre de R & D Systems (396-HB/CF). Se sembraron células DU145, una célula de tipo epitelial de carcinoma de próstata humano, en placas de 96 pocillos (BD/Falcon, 353072) a 25.000 células/pocillo en medio completo (RPMI-1640 (Invitrogen/Gibco, 11875) que contenía 10 % de FBS (Hyclone, SH30071), L-glutamina 2 mM (Invitrogen/Gibco, 25030) y 50 U/ml de penicilina + 50 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen/Gibco, 15070)) y se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, los medios se aspiraron, las células se lavaron con 0,1 ml/pocillo de PBS (sin calcio y magnesio, Sigma, D8537), las células se volvieron a alimentar con 0,1 ml/pocillo de RPMI-1640 + 0,5 % de FBS, y las células se incubaron durante 20-24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se estimularon con proteínas

de fusión diluidas o proteínas de control, añadiendo 25 µl/pocillo a los 0,1 ml/pocillo existentes, durante 10 min a 37 °C y 5 % de CO₂. La estimulación se detuvo mediante la aspiración de los medios de los pocillos y el lavado con 0,2 ml/pocillo de PBS frío. Las células se lisaron en 25 µl/pocillo de tampón de lisis M-PER completo (reactivo de extracción de proteínas de mamífero (Pierce/ThermoScientific, 78501), NaCl 150 mM, cóctel inhibidor de proteasa (Roche mini completo, 04 693 124 001) e inhibidores de fosfatasa (Roche PhosSTOP, 04 906 837 001)), preparado con antelación. Las placas se sellaron, las células se lisaron en un agitador orbital durante 30 minutos a 4 °C, y los lisados se congelaron rápidamente en hielo seco y se almacenaron a -78 °C. Se recubrieron placas blancas planas de 384 pocillos (MaxiSorp, Nunc, 460372) con anticuerpo de captura anti-Akt (clon SKB1, Millipore, 05-591), se sellaron y se almacenaron a temperatura ambiente durante la noche.

Al día siguiente, los lisados celulares se descongelaron y las placas de ELISA se lavaron y bloquearon. Los lisados descongelados se combinaron, las placas de ELISA se lavaron nuevamente, se añadieron patrones de Akt o lisados agrupados a las placas de ELISA, y las placas se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente. Se lavaron las placas de ELISA, se añadió anticuerpo de detección de Akt anti-fosfo (mAb de ratón biotinilado, Cell Signaling, 5102) y las placas se incubaron durante 1,5 horas a temperatura ambiente. Las placas se lavaron, se añadió estreptavidina-peroxidasa de rábano picante (SA-HRP, R & D Systems, 890803) y las placas se incubaron durante 30 minutos a temperatura ambiente. Las placas se lavaron nuevamente, se añadió sustrato (SuperSignal ELISA Pico Chemiluminescent, Pierce/ThermoScientific, 37069) y se leyó la luminiscencia en un lector de placas. La curva patrón de pAkt se ajustó a una línea (escala log-log).

Las actividades de NRG1b (EGF) y NRG1b (EGF) _mHSA_AnxV se muestran en la Figura 21. Tanto la NRG1b de tipo salvaje comercial (EGF) como la proteína de fusión demostraron ser bioactivas, estimulando la ruta de pAkt. Asimismo, la Figura 22 muestra las actividades del tipo silvestre y la proteína de fusión de orientación inversa, AnxV_mHSA_NRG1b(EGF). Estos resultados demuestran que la fusión de la traducción del dominio activador NRG1b (EGF) a mHSA y AnxV no anuló su bioactividad, ya que las proteínas de fusión de NRG1b (EGF) expresadas y purificadas en el Ejemplo 5 eran bioactivas.

B. Estimulación de la actividad de AKT en células cancerosas usando proteínas de fusión IGF1

Las proteínas de fusión IGF1_mHSA_AnxV (SEQ ID 136), IGF1_mHSA_AnxVm1234 (SEQ ID 138) e IGF1_mHSA_B7scFv (SEQ ID 150) se produjeron como se describe en el Ejemplo 5. Se obtuvo IGF1 de tipo salvaje de Calbiochem (407240). Las células DU145 se cultivaron y estimularon como se describe en el Ejemplo 8A. Se demostró que las tres fusiones de proteínas basadas en IGF1 son bioactivas en las células cancerosas DU145, con estimulación de pAkt similar a la de IGF1 de tipo silvestre (véanse las Figuras 23-24).

C. Estimulación de la actividad de AKT en células cardíacas usando proteínas de fusión IGF1

La proteína de fusión IGF1_mHSA_AnxV (SEC ID 136) se produjo como se describe en el Ejemplo 5. Se obtuvo IGF1 de tipo salvaje de Calbiochem (407240). Las células HL-1 (William C. Claycomb, Louisiana State University Health Sciences Center), una línea celular de músculo cardíaco con características de cardiomiocitos adultos, se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina/fibronectina (BD/Falcon, 353072) a 60.000 células/pocillo en medio completo (medio Claycomb (Sigma, 51800C) que contiene 10 % de SFB (Sigma, 12103C), L-glutamina 2 mM (Invitrogen/Gibco, 25030), 100 U/ml de penicilina + 100 ug/ml de estreptomocina (Invitrogen/Gibco, 15070), y norepinefrina 0,1 mM (Sigma, A0937)) y se incubaron durante la noche a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células se lavaron y se sometieron a un protocolo de ELISA como se describe en el Ejemplo 8A.

Se demostró que la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnxV es bioactiva en las células del corazón y su potencia es comparable a la de la IGF1 de tipo silvestre (véanse las actividades de respuesta a la dosis, Figura 25). Estos datos demuestran que se puede producir un dominio activador fusionado a un modulador de la semivida y un dominio de direccionamiento y puede retener su capacidad para estimular células de manera potente.

La proteína de fusión FGF2 estimula la actividad de ERK en las células cardíacas

Los cardiomiocitos derivados de células madre embrionarias (ESC, proporcionadas por el laboratorio de Peter Zandstra en la Universidad de Toronto) se disociaron y se sembraron en placas de 96 pocillos prerrecubiertos de gelatina a 40.000 células/pocillo en medio StemPro-34 (Invitrogen/Gibco, 10639) suplementado con 38,5X StemPro-34 suplemento nutricional (provisto con medio StemPro-34), L-glutamina 2 mM (Invitrogen/Gibco, 25030), 50 U/ml de penicilina + 50 ug/ml de estreptomocina (Invitrogen/Gibco, 15070), monoglicérol 0,4 mM (Sigma, M6145), 50 ug/ml de ácido ascórbico (Sigma, A4544), 150 ug/ml de transferrina (Sigma T8158), 10 ng/ml de VEGF (R&D Systems, 293-VE), 150 ng/ml de DKK-1 (R&D Systems, 5439-DK) y 5 ng/ml de FGF básico (FGF2, PeproTech, 100-18b) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Veinticuatro horas antes de la estimulación, el medio de crecimiento se cambió a StemPro-34 sin suplemento de nutrientes y factores de crecimiento. Las células se estimularon y lisaron como se describe en el Ejemplo 8A. Para el ELISA, se revistió una placa de ELISA negra de unión alta de 96 pocillos con anticuerpo de captura de fosfo-Erk1/Erk2 (R & D Systems, DYC1018), se selló y se almacenó durante la noche a temperatura ambiente. Al día siguiente, los lisados se sometieron al protocolo ELISA descrito en el Ejemplo 8A, excepto que en lugar de los patrones de fosfo-Erk1 y un anticuerpo de detección anti-fosfo-Akt, se usaron los

patrones de fosfo-Erk1/Erk2 (R & D Systems, DYC1018) y un anticuerpo de detección de fosfo-Erk1 /Erk2 (R & oD Systems, DYC1018) para medir los niveles de Erk1/Erk2 activados. La proteína de fusión AnxV_mHSA_FGF2 (SEQ ID 118) se comparó con FGF2 de tipo salvaje para la estimulación de células cardíacas derivadas de ESC pERK y se demostró que era bioactiva (Figura 26).

5 **Ejemplo 9. Acumulación de proteínas de fusión se acumulan con células apoptóticas y estimulación de la actividad celular**

10 La capacidad de las proteínas de fusión para unirse específicamente a las células a través de su dominio de direccionamiento y, posteriormente, estimular las vías de señalización celular a través de su dominio activador se demostró *in vitro*. El dominio de direccionamiento utilizado fue la anexina V humana (AnxV, SEQ ID 31). AnxV puede unirse a la fosfatidilserina que queda expuesta en la superficie externa de la célula durante la apoptosis. El dominio activador usado fue IGF1 (SEC ID 3), que se une al receptor de IGF1 expresado en la superficie celular. Una vez unido, el receptor de IGF1 inicia la señalización intracelular. Las proteínas de fusión se unieron primero a células cardíacas apoptóticas, que imitan el estado dañado de las células *in vivo* después del infarto de miocardio. Las células unidas a la proteína de fusión se usaron luego para estimular la señalización de IGF1 en células cardíacas sanas, imitando el efecto paracrino de las proteínas de fusión para activar la señalización en células cercanas dañadas o sanas en o cerca de la zona de infarto. Fosfo-Akt, una diana aguas abajo de la señalización de IGF1, se midió mediante ELISA. La proteína de fusión unida a células pudo estimular la señalización de Akt en las células del corazón. La IGF1 de tipo salvaje no fusionada no indujo la señalización de Akt, lo que indica que el dominio de direccionamiento de la anexina V de la proteína de fusión era crítico para que se produjera la señalización. Asimismo, la proteína de fusión AnxV_mHSA no estimuló la señalización de Akt, lo que indica que el propio dominio de direccionamiento no era suficiente para la señalización. En conjunto, estos datos muestran que las proteínas de fusión son bifuncionales, siendo capaces de dirigirse específicamente al tejido dañado y capaces de señalar las rutas celulares de forma paracrina a través de sus dominios activadores. Los resultados demuestran un papel terapéutico para que las proteínas de fusión se acumulen específicamente en el tejido dañado y no en el tejido sano, para luego modular la supervivencia o la regeneración a través de los dominios activadores.

25 En una primera etapa, se permitió que la proteína de fusión se acumulara con las células dañadas a través de la unión de anexina V-fosfatidilserina en los cardiomiocitos HL1 sometidos a apoptosis. La muerte celular apoptótica fue inducida por estrés oxidativo del tratamiento con peróxido de hidrógeno (H₂O₂). La unión de la proteína de fusión a células dañadas se llevó a cabo incubando la proteína de fusión con células apoptóticas separadas contenidas en el medio de crecimiento de las células tratadas con H₂O₂. En una segunda etapa, la bioactividad del dominio activador de la proteína de fusión unida a la célula se evaluó *in vitro* estimulando cardiomiocitos carentes de suero con la proteína de fusión unida a la célula. Después del lavado para detener la estimulación, se midió la señalización aguas abajo en células estimuladas mediante ELISA para fosfo-Akt (pAkt). Los niveles de pAkt inducidos por la proteína de fusión se compararon con los de una versión no fusionada, obtenida comercialmente, de su dominio activador, así como la de una proteína de fusión que contenía el dominio de dirección de la anexina V, pero que carecía del dominio activador.

30 La proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV (SEC ID 136) se expresó y purificó como se describe en el Ejemplo 5. Las células HL-1 (William C. Claycomb, Louisiana State University Health Sciences Center), una línea celular de músculo cardíaco con características de cardiomiocitos adultos, se sembraron en placas de 96 pocillos recubiertas con gelatina/fibronectina (BD/Falcon, 353072) a 1:2 en medio completo (medio Claycomb (Sigma, 51800C), que contiene 10 % de FBS (Sigma, 12103C), L-glutamina 2 mM (Invitrogen/Gibco, 25030), 100 U/ml de penicilina + 100 µg/ml de estreptomycin (Invitrogen/Gibco, 15070) y norepinefrina 0,1 mM (Sigma, A0937) y se incubaron a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, las células se volvieron a alimentar con 0,1 ml/pocillo de medio suplementado con H₂O₂ 400 µM (Sigma, H1009) y se incubaron durante 15 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Después, el medio suplementado con H₂O₂ se aspiró de cada pocillo y se reemplazó con medio completo y las células se incubaron durante 20-24 horas a 37 °C y 5 % de CO₂. Al día siguiente, el medio de los pocillos se transfirió a una placa con fondo en V de 96 pocillos (USA Scientific, 1896-1110) para recoger las células desprendidas. Para cada muestra, el medio de 3 pocillos se agruparon en 1 pocillo de la placa de fondo en V de 96 pocillos. Las células recogidas se incubaron después con proteínas de fusión en presencia de calcio (tampón de unión, un componente del kit de detección de apoptosis de anexina V-FITC, BD Biosciences, 556547) durante 15 minutos a 37 °C y 5 % de CO₂. Las células unidas a proteínas de fusión se sedimentaron mediante centrifugación y se lavaron una vez con PBS (Sigma, D8537), después de lo cual, las células se resuspendieron en 100 µl/pocillo de DMEM que contenía calcio (tampón de unión). Las células HL-1 que se sembraron en placas de 96 pocillos preresucubiertas con gelatina/fibronectina y privadas de suero con antelación se estimularon después con las células unidas a proteínas de fusión resusocuidas en 100 µl/pocillo durante 20 minutos. Después, las células estimuladas se lavaron y se sometieron a un protocolo ELISA como se describe en el Ejemplo 5. Las células HL-1 sanas que no se expusieron a H₂O₂ también se cosecharon mediante tripsinización usando 40 µl/pocillo de tripsina-EDTA al 0,025 % y se colocaron en una incubadora a 37 °C. La separación de células se controló bajo un microscopio y se añadieron 100 µl/pocillo de DMEM más 10 % de FBS para desactivar la tripsina. Para cada muestra, las células tripsinizadas de 3 pocillos se agruparon en 1 pocillo de la placa de fondo en V de 96 pocillos. Las células se lavaron con PBS frío y se resuspendieron en 300 µl de DMEM. Después, las células se incubaron con proteínas de fusión en presencia de calcio, se procesaron como se ha descrito anteriormente y se usaron para estimular células HL-1 que se sembraron

y se privaron de suero por adelantado. Las células estimuladas se lavaron y se sometieron a un protocolo de ELISA como se describe en el Ejemplo 8A.

Se observó un aumento en los niveles de fosfo-Akt solo en las células estimuladas por la proteína de fusión capturada apoptóticamente que contiene los dominios tanto de direccionamiento (AnxV) como activador (IGF1) como se muestra en la Figura 27. La IGF1 no fusionada de tipo salvaje no pudo estimular las células, presumiblemente porque IGF1 no se unió a las células apoptóticas y, por lo tanto, no se capturó. Tanto la proteína de fusión como la IGF1 de tipo salvaje tienen actividades comparables como se muestra en el Ejemplo 4C, por lo que el aumento en los niveles de fosfo-Akt por proteína de fusión capturada no se produjo por diferencias en sus potencias. Aunque la IGF1 no fusionada podría, en teoría, unirse al receptor de IGF1 expresado en la superficie de las células apoptóticas, parecía no haber suficiente factor de crecimiento retenido para inducir la señalización, o el factor de crecimiento se retuvo de una manera incapaz de señalización. Asimismo, la proteína de fusión AnxV_mHSA no pudo estimular las células. Si bien era capaz de unirse a células apoptóticas, como se muestra en el Ejemplo 6, la proteína de fusión AnxV_mHSA no fue capaz de señalar de una manera paracrina ya que carecía del dominio activador. No se detectaron aumentos en los niveles de fosfo-Akt en células estimuladas por ninguna de las proteínas que se premezclaron con células no tratadas, presumiblemente porque las células sanas no tienen fosfatidilserina expuesta en la superficie celular para la captura de las proteínas de fusión. Asimismo, a pesar de ser capaz de unirse a los receptores de IGF1 en la superficie celular de las células sanas, la captura del factor de crecimiento no fue suficiente para estimular las células. En conjunto, los datos demuestran las funciones de direccionamiento y activación simultáneas de la proteína de fusión.

Ejemplo 10. Direccionamiento *in vivo* de la proteína de fusión al tejido cardíaco dañado

Los inventores analizaron la hipótesis de que la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV (SEC ID: 136), que se une específicamente a través del dominio de direccionamiento AnxV a fosfatidilserina en células apoptóticas y necróticas (Ejemplo 6), se acumularía más y durante más tiempo en el tejido cardíaco dañado después de un infarto de miocardio que IGF1_mHSA_AnXVm1234 (SEC ID: 138) (una variante que no se une a la fosfatidilserina). Se indujo un infarto de miocardio (IM) experimental en ratones, se inyectó un artículo de prueba por vía intravenosa (IGF1_mHSA_AnXV, IGF1_mHSA_AnXVm1234 o control de solo de vehículo), se sacrificó a los animales 12, 24 o 72 horas más tarde, y la acumulación de proteína en la zona límite infartada y áreas remotas (no dañadas) del corazón se observó mediante ELISA e inmunohistoquímica. La inmunohistoquímica demostró que IGF1_mHSA_AnXV a las 24 horas de la administración se localiza en la zona límite en el borde del infarto, mientras que ninguna de las variantes de no unión se observa en la zona límite del infarto o la región remota (sana). Los datos de ELISA demostraron que la proteína diana, IGF1_mHSA_AnXV, IGF1_mHSA_AnXV, se acumula en mayor medida y durante más tiempo en las zonas infartada y límite del corazón que la proteína variante no de unión IGF1_mHSA_AnXVm1234. Estos datos demuestran la capacidad de IGF1_mHSA_AnXV, una proteína de fusión dirigida prototípica, para acumularse específicamente y persistir en el tejido cardíaco dañado después del infarto de miocardio, lo que permite la administración específica de dominios activadores fusionados.

El infarto de miocardio (MI) experimental se indujo en ratones por ligadura de la arteria coronaria izquierda como se explica a continuación en detalle. Después de 60 minutos, se retiró la ligadura, permitiendo la reperusión del corazón. La dosificación de los artículos de prueba o el control de vehículo se realizó a las 22 horas del IM mediante inyección en la vena de la cola. Se administró a 15 ratones por grupo lo siguiente:

- Grupo 1: control solo con vehículo
- Grupo 2: 15 µg de IGF1_mHSA_AnXV
- Grupo 3: 15 µg de IGF1_mHSA_AnXVm1234

Para cada grupo, se sacrificó a 5 ratones en cada uno de los siguientes tiempos: 12, 24 y 72 horas después de la dosificación. Para cada grupo/punto de tiempo, se prepararon 3 animales para inmunohistoquímica y 2 para ELISA, con el objetivo de identificar la señal anti-HSA específica para IGF1_mHSA_AnXV o IGF1_mHSA_AnXVm1234 en o cerca del área infartada del corazón. A continuación se indican los protocolos detallados.

El trabajo con animales fue realizado por Biotrofix, Inc., en un espacio de laboratorio alquilado en ViviSource Inc., Waltham MA. El protocolo fue revisado y aprobado por ViviSource IACUC, y se abordaron y documentaron todos los problemas de bienestar animal. Se solicitaron noventa (90) ratones C57/B6 de 12 semanas de edad machos de 7 a 10 días antes del estudio (incluidos 15 para estudios piloto, Charles River Laboratories). Se les permitió libre acceso a comida y agua. A los animales se les asignaron números de identificación usando un marcador permanente en la cola. Los animales se observaron el día anterior al estudio y se excluyó a aquellos que parecían tener mala salud. Los animales se alojaron en habitaciones provistas de aire filtrado a 21 ± 2 °C y $50 \% \pm 20 \%$ de humedad relativa. La habitación tenía un temporizador automático para un ciclo de luz/oscuridad de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se usó Shepherd's® 1/4 "mazorca de maíz premium para el lecho y Bio-Huts™ para ratones (BioServ K3352) o un ratón Runnel™ (BioServ K3322, K3323) se puso en cada jaula. Los animales se alimentaron con pienso Lab Diet® 5001. Se proporcionó agua *ad libitum*. Los animales se alojaron de 4 a 6 por jaula.

El día de la cirugía, se pesó el ratón y se indujo anestesia en una cámara de plexiglás con isoflurano en 100 % de O₂. Se colocó el ratón en la superficie de la cirugía sobre una almohadilla térmica autorregulable. El ratón se aseguró en su lugar en el dorso (con el lado ventral hacia arriba), se intubó endotraquealmente con un intracath de tamaño apropiado (22G) y se mantuvo con anestesia de isoflurano a 1,0-2,5 % en 100 % de O₂. Se confirmó un nivel quirúrgico de anestesia mediante pérdida del reflejo palpebral junto con la falta de respuesta al pinzamiento del dedo del pie, el talón y la cola.

El tórax (desde el aspecto más bajo del dorso hasta el lado derecho del esternón) se rasuró, se eliminó el pelaje con vacío y se preparó la piel con sepiisol. Se realizó una incisión en la piel sobre el tórax izquierdo desde el esternón hasta la región media del tórax paralela a las costillas. Los músculos intercostales entre las costillas 5 y 6 se abrieron sobre el lado izquierdo del corazón y las costillas se retrajeron. Se identificó el corazón (ventrículo izquierdo y aurícula izquierda) y se abrió el pericardio. El pulmón izquierdo se comprimió suavemente en la parte inferior para eliminarlo del campo. Se colocó una sutura de seda 7-0 alrededor de la arteria coronaria izquierda y se ligó sobre un trozo de PE-10 de polietileno estéril de ~2 mm, y se observó palidez en el corazón (blanqueado, como evidencia de isquemia) posterior a la ligadura. Los extremos residuales de la sutura se cortaron y la ligadura se eliminó cortando a través del tubo de PE y la sutura de seda después de 60 minutos de tiempo de isquemia. La herida se mantuvo húmeda cubriendo la abertura con una esponja de gasa humedecida con solución salina estéril. Una vez que se retiró la sutura, se observó el corazón para una reperfusión adecuada del área isquémica. El pulmón izquierdo se volvió a inflar usando PEEP (presión espiratoria final positiva), y las costillas opuestas se cerraron con sutura de monofilamento de nylon 6-0 no reabsorbible. Las capas musculares se cerraron con sutura absorbible 6-0, seguido del cierre de la piel con sutura de seda 6-0 de manera continua.

Se inyectó buprenorfina (lote Bedford LabsTM: 18655303) para analgesia (0,05 mg/kg, por vía subcutánea), se cortó el isoflurano y se extubó el ratón una vez que se produjo la respiración espontánea y se colocó en una jaula limpia con calor suplementario para la recuperación. Después de la cirugía, los animales permanecieron en una almohadilla térmica hasta que se recuperaron de la anestesia. Luego fueron devueltos a jaulas limpias. Se observaron con frecuencia el día de la cirugía (día 0) y al menos una vez al día a partir de entonces. Los animales se pesaron antes de la cirugía en el Día -1 y en el Día 0 (día de la cirugía) y luego diariamente hasta el sacrificio.

Alícuotas de 10 µl de los artículos de prueba a las concentraciones apropiadas (IGF1 Grupos 1-3 definidos anteriormente; vehículo, IGF1_mHSA_AnxB o IGF1_mHSA_AnxBm1234 en PBS libre de endotoxina) se almacenaron a -80 °C hasta el día de uso. El PBS libre de endotoxinas se almacenó a 4 °C. Cada alícuota del artículo de prueba se descongeló justo antes de la inyección. Se añadieron 200 µl de PBS sin endotoxina (temperatura ambiente) a los artículos de prueba y se mezclaron pipeteando arriba y abajo varias veces y luego, usando una jeringa sin espacio de cabeza, se inyectaron 200 µl en ratones a través de la vena de la cola, a 22 (+/- 1) horas después del MI.

En puntos de tiempo designados (12, 24 o 72 horas después de la dosificación), se sacrificó a los ratones de la siguiente manera: Se anestesió a los animales con anestesia profunda con ketamina/xilazina. Para 3 animales por grupo de tratamiento, se abrió el tórax y se pinchó el corazón en el ápice. Se inyectaron aproximadamente 0,1 ml de KCl al 15 % en el ventrículo izquierdo, y el animal se fijó por perfusión mediante solución salina normal seguido de formalina de cinc. Se extrajo el corazón, se almacenó en formalina de cinc durante 24-48 horas, luego se transfirió a alcohol etílico al 70 % y se almacenó a 4 °C. A continuación, las muestras se enviaron a Mass Histology Services para mediciones de inmunohistoquímica.

Para 2 animales por grupo de tratamiento, se perfundió a los animales con solución salina normal. El corazón se aisló y el ventrículo izquierdo se lavó con solución salina. El corazón se redujo a solo los ventrículos izquierdo y derecho y se diseccionó en cuatro piezas como se muestra en la figura 6.1. Las piezas se recogieron, se pesaron, se congelaron rápidamente (en nitrógeno líquido), después se almacenaron en tubos de microcentrífuga etiquetados (una muestra por tubo, de ahí 4 muestras por corazón) a -80 °C y se enviaron a Silver Creek Pharmaceuticals en hielo seco.

Para obtener tejido cardíaco para inmunohistoquímica y experimentos de control de ELISA, se sacrificaron varios ratones adicionales como se indicó anteriormente sin cirugía, los corazones se extirparon y aclararon como se indicó anteriormente, y en algunos, se inyectaron 2 µg de proteína de fusión IGF1_mHSA_AnxB en 15 µl directamente en la pared del ventrículo izquierdo. Los corazones con o sin proteína inyectada se fijaron como se ha descrito anteriormente en preparación para inmunohistoquímica.

Detección inmunohistoquímica de proteínas de fusión

La inmunohistoquímica se realizó en Mass Histology Service Inc., Worcester, MA, un laboratorio de histopatología que cumplía con las GLP. Se utilizaron sus protocolos estándar para el procesamiento y la tinción de tejidos fijos para la detección de proteínas específicas. Brevemente, los corazones fijados en cinc-formalina se diseccionaron hasta el ventrículo y se procesaron rutinariamente a través de una serie estándar de alcoholes y xileno. Cada corazón se incluyó en parafina, y las secciones se realizaron en un micrótomo Leica a aproximadamente 6 micras de espesor cada una y se colocaron en portaobjetos de microscopio. Para cada corazón, se realizaron 8 secciones

transversales en serie y se colocaron en portaobjetos, se omitieron 100 μm , se hicieron otras 8 secciones, se omitieron 100 μm y esto se repitió a lo largo del corazón.

5 Se tiñeron dos portaobjetos de cada conjunto de 8, o uno con H & E para revelar la morfología y el otro teñido con anti-HSA para la localización de HSA, con contraste de DAPI para mostrar los núcleos de las células. Se usó un proceso tradicional para tinción de H & E. Específicamente, el tejido se desparafinizó en xileno, se eliminó en alcohol, se hidrató en agua y se tiñó en hematoxilina de Harris. El portaobjetos se lavó, se tiñó en eosina acuosa al 1 %, se deshidrató en una serie de alcoholes, se eliminó en una serie de xilenos y se cubrió con cubreobjetos. Los portaobjetos que representan secciones en varios niveles del corazón fueron vistas con el microscopio óptico para localizar secciones que contienen regiones infartadas.

15 Para la localización de HSA en el tejido cardíaco, las secciones adyacentes a las teñidas para H y E se lavaron en xileno, se aclararon en alcohol, se hidrataron en agua, se incubaron durante la noche a 4°C con anticuerpo primario de albúmina de cabra humana diluido a 1:200 y se aclararon en PBS. A continuación se usó IgG anti-cabra de burro Alexa Fluor 594, el anticuerpo marcado fluorescentemente contra el anticuerpo anti-HSA de cabra a una dilución de 1: 400 durante 1 hora a 37°C como anticuerpo secundario para detectar la localización anti-HSA. Los portaobjetos se aclararon en PBS y se cubrieron con un cubreobjetos usando el reactivo experimental que también incluye una tinción DAPI para visualización nuclear.

20 Para los controles positivos, los portaobjetos de los corazones directamente inyectados con IGF1_mHSA_AnXV se procesaron usando el protocolo anti-HSA también. Además, Mass Histology Services tiñeron una muestra de tejido hepático humano, que contiene HSA nativa, como un control positivo para el anticuerpo de detección primario. Los controles negativos incluyeron corazón de ratón inyectado directamente que se procesó para la localización de HSA, dejando de lado el anticuerpo primario anti-HSA, y un corazón sin tratamiento previo (sin exposición a la proteína de fusión) normalmente procesado para la localización de HSA.

Detección mediante ELISA de proteínas de fusión

30 Las cuatro muestras por corazón (Figura 28) se prepararon para ELISA de la siguiente manera. Las muestras se transfirieron a tubos de microcentrífuga de bloqueo seguro Eppendorf y se descongelaron en hielo. A cada tubo, se añadió tampón RIPA que incluía el cóctel Inhibidor de proteasa Pierce Halt (diluido 100 veces en tampón) en una relación 1:5 de (mg de muestra de tejido):(ul de tampón). Se usaron al menos 100 μl de tampón para cada muestra. También se añadió una mezcla 50/50 de perlas ZROB05 y ZROB10 en una relación 1:2 de perlas: tampón. Los tubos se colocaron en un homogeneizador de tejidos Bullet Blender ajustado a velocidad 9 y se homogeneizaron durante 3 minutos; esto se repitió si la homogeneización no era completa. Las muestras se centrifugaron y se tomaron alícuotas para realizar el ensayo de proteína BCA (ácido bicinonínico) para determinar la proteína total en cada muestra.

40 Las mediciones del ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA) se realizaron usando métodos estándar. Específicamente, el día 1, las placas Reacti-Bind se recubrieron durante la noche, a 4°C con 50 μl /pocillo de anticuerpo de recubrimiento anti-HSA diluido a 1:50 en PBS de Dulbecco. El día 2, los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,05 %) usando un lavador de placas (programa 6). La unión no específica se bloqueó con 200 μl /pocillo de tampón de bloqueo libre de proteínas durante 2 horas a temperatura ambiente y los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-T (PBS, Tween 20 al 0,05 %) usando un lavador de placas. Se añadieron 50 μl /pocillo (placa de 96 pocillos) de muestras de curva estándar o muestras de prueba a los pocillos. Las muestras de prueba se diluyeron en tampón RIPA (+ inhibidores de proteasa) hasta una concentración de proteína total final de 8,745 mg/ml. Las placas se sellaron y se incubaron durante la noche a 4 °C. El día 3, los pocillos se lavaron 4X con PBS-T usando un lavador de placas y se añadieron 100 μl /pocillo anticuerpo de detección anti-HSA-HRP de cabra diluido 1: 25.000 en PBS-T por pocillo y se incubaron 30 minutos a temperatura ambiente en un plataforma agitadora a 220 rpm, protegidos de la luz. Los pocillos se lavaron 4 veces con PBS-T usando un lavador de placas. Se añadieron 100 μl por pocillo de reactivo ELISA Ultra TMB de 1 etapa a temperatura ambiente y las placas se incubaron a temperatura ambiente protegidas de la luz durante 25 minutos. La reacción se detuvo con la adición de 100 μl de reactivo de parada KLP TMB. El color cambia de azul a amarillo. Después de 5 minutos, se realizaron lecturas de absorbancia en un lector de placas a una longitud de onda de A450. Los valores de fondo para la absorbancia del tejido sin exposición a la proteína de fusión se obtuvieron a partir de muestras de corazón sin tratamiento previo producidas usando los mismos procedimientos que anteriormente. El valor de fondo se restó de todos los valores de absorbancia de la muestra de prueba para obtener la diferencia. Se generó una curva patrón para la relación concentración-absorbancia a partir de muestras enriquecidas con un intervalo de cantidades conocidas de la proteína de fusión. Luego se determinó la concentración de proteína en cada muestra de prueba por comparación con la curva patrón de concentración-absorbancia. Se midieron dos alícuotas de cada muestra de prueba cardíaca para evaluar la variabilidad de la medición y estas son la base de las desviaciones estándar incluidas en los datos de ELISA (Figura 29).

65 Las proteínas de fusión utilizadas incluyen IGF1_mHSA_AnXV (proteína diana) e IGF1_mHSA_AnXVm1234 (variante de no unión), producidas como se describe en el Ejemplo 5. El control de vehículo fue PBS libre de endotoxinas (Sigma). Los animales fueron ratones C57/B6 macho de 12 semanas de edad, cuando se solicitaron, se aclimataron

7-10 días antes de la cirugía. Tinciones y anticuerpos utilizados en inmunohistoquímica: el anticuerpo primario fue anticuerpo adsorbido cruzado de albúmina humana antihumana (HSA), purificado por afinidad (Bethyl Labs 080-229A lote 3); el anticuerpo secundario marcado con fluorescencia fue IgG anti-cabra de burro Alexa Fluor 594 (H+L) (Invitrogen, A11058); Reactivo ProLong Gold con DAPI (Invitrogen, P36931). Los reactivos usados para ELISA incluyeron tampón de lisis y extracción RIPA (Pierce, 89901); cóctel inhibidor de la proteasa Pierce Halt, libre de EDTA (Pierce, 78425); kit de ensayo Pierce BCA, 23227; placas Reacti-Bind (Pierce, 15041); PBS de Dulbecco (Thermo, 28374); tampón de bloqueo sin proteínas (Pierce, 37572); anticuerpo de recubrimiento anti-HSA (Bethyl labs anticuerpo A80-229A); anticuerpo de detección de cabra anti-HSA-HRP (Bethyl Labs, A80-229P); reactivo de 1 etapa Ultra TMB ELISA (Thermo (Pierce), 34028); reactivo de detención KLP TMB (KLP, 50-85-05); tampón de bloqueo sin proteínas (Pierce, 37572); perlas de homogeneización de tejidos (Next Advance, ZROB05 and ZROB10). Los materiales usados en cirugía animal incluyeron Buprenorfina (lote de Bedford LabsTM: 18655303), isoflurano, quetamina, xilazina, formalina de cinc y 15 % de KCl.

La detección de proteínas de fusión variante dirigidas y de no unión mediante ELISA se resume en la Figura 29. La proteína medida en la zona del borde del infarto + se comparó con la proteína en la región del corazón no infartada en dos ratones para cada uno de los objetivos (Grupo 2) y proteínas de fusión variantes de no unión (Grupo 3) tres veces después de la dosificación (12, 24 y 72 horas). Para cada corazón, se añadieron las proteínas medidas en las muestras A y B1-remoto (como se define en la Figura 6-1), y representan la proteína en las regiones no infartadas del corazón. Asimismo, se añadieron las proteínas medidas en las muestras B1 de infarto y B2, y representan la proteína en la región infartada más la región periférica circundante del corazón.

Como se muestra en la figura 29, IGF1_mHSA_AnXV, la proteína de fusión dirigida (Grupo 2, barras negras), estaba altamente elevada en la región del infarto a las 12 y 24 horas después de la inyección, en comparación con su nivel en las regiones remotas del corazón (Grupo 2, barras grises) en los mismos animales. Es indetectable en las regiones infartadas y no infartadas en 72 horas. En comparación, la proteína variante de no unión IGF1_mHSA_AnXVm1234 (Grupo 3, barras negras) estaba algo elevada a las 12 horas, disminuyendo en 24 horas e indetectable a las 72 horas. Comparando la proteína diana con la de no unión, tanto a las 12 como a las 24 horas, IGF1_mHSA_AnXV diana estaba más elevado en la zona límite del infarto + (barras negras, Grupo 2) que IGF1_mHSA_AnXVm1234 de no unión (barras negras, Grupo 3). Estos resultados demuestran que la proteína de fusión IGF1_mHSA_AnXV, que está dirigida a los cardiomiocitos dañados (uniéndose activamente a la fosfatidilserina asociada con cardiomiocitos apoptóticos o necróticos), puede entrar y retenerse en las áreas del corazón dañadas por el MI experimental en concentraciones más altas y para tiempos más largos que la variante de no unión. Además, los datos mostraron la localización específica de la proteína de fusión dirigida a las áreas dañadas del corazón, lo que demuestra la eficacia de la orientación a través del dominio de orientación AnxV.

La localización de proteínas de fusión que contienen HSA por inmunohistoquímica también demostró una mayor acumulación de IGF1_mHSA_AnXV en la región del infarto y el límite en comparación con la variante de no unión IGF1_mHSA_AnXVm1234 a las 24 horas después de la dosificación. La Figura 30 muestra la morfología del infarto y el tejido circundante, así como la tinción positiva específica para IGF1_mHSA_AnXV en el borde del infarto y la región del borde alrededor del infarto. Arriba a la izquierda: tinción de H & E que muestra la morfología. La región infartada es central, con el borde demarcado por la curva negra, y viable está en la esquina superior izquierda e inferior derecha. (aumento 200x magnification) Arriba a la derecha: una sección en serie de esta región teñida para las proteínas que contienen HSA con el mismo aumento. Rojo indica localización HSA; el azul indica tinción con DAPI de los núcleos celulares. Las imágenes de mayor aumento de la misma región se muestran en la esquina inferior izquierda (400x) y en la inferior derecha (600x). Hay una señal positiva en los cardiomiocitos (flechas delgadas) en el borde del tejido infartado (flechas de grosor medio). Los recuadros blancos en la parte superior izquierda y derecha se encuentran aproximadamente en el mismo lugar en dos diapositivas adyacentes de 6 um, y las imágenes inferiores izquierda y derecha son ampliaciones cerca del área de esas cajas.

En comparación, la Figura 31 muestra la misma información para el mutante de no unión IGF1_mHSA_AnXVm1234 que muestra una tinción mínima específica para el mismo. Arriba a la izquierda: tinción de H & E que muestra la morfología. La región infartada se encuentra en la parte central superior de la imagen, con el borde demarcado por la curva negra (aumento de 200x). Arriba a la derecha: una sección adyacente de esta región teñida para proteínas que contienen HSA con el mismo aumento. Rojo indica localización anti-HSA; el azul indica tinción con DAPI de los núcleos celulares. Las imágenes de mayor aumento de la misma región se muestran en la esquina inferior izquierda (400x) y en la inferior derecha (600x). Solo hay señal de fondo en los cardiomiocitos (flecha fina) y los glóbulos rojos (flecha gruesa) en el borde del tejido infartado (flechas de grosor medio). Los recuadros blancos en la parte superior izquierda y derecha se encuentran aproximadamente en el mismo lugar en dos diapositivas adyacentes de 6 um, y las imágenes inferiores izquierda y derecha son ampliaciones cerca del área de esas cajas.

La Figura 32 ilustra los controles usados para confirmar la especificidad del anticuerpo anti-HSA para las proteínas de fusión que contienen HSA. Arriba a la izquierda: control positivo en un corazón de ratón en el que IF1_mHSA_AnXV se ha inyectado directamente como se describe. El rojo oscuro indica una fuerte localización de la proteína de fusión que contiene HSA donde se inyectó. Arriba a la derecha: Acontrol negativo en corazón de ratón. La misma preparación que en la parte superior izquierda, incluida la inyección de IGF1_mHSA_AnXV, pero la tinción se realizó sin el anticuerpo primario anti-HSA. No se observa tinción específica. Abajo a la izquierda: segundo control

negativo en el corazón de ratón. No se inyectó proteína en el corazón, y se procesó como en la parte superior izquierda. Solo se puede ver una leve tinción de fondo rojo. Abajo a la derecha: control positivo en hígado humano. El hígado humano produce cantidades significativas de HSA. La tinción con el anticuerpo anti-HSA muestra tinción específica en toda la muestra. EN todas las imágenes: la tinción azul es una tinción DAPI que indica núcleos celulares.

5

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión biespecífica que comprende:

- 5 (a) un dominio de direccionamiento que tiene una especificidad de unión a una molécula diana asociada a una célula dañada de un tejido, en donde la molécula diana es fosfatidilserina y en donde el dominio de direccionamiento se selecciona del grupo que consiste en anexina V, sinaptotagmina I, lactadherina, mucina 1 de inmunoglobulina de células T, mucina 4 de inmunoglobulina de células T y anticuerpo anti-fosfatidilserina; y
- 10 (b) un dominio activador que tiene una especificidad de unión a un receptor del factor de crecimiento asociado a una superficie de una célula en el tejido, en donde el dominio activador se selecciona entre el grupo que consiste en neuregulina-1, factor de crecimiento similar a la insulina, factor de crecimiento de hepatocitos y una porción o un derivado del mismo,

15 en donde al exponer el dominio activador al receptor del factor de crecimiento, el dominio activador se une al receptor del factor de crecimiento para estimular la supervivencia del tejido o la diferenciación de las células madre.

2. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 1, que comprende además un modulador de la semivida peptídica, en donde el modulador de la semivida modula la semivida de la proteína biespecífica de fusión.

20 3. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 2, en la que el modulador de la semivida es una proteína no inmunogénica.

4. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 3, en la que el modulador de la semivida comprende una secuencia de una de seroalbúmina humana, alfa-fetoproteína, proteína de unión a vitamina D, transtiretina, dominio Fc de anticuerpo, cadena sencilla del dominio Fc del anticuerpo, secuencias ricas en prolina, alanina y/o serina, anticuerpo de dominio de unión a albúmina, variantes de los mismos, fragmentos de los mismos y combinaciones de los mismos.

25

5. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 4, en la que el modulador de la semivida tiene una secuencia de aminoácidos descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 10, 12, 14-29, 45-49, 65-71 o 105.

30

6. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 4, en la que el modulador de la semivida comprende al menos 100 aminoácidos consecutivos que son idénticos al menos en un 80 % a una secuencia de aminoácidos de la seroalbúmina.

35

7. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 2, en la que el dominio de direccionamiento está en el extremo amino del dominio activador o en la que el dominio de direccionamiento está en el extremo carboxi del dominio activador.

40 8. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 2, en la que el dominio de direccionamiento:

- (a) no tiene una actividad biológica;
- (b) se une a la molécula diana con una constante de disociación Kd que varía desde 10^{-6} M a 10^{-12} M; o
- 45 (c) es anexina V y tiene una secuencia descrita en una cualquiera de las SEQ ID NO: 31, 81, 82 o 83; o es sinaptotagmina I y tiene una secuencia descrita en la SEQ ID NO: 72; o es lactadherina y tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 85 u 86; o es anticuerpo anti-fosfatidilserina scFv y tiene una secuencia descrita en la SEQ ID NO: 30.

9. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 1, en la que el dominio activador se selecciona entre el grupo que consiste en NRG1beta, IGF1 y una porción o un derivado del mismo.

50

10. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 1 o la reivindicación 2 que comprende además un conector que une el modulador de la semivida a la proteína biespecífica de fusión.

55 11. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 2, en donde la proteína biespecífica de fusión exhibe una semivida in vivo de entre 2 horas y 24 horas, más de 24 horas o más de una semana.

12. La proteína biespecífica de fusión de la reivindicación 2, que además comprende

- 60 (a) un polipéptido líder, en donde el polipéptido líder comprende una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 41-42 87-91 o 244; o
- (b) un polipéptido que comprende polihistidina, en donde el polipéptido que comprende polihistidina tiene una secuencia descrita en las SEQ ID NO: 43-44 o 92-94.

65 13. Una composición farmacéutica que comprende un vehículo farmacéuticamente adecuado y una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión biespecífica de la reivindicación 2.

14. Una composición farmacéutica para su uso en el tratamiento de pacientes que padecen, o están en riesgo de padecer, daño tisular, con el fin de aumentar la supervivencia del tejido o regenerar el tejido dañado, comprendiendo la composición farmacéutica una cantidad terapéuticamente eficaz de una proteína de fusión biespecífica de acuerdo con la reivindicación 1 o la reivindicación 2 y un vehículo fisiológicamente aceptable.
- 5
15. La composiciónn farmacéutica para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde la composición comprende además células madre.
- 10
16. Una molécula de ácido nucleico que codifica una proteína de fusión biespecífica de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1-12.

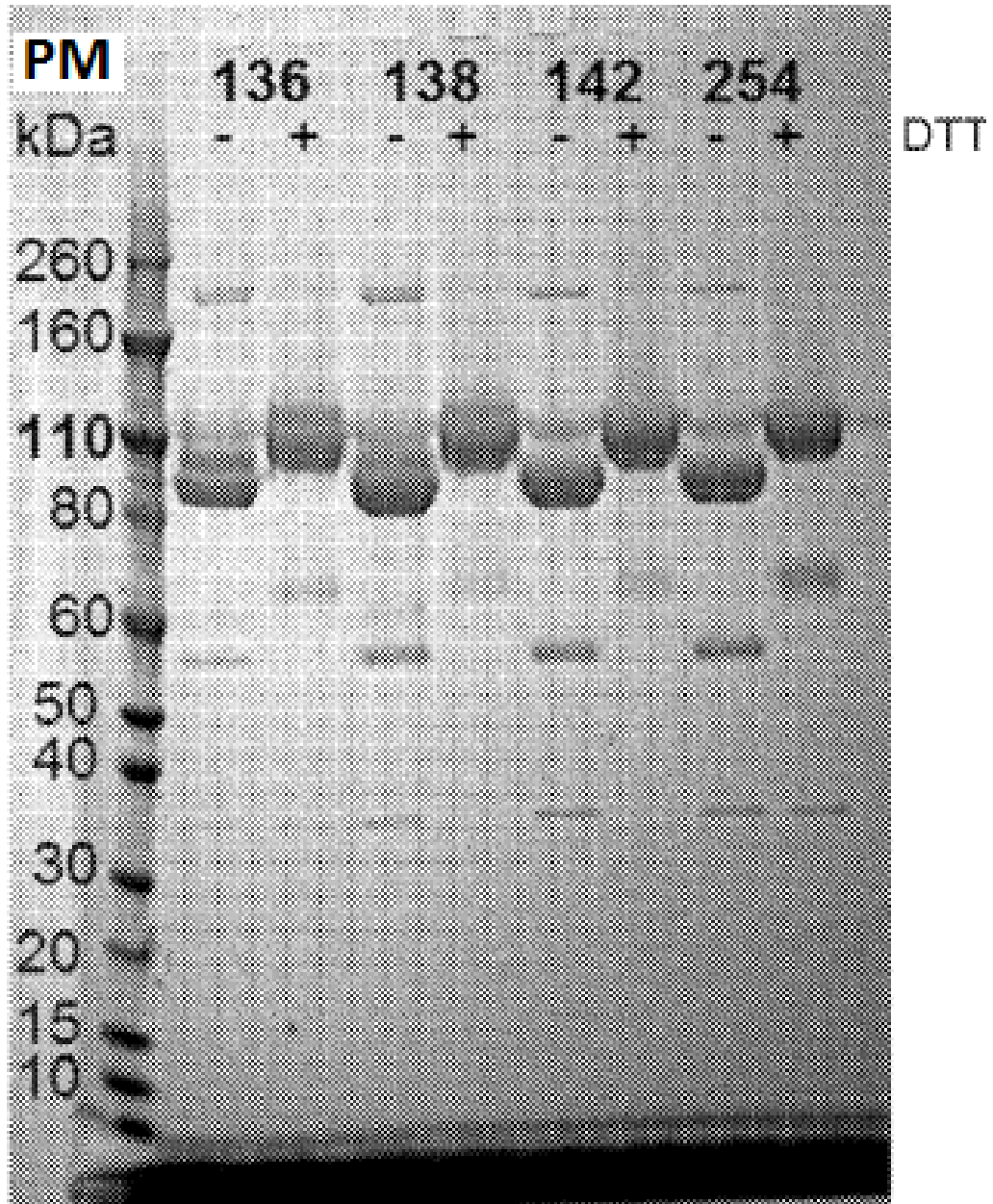


FIG. 1

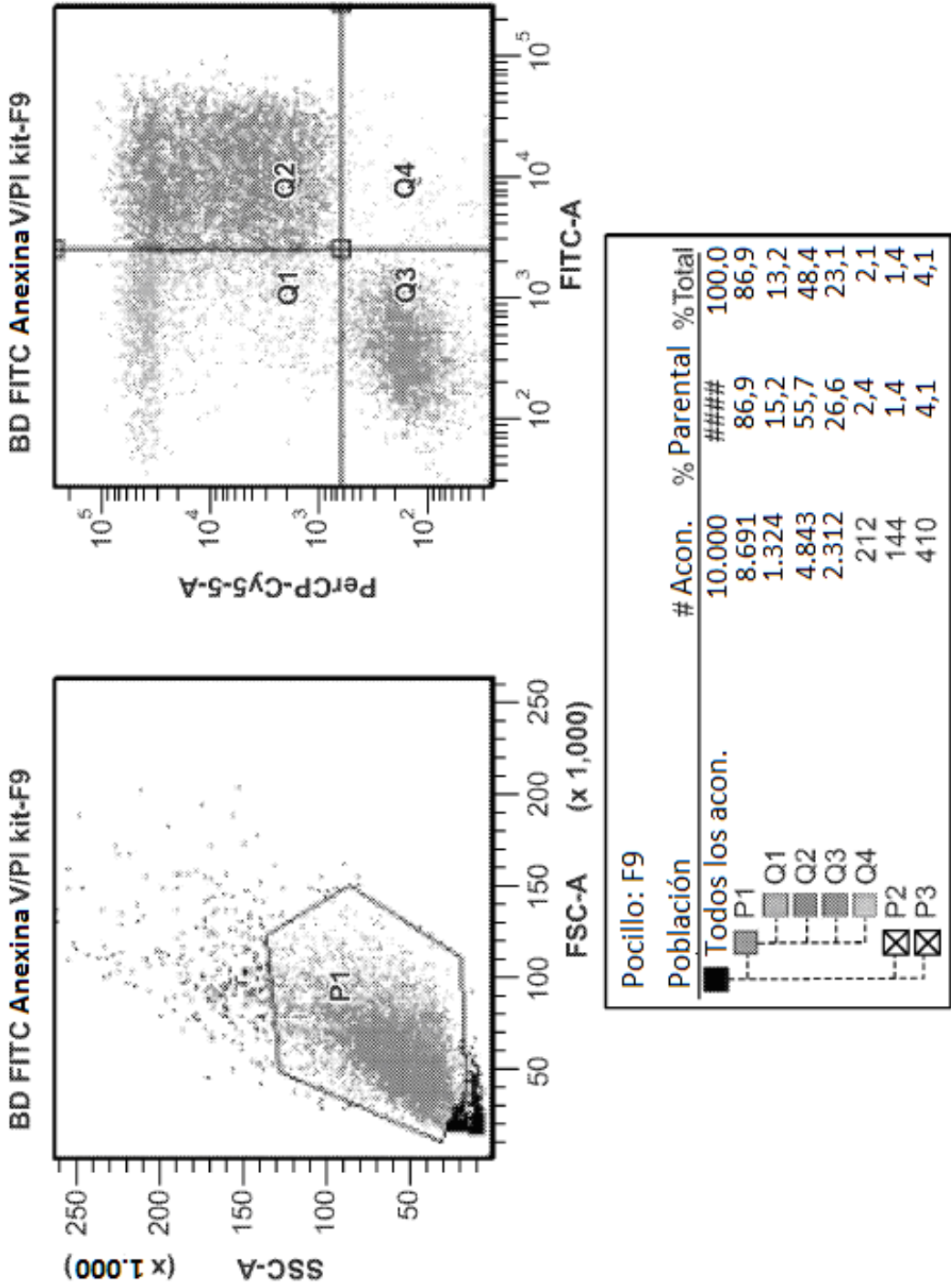


FIG. 2

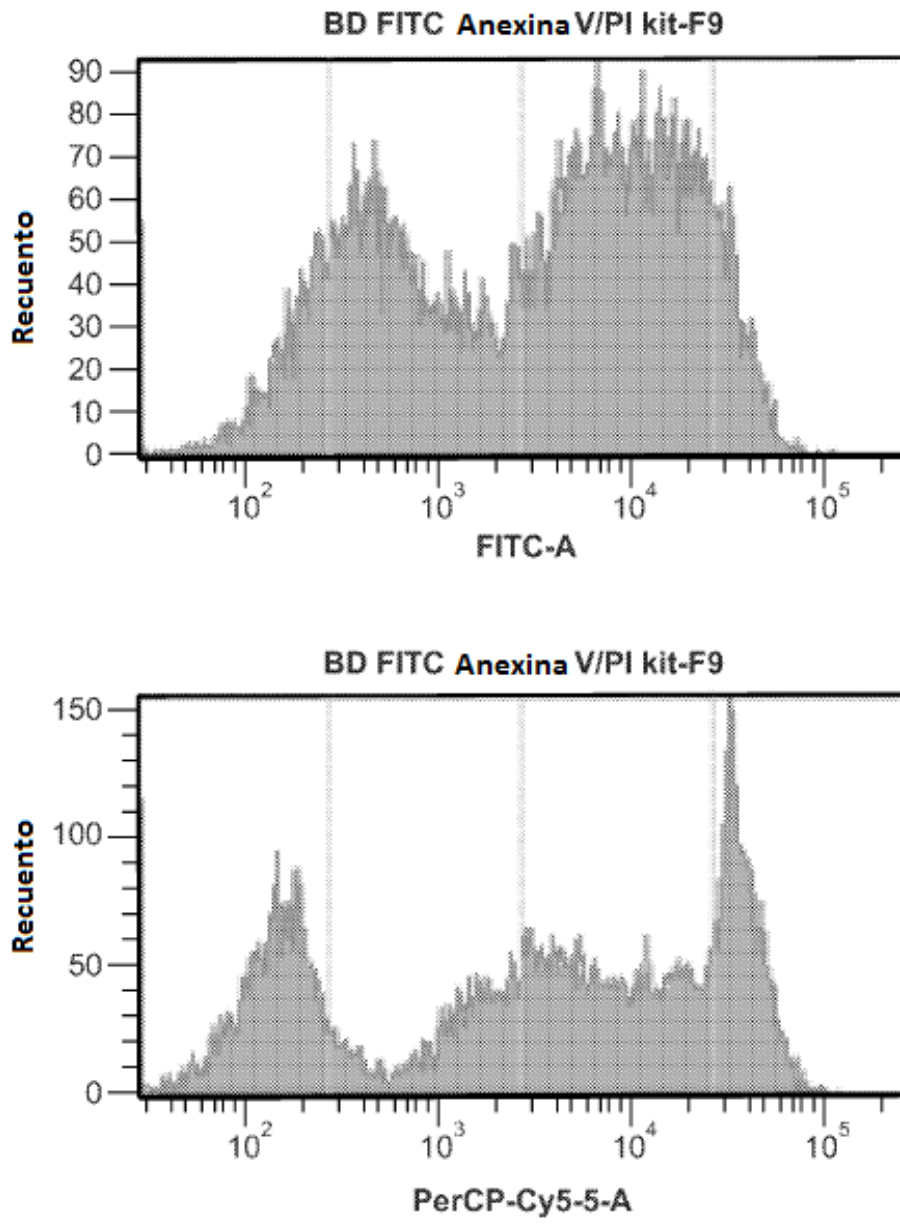


FIG. 3

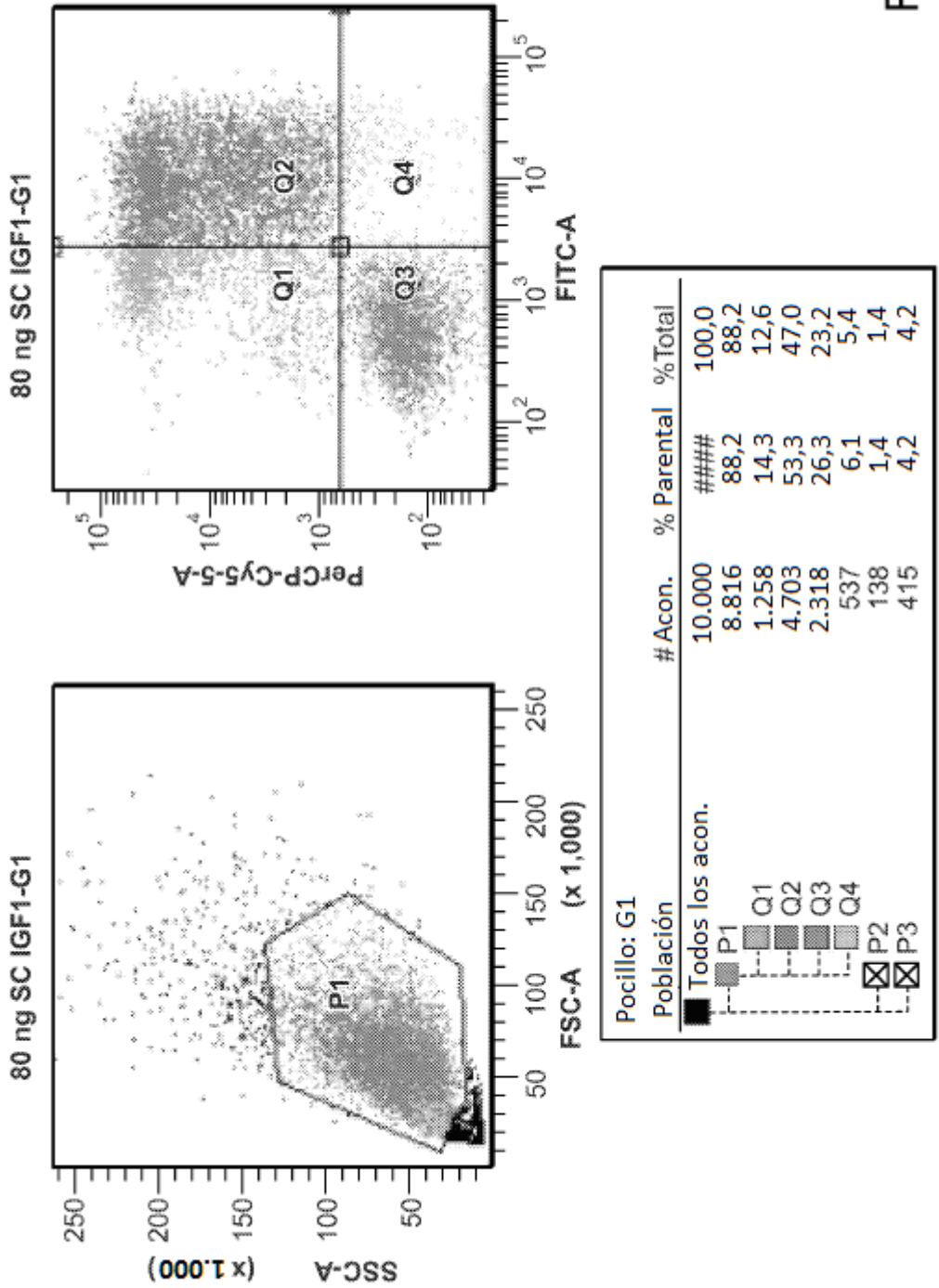


FIG. 4

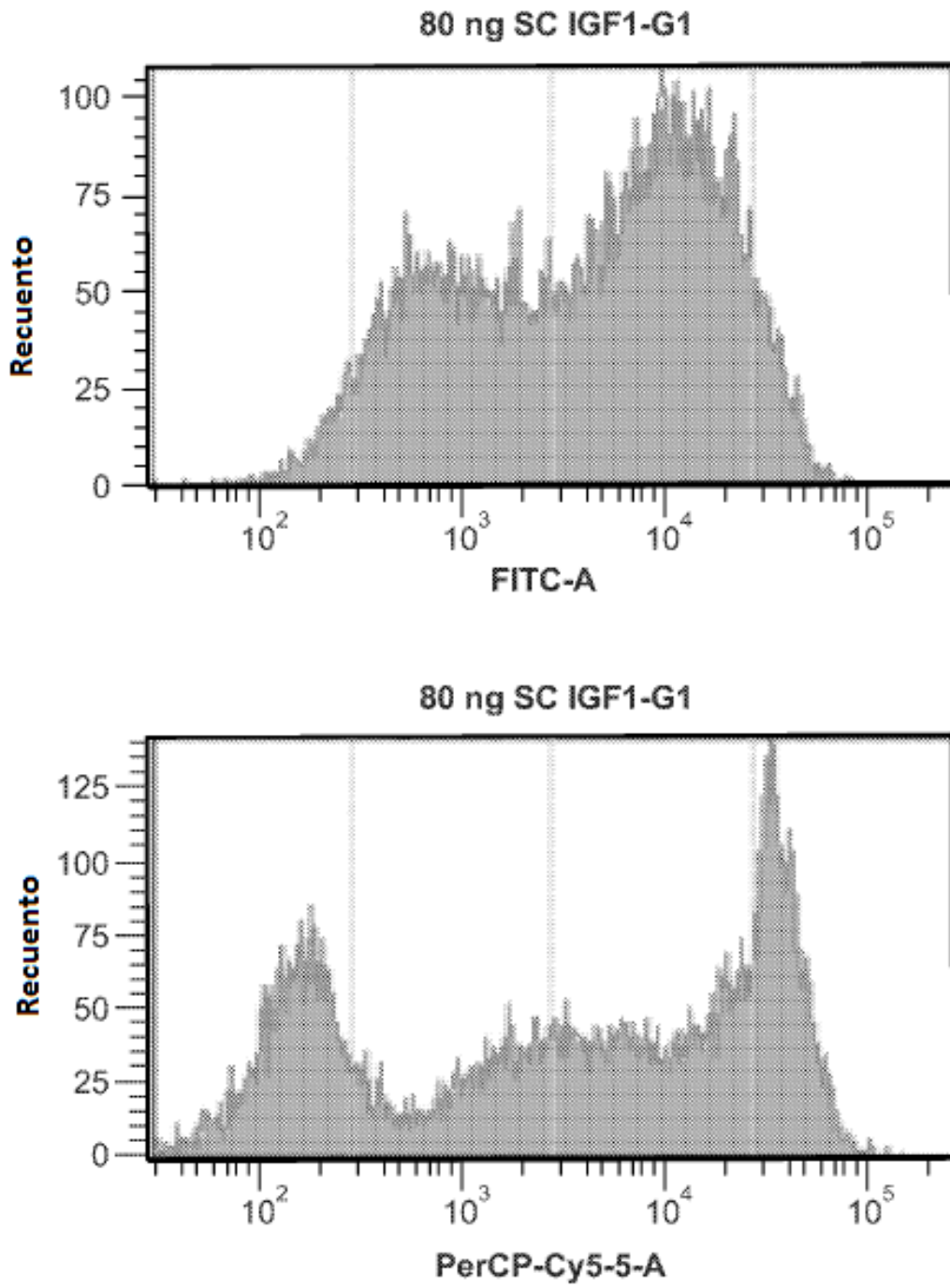


FIG. 5

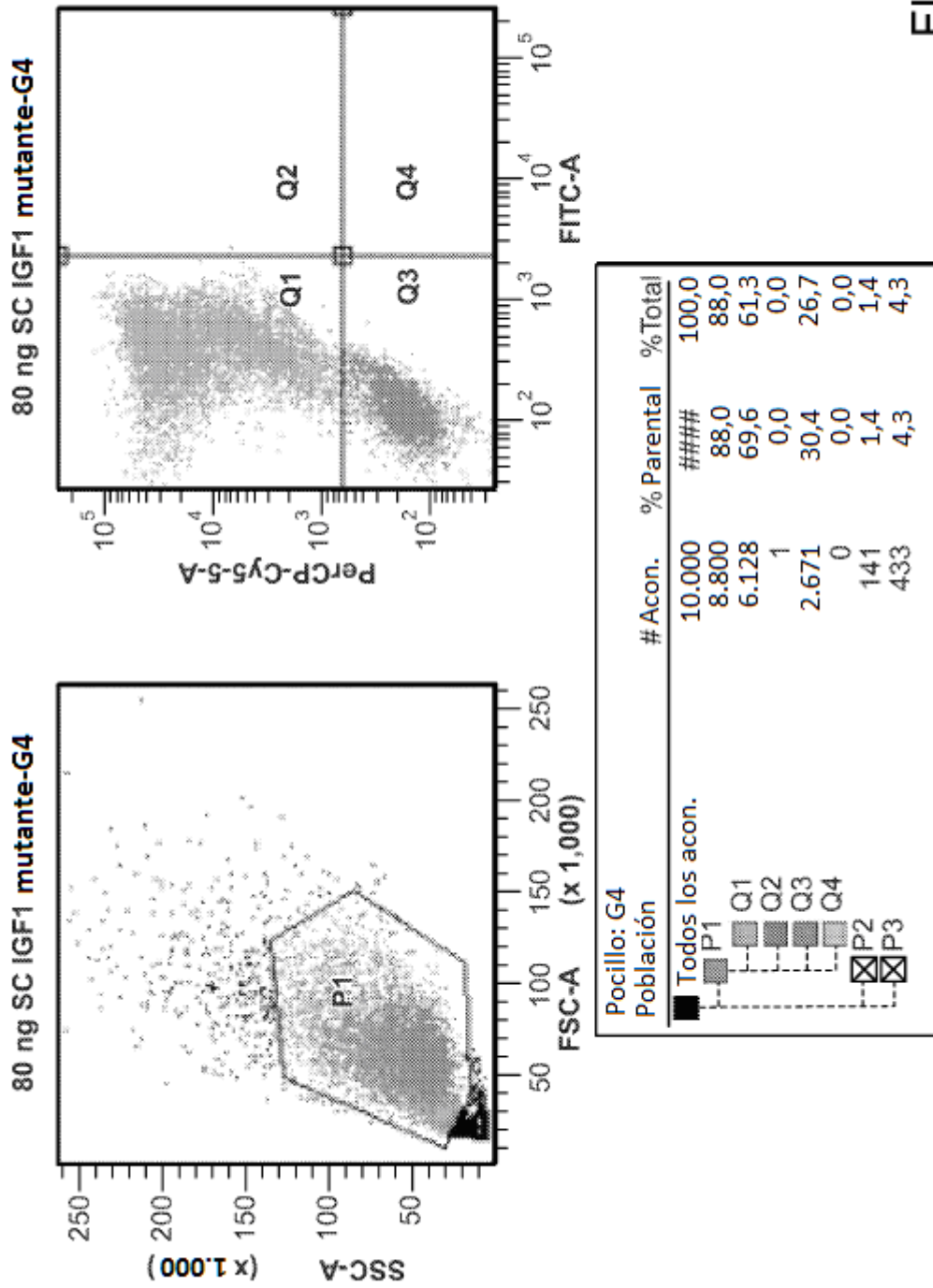


FIG. 6

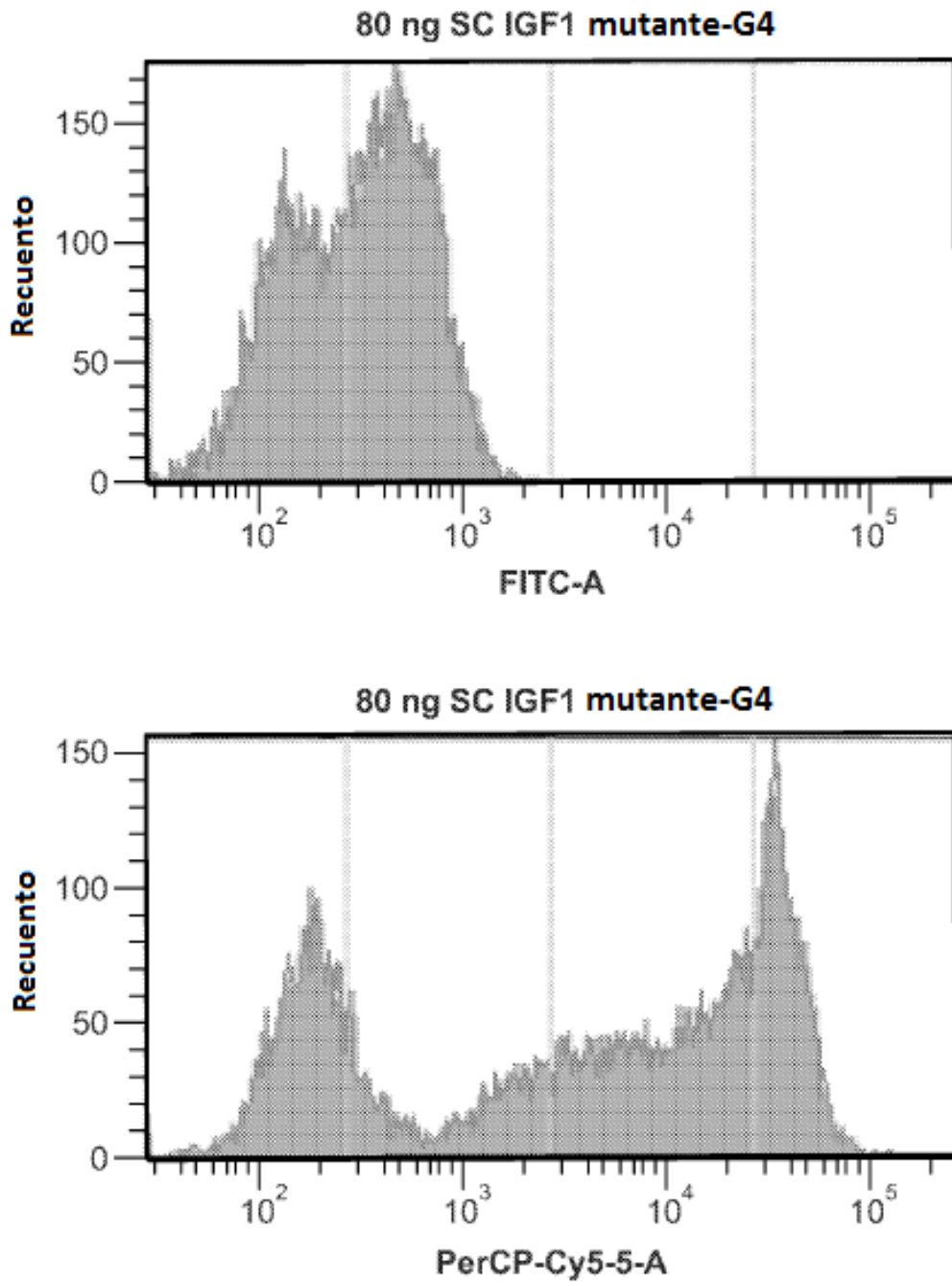


FIG. 7

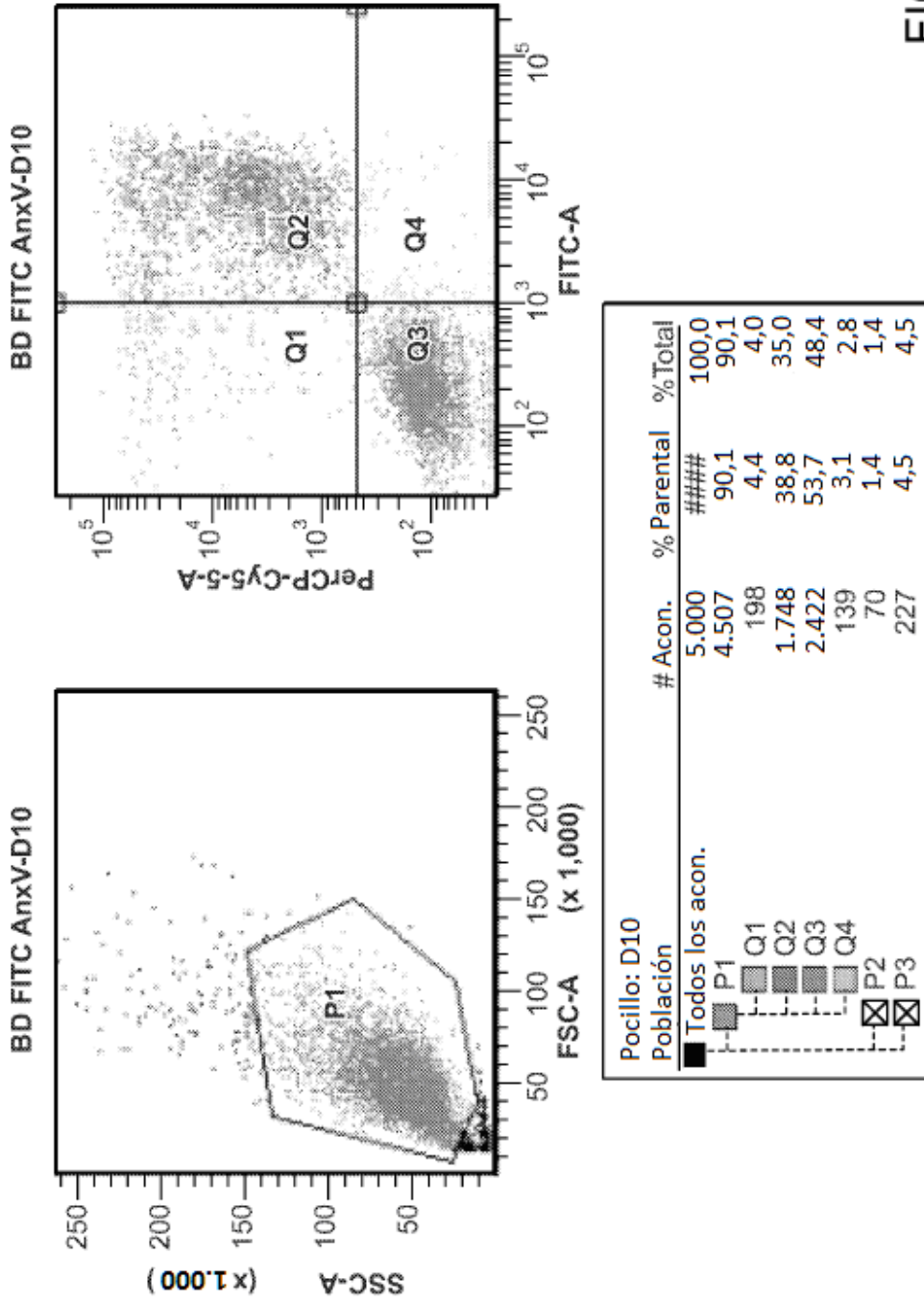


FIG. 8

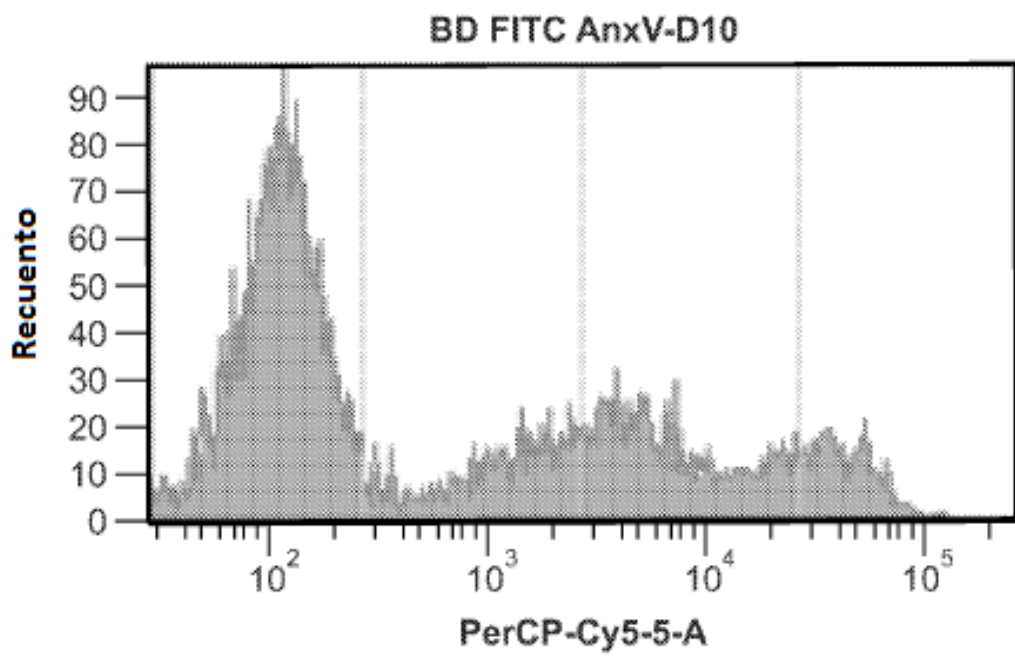
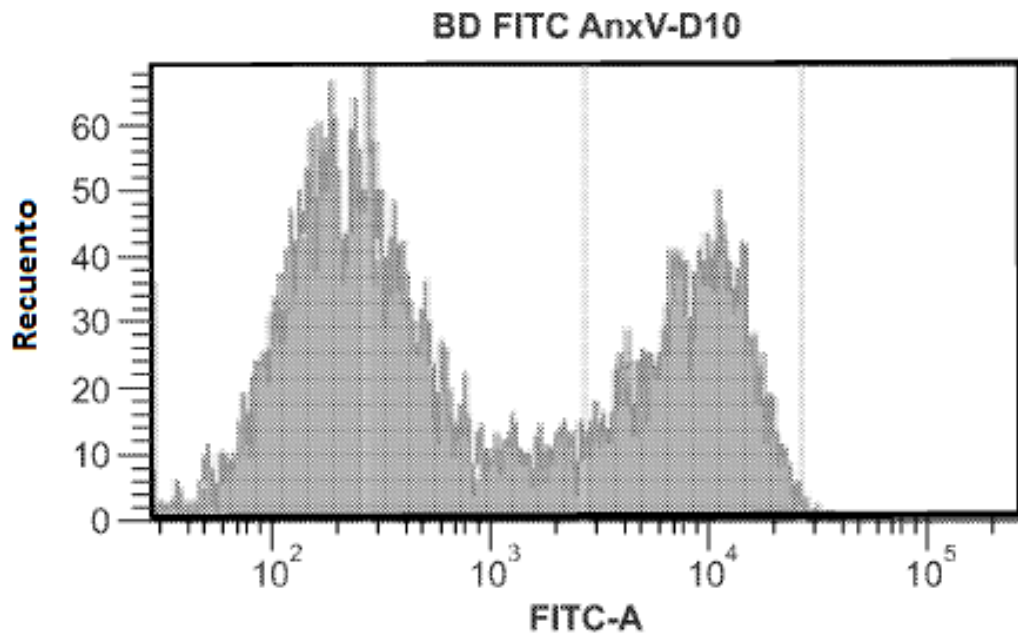


FIG. 9

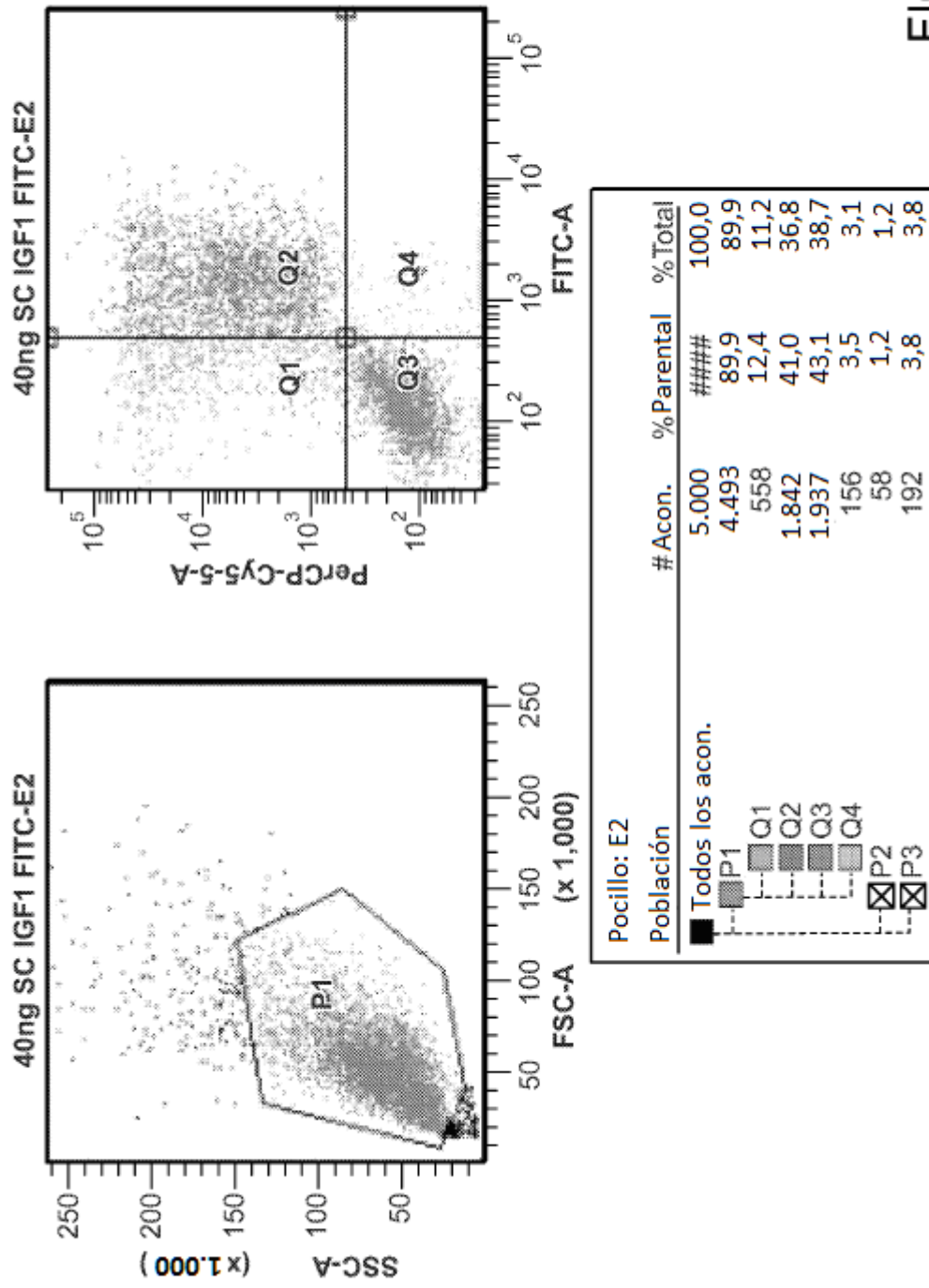


FIG. 10

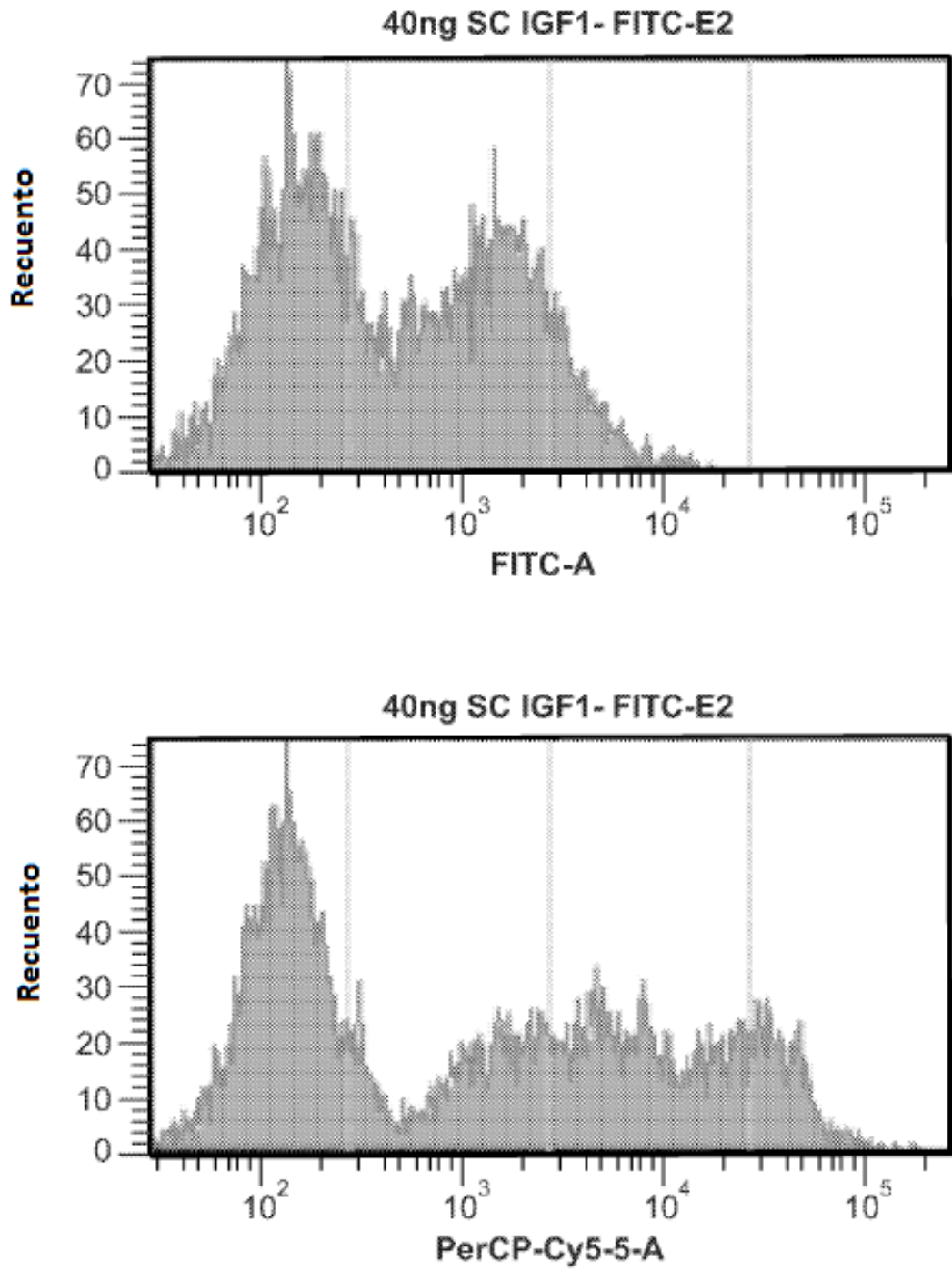


FIG. 11

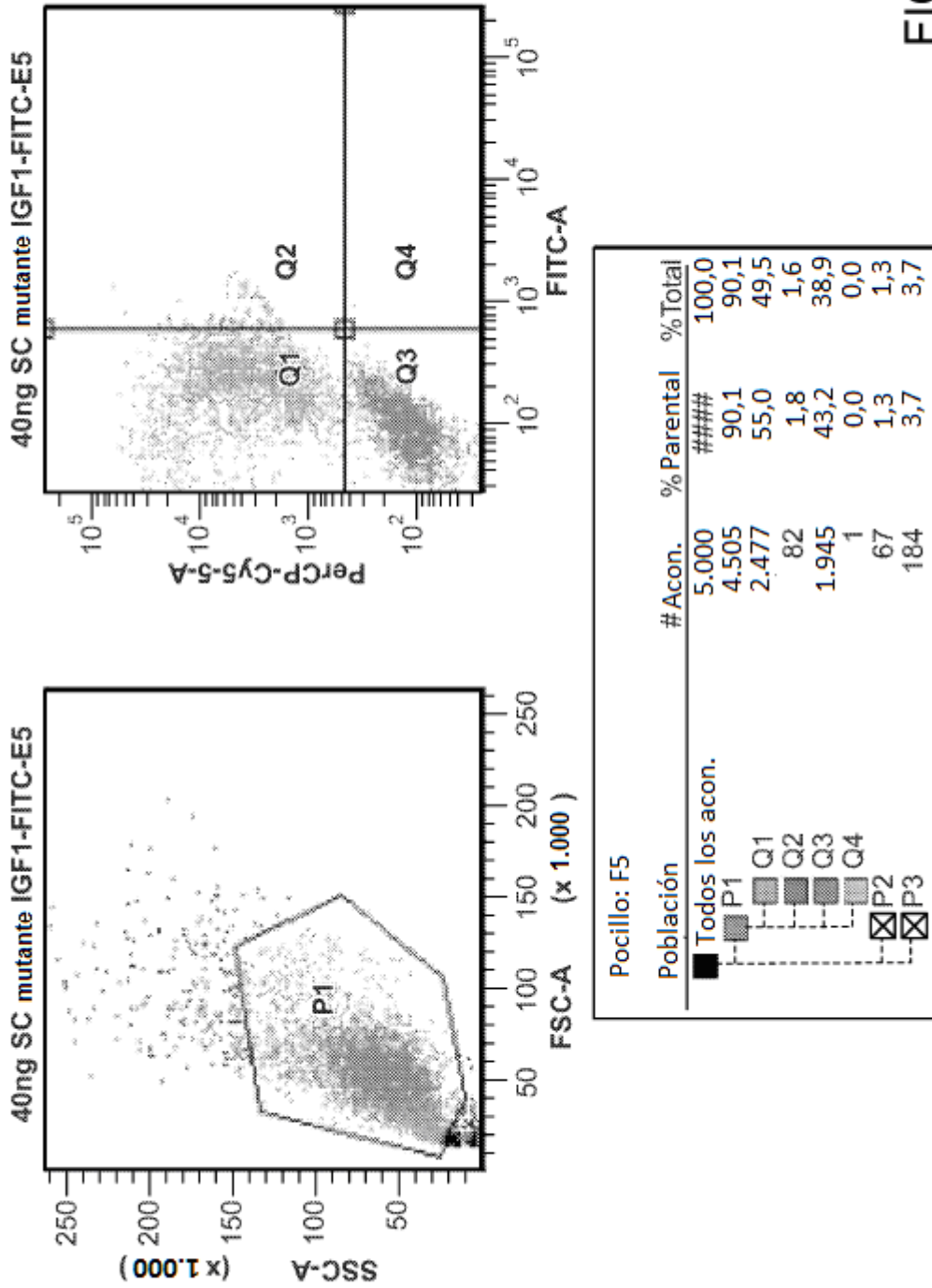


FIG. 12

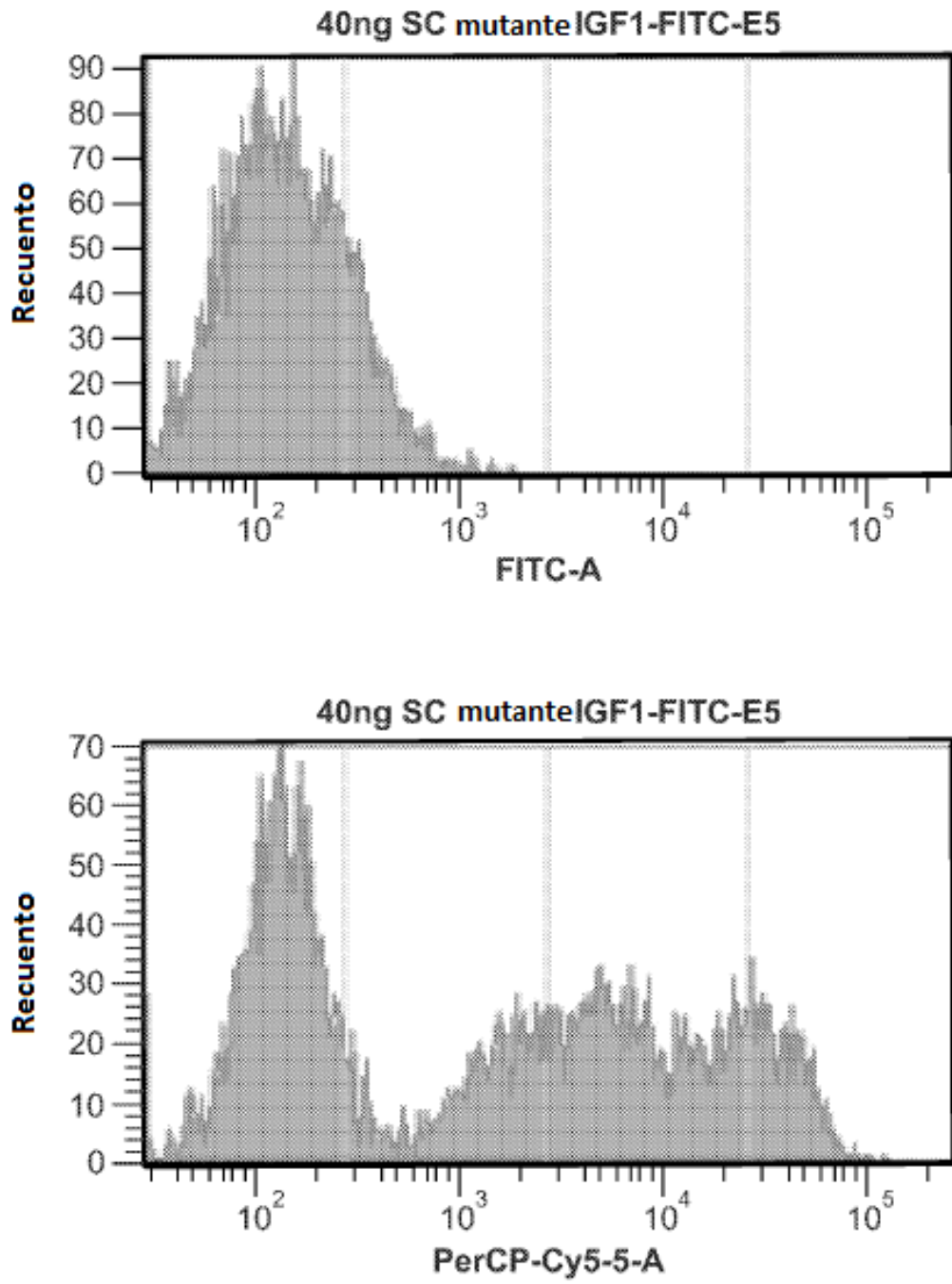


FIG. 13

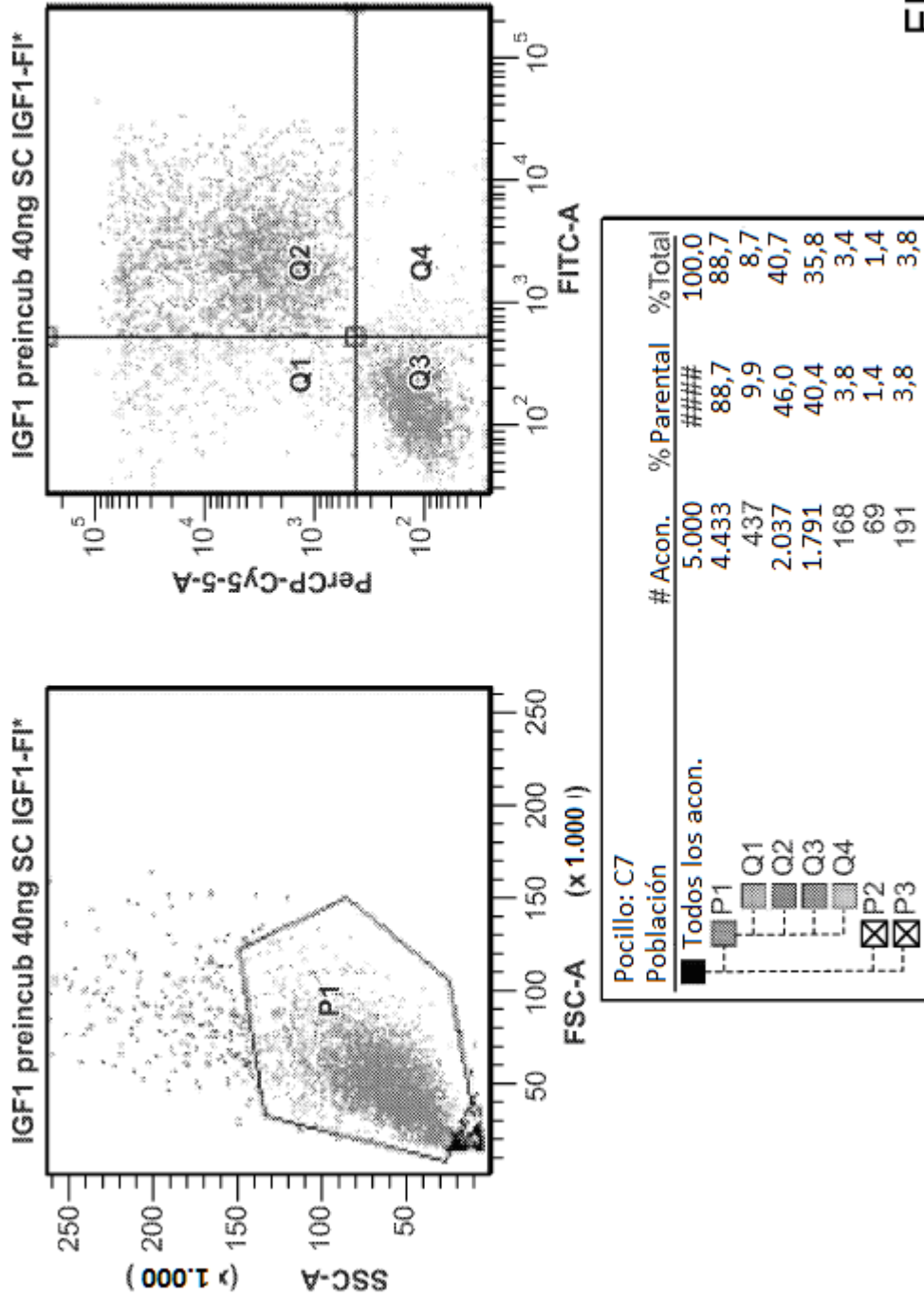


FIG. 14

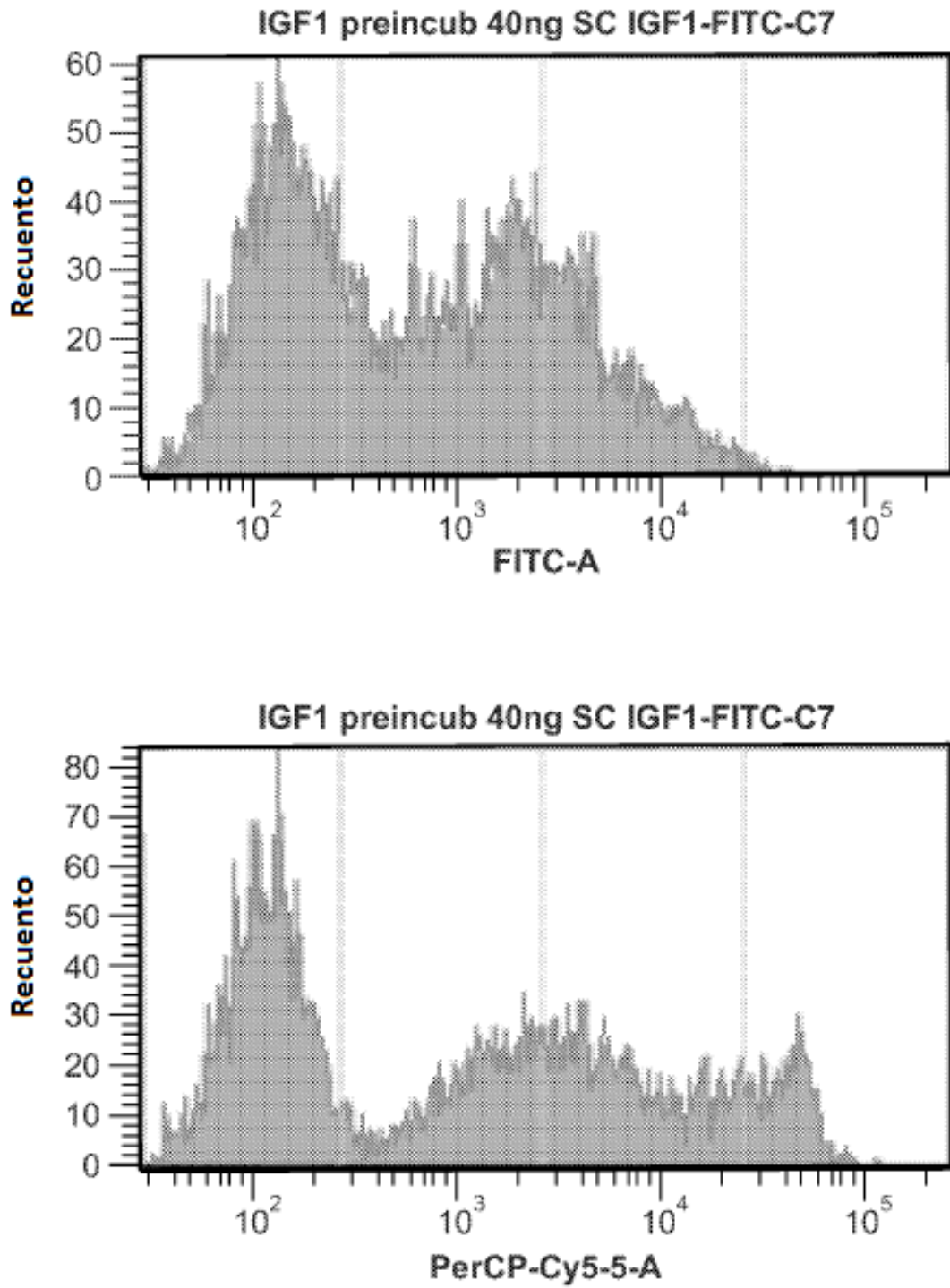


FIG. 15

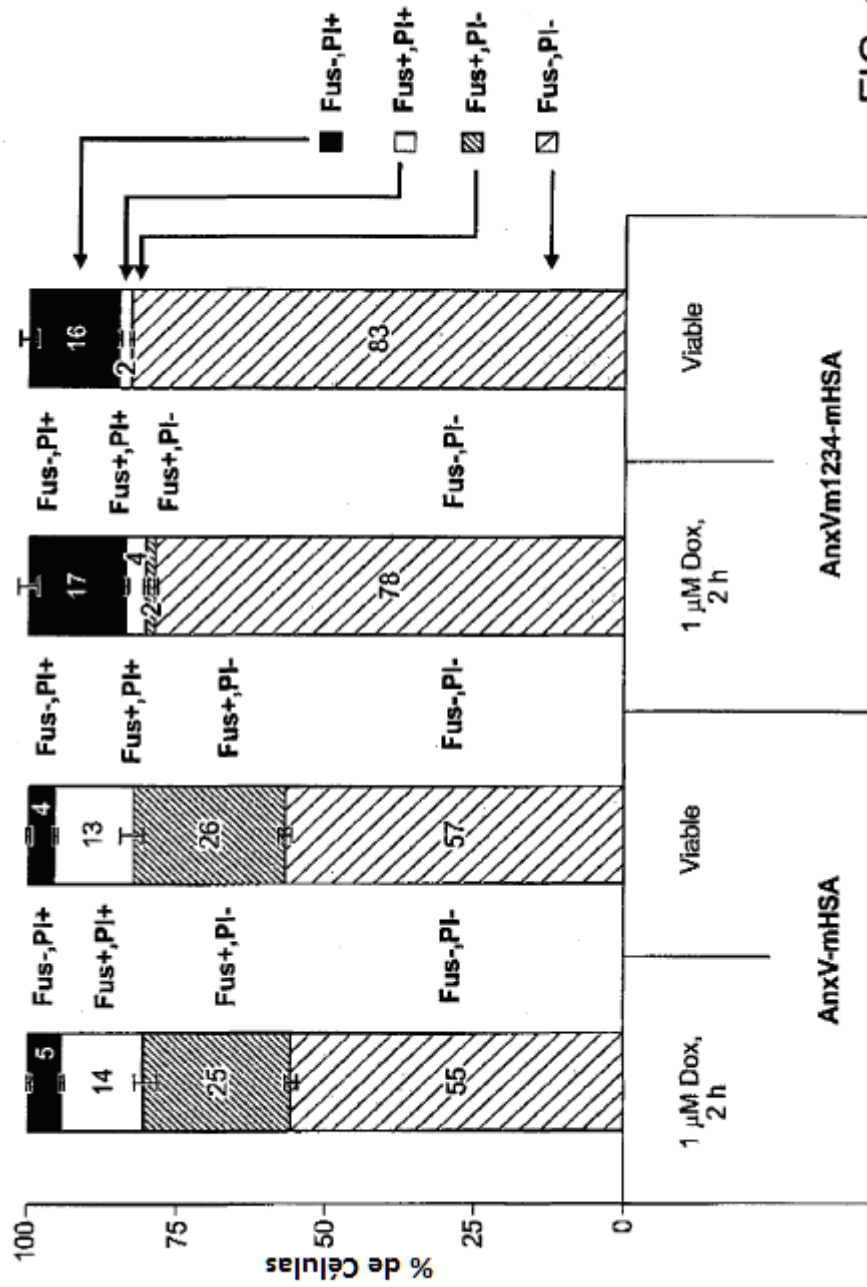


FIG. 16

FIG. 17A Células Cardíacas (Derivadas de ESC)

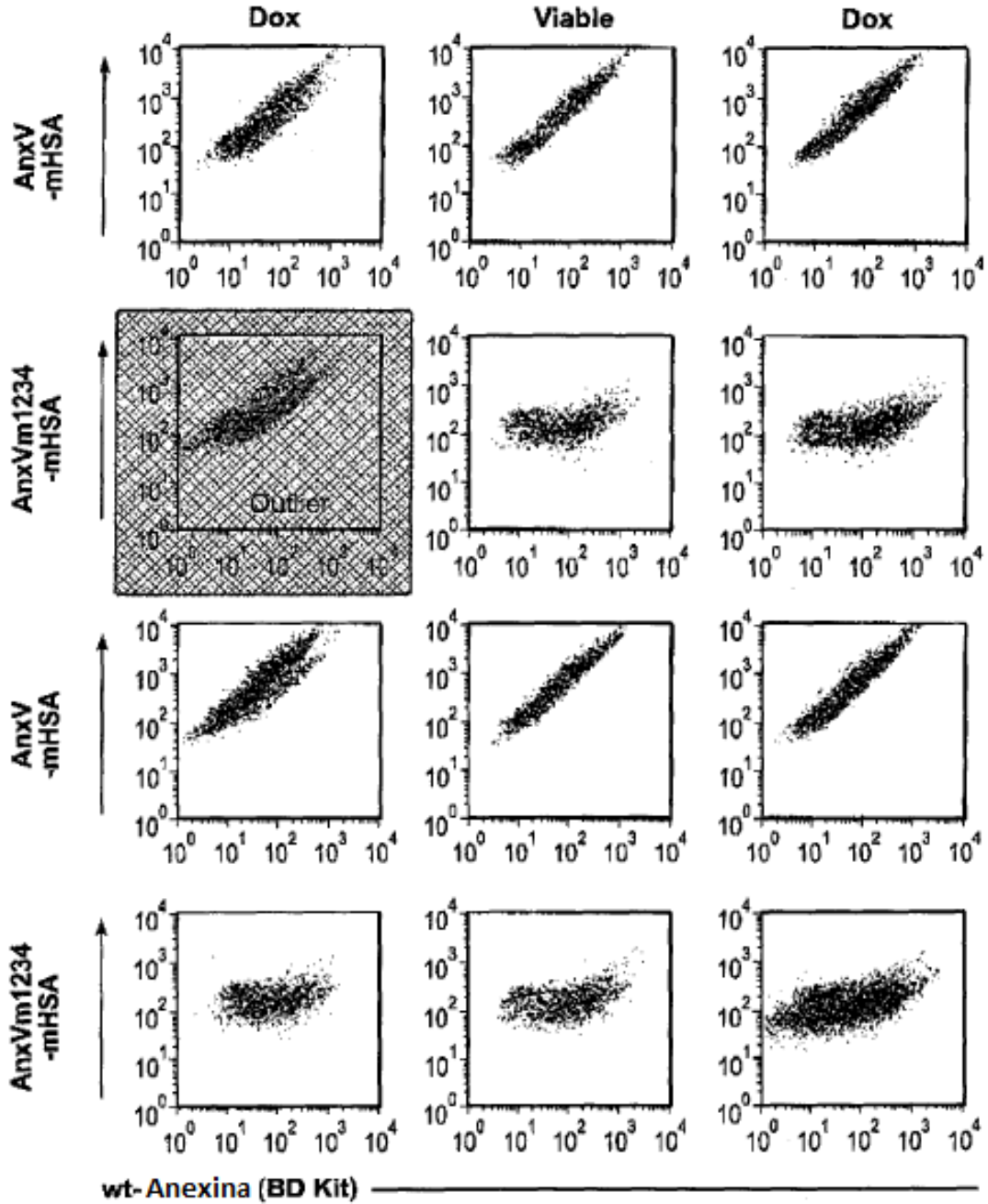


FIG. 17A	FIG. 17B
----------	----------

FIG. 17

FIG. 17B Células Cardiacas (Derivadas de ESC)

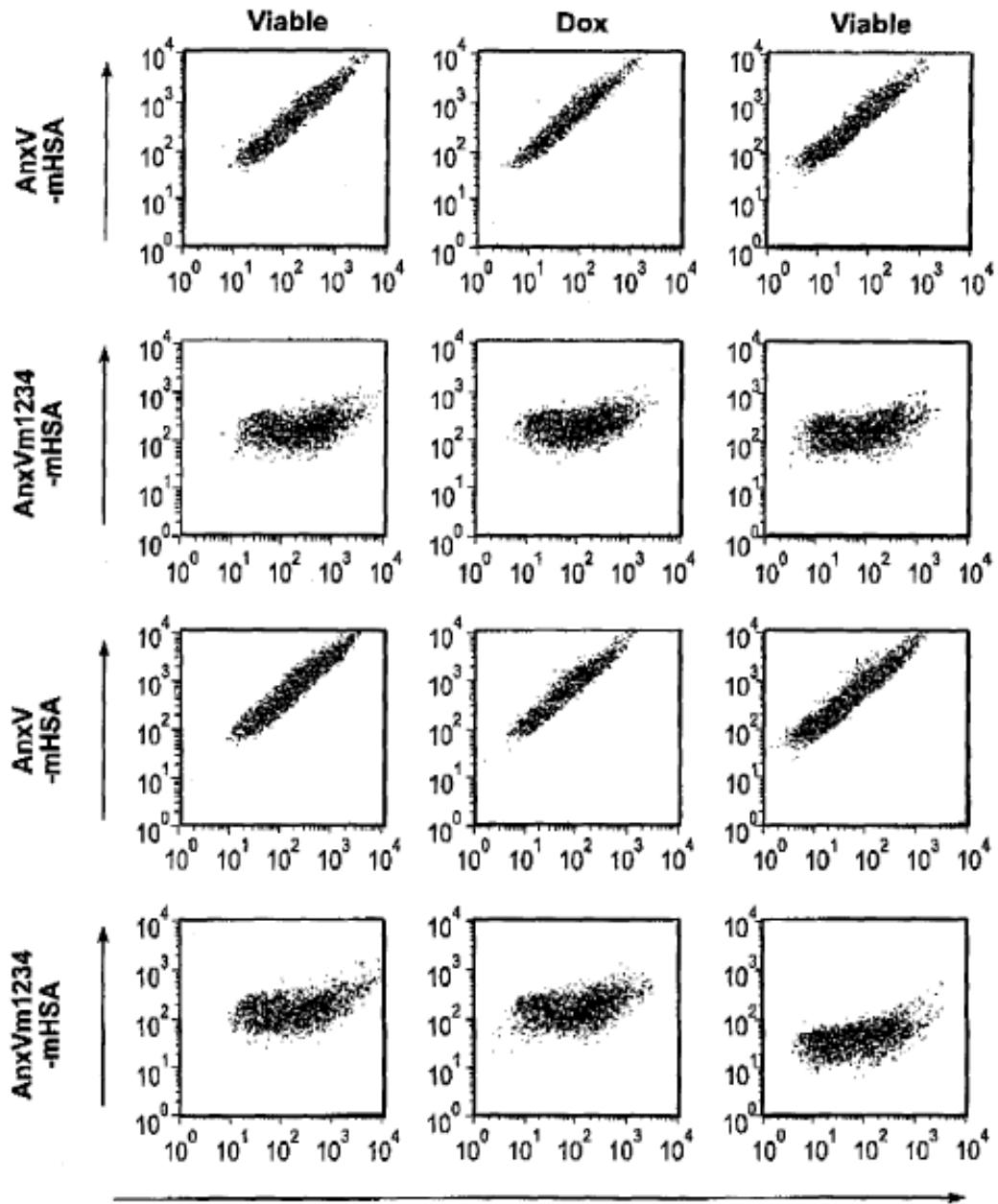


FIG. 18A Células Cardiacas (Derivadas de ESC)

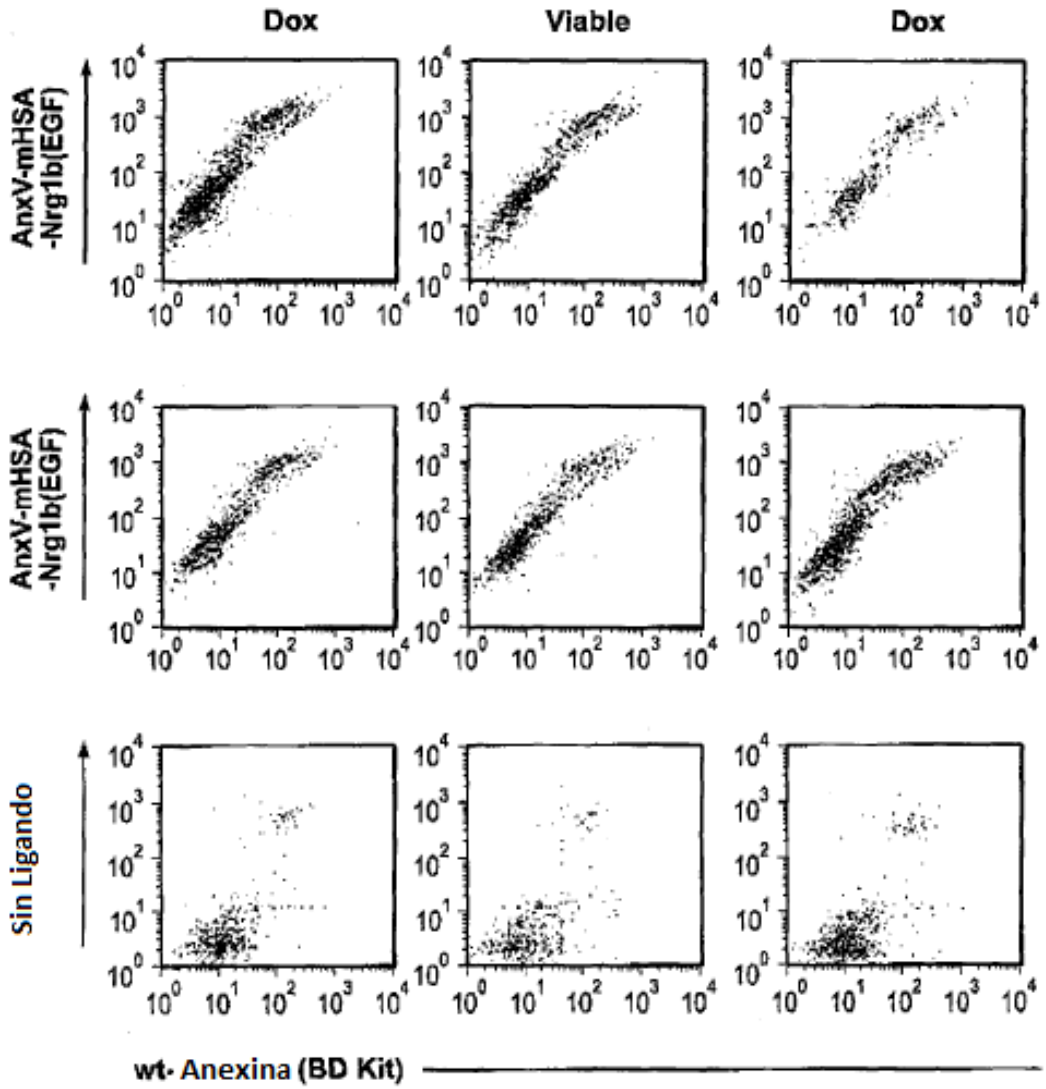
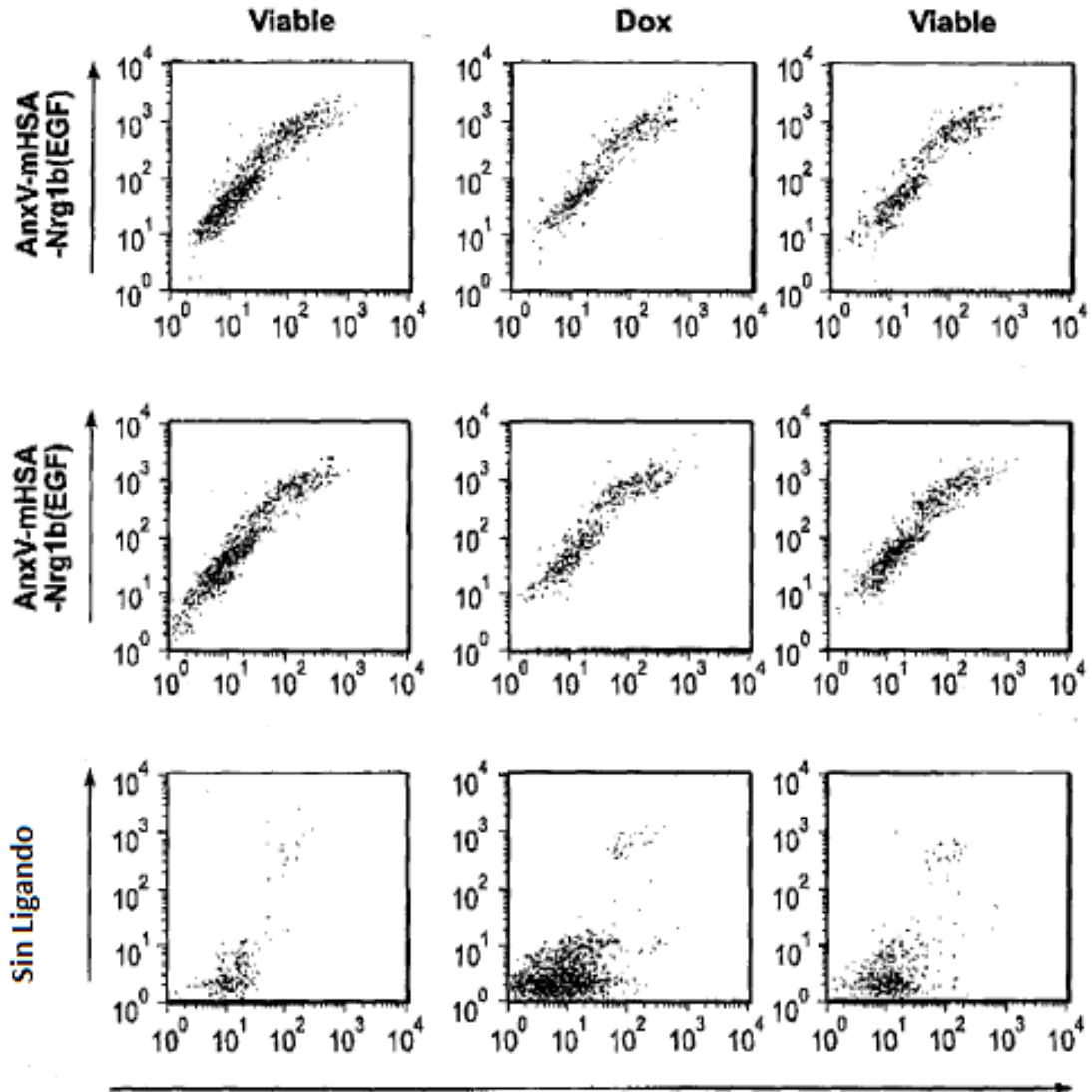


FIG. 18A	FIG. 18B
-------------	-------------

FIG. 18

FIG. 18B Células Cardiacas (Derivadas de ESC)



Direccinamiento PS con Anexina V o Sinaptotagmina

IGF1_mHSA_Syt1 (SEQ.ID 152)
IGF1_mHSA_AnXV (SEQ.ID 136)

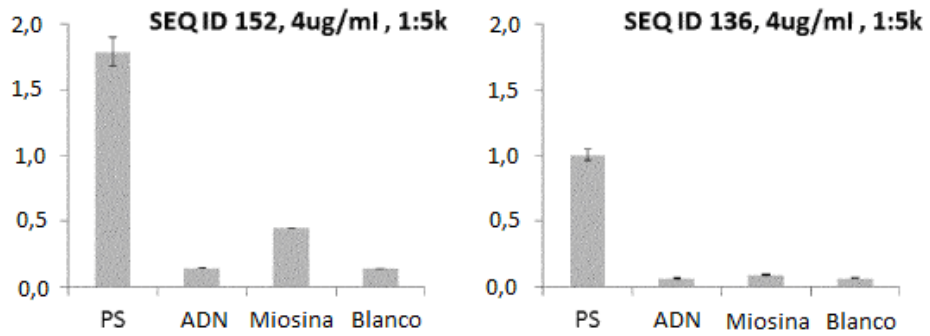


Figura 19

ADN Diana

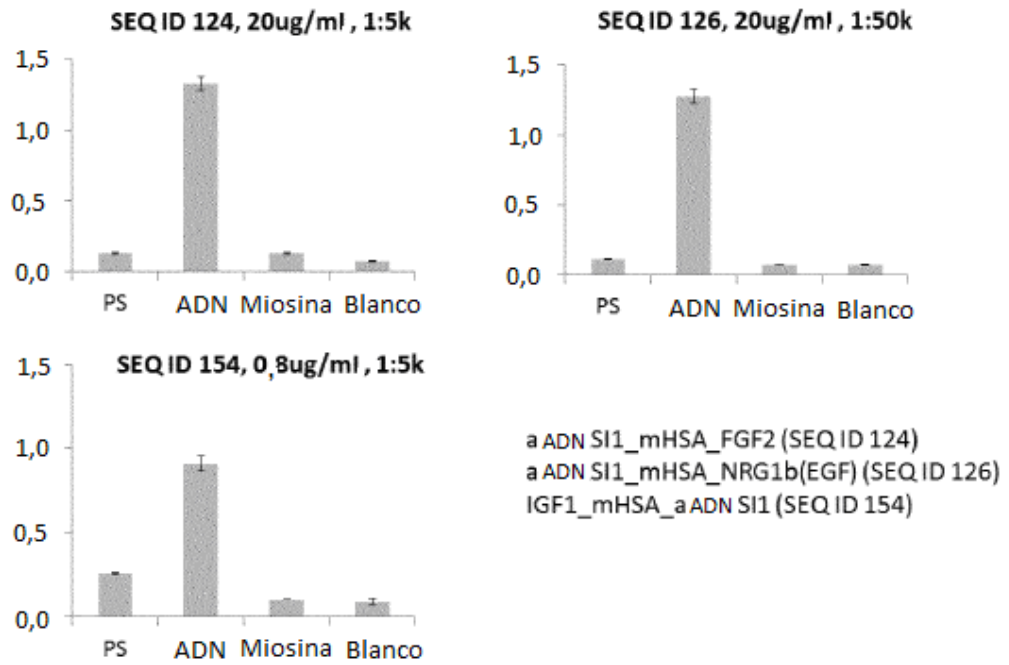


Figura 20

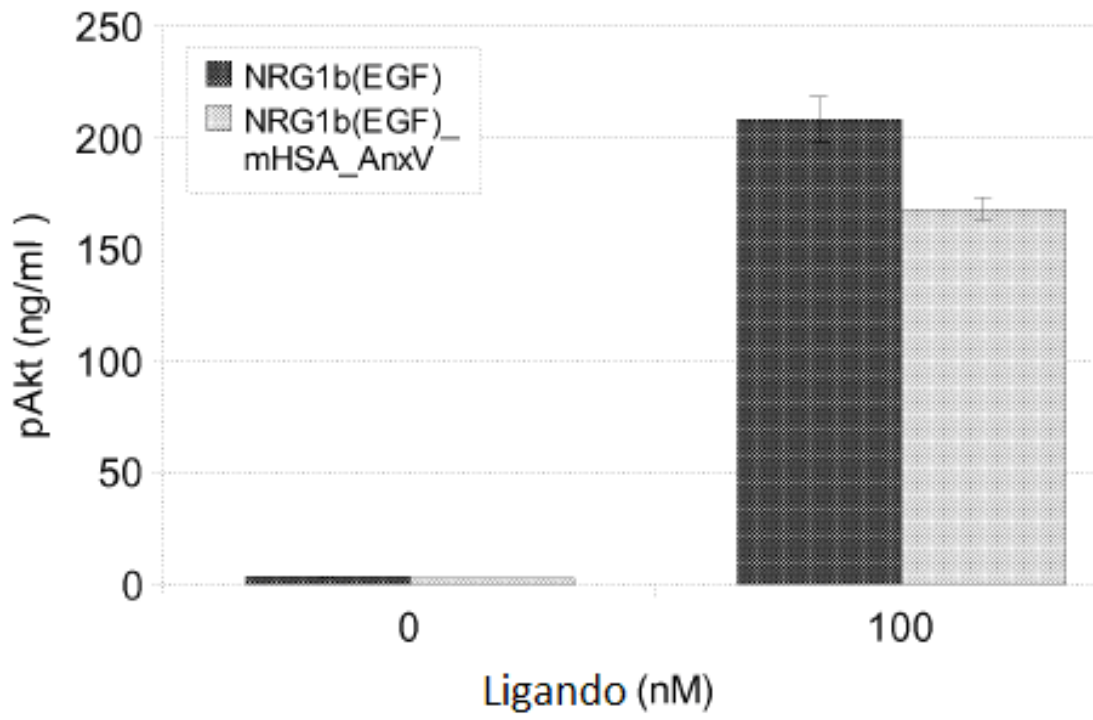


Figura 21

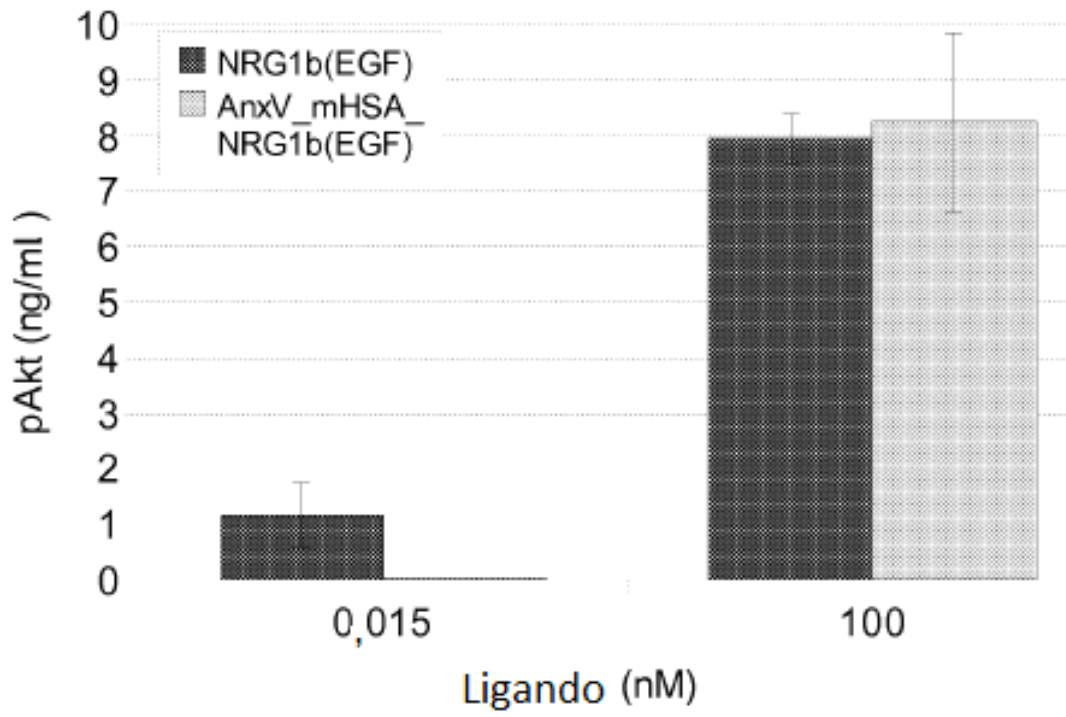


Figura 22

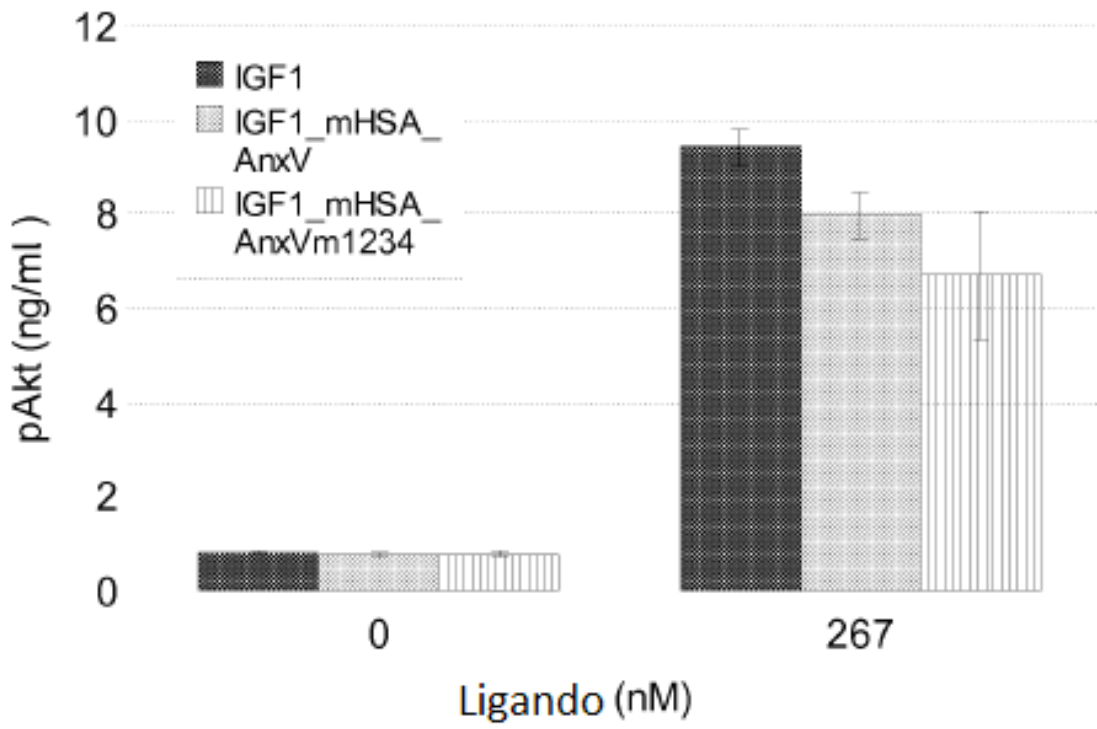


Figura 23

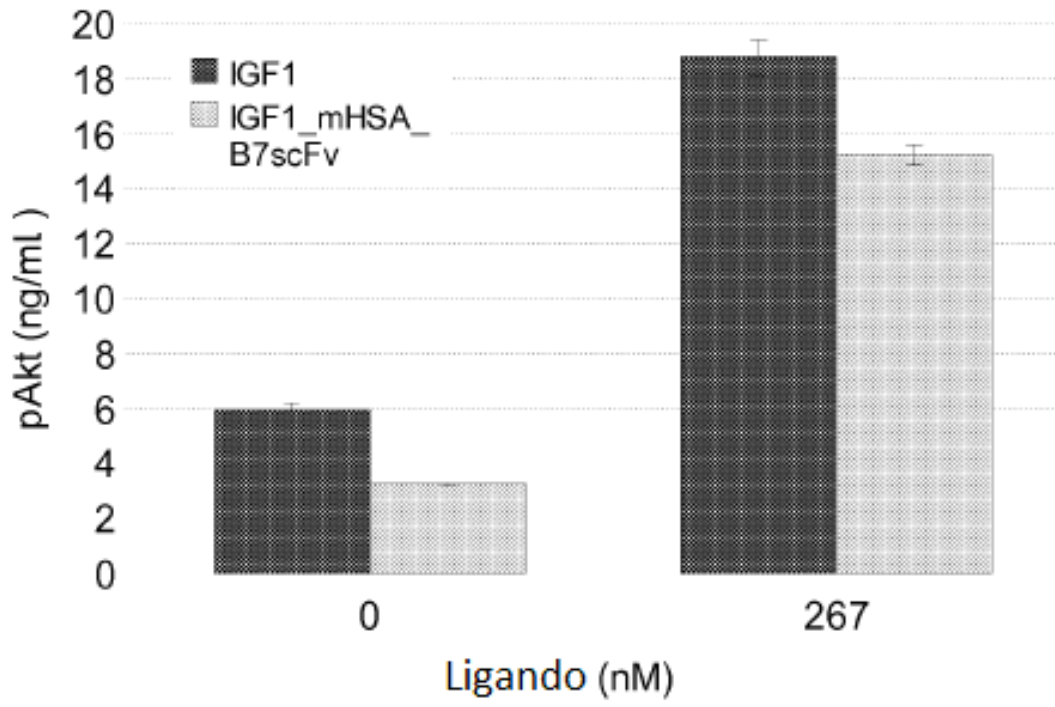


Figura 24

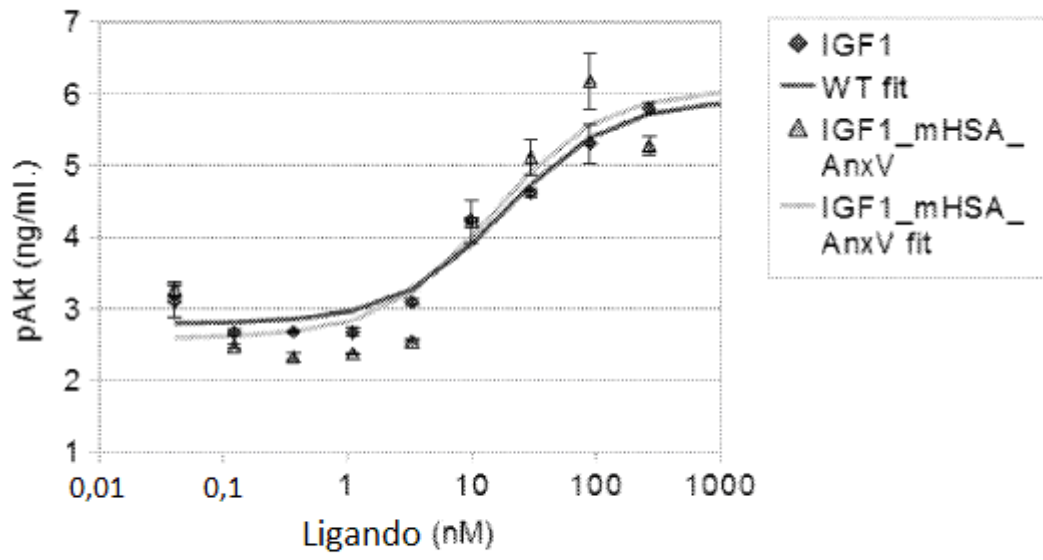


Figura 25

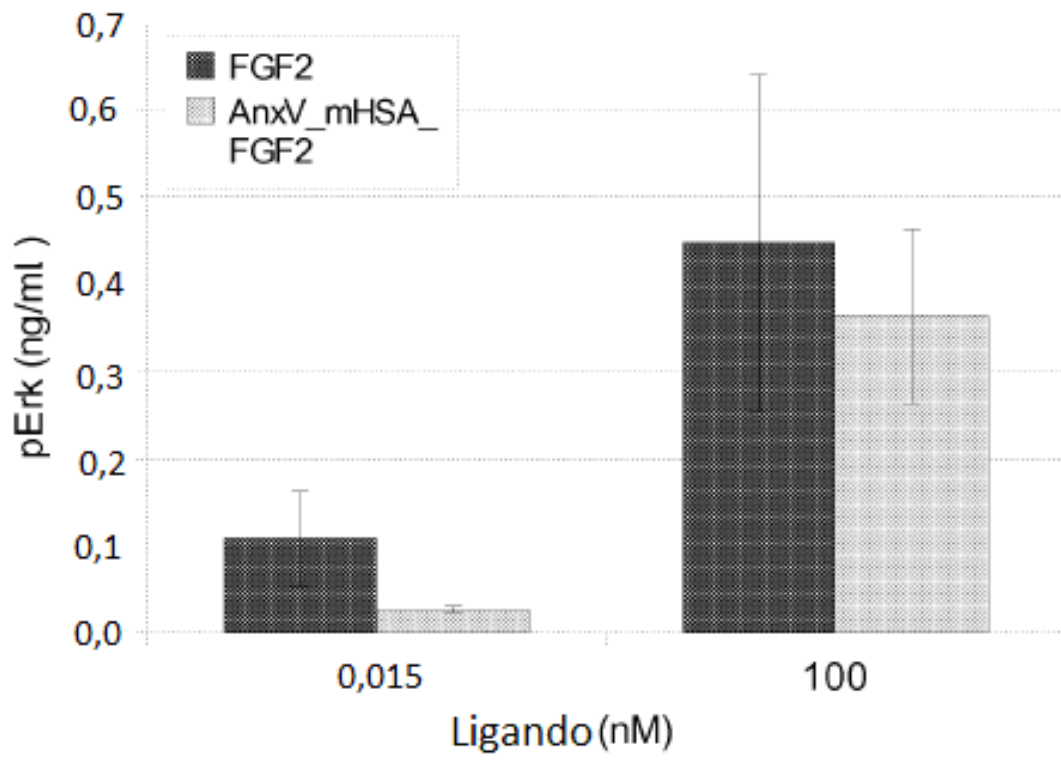


Figura 26

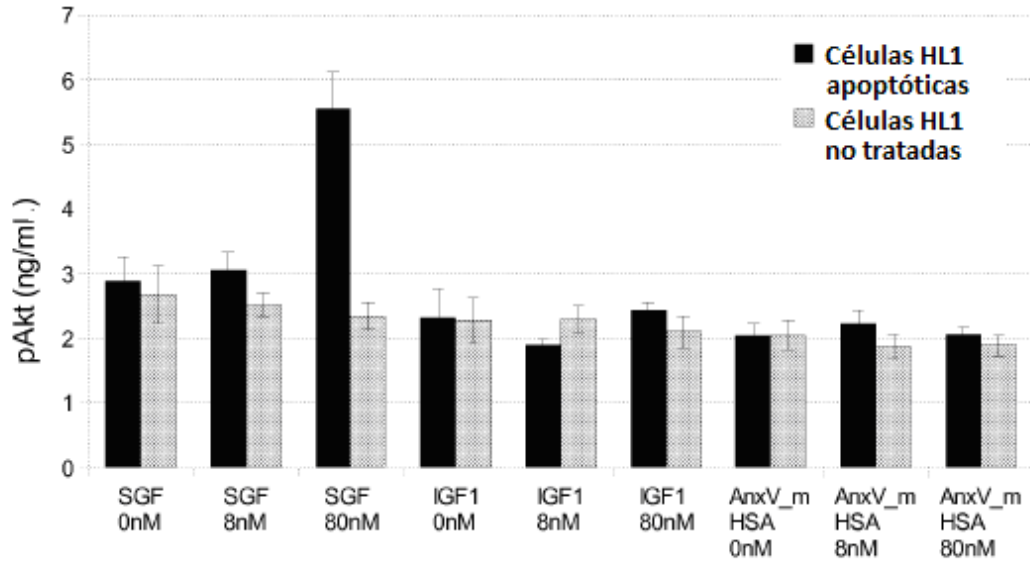


Figura 27

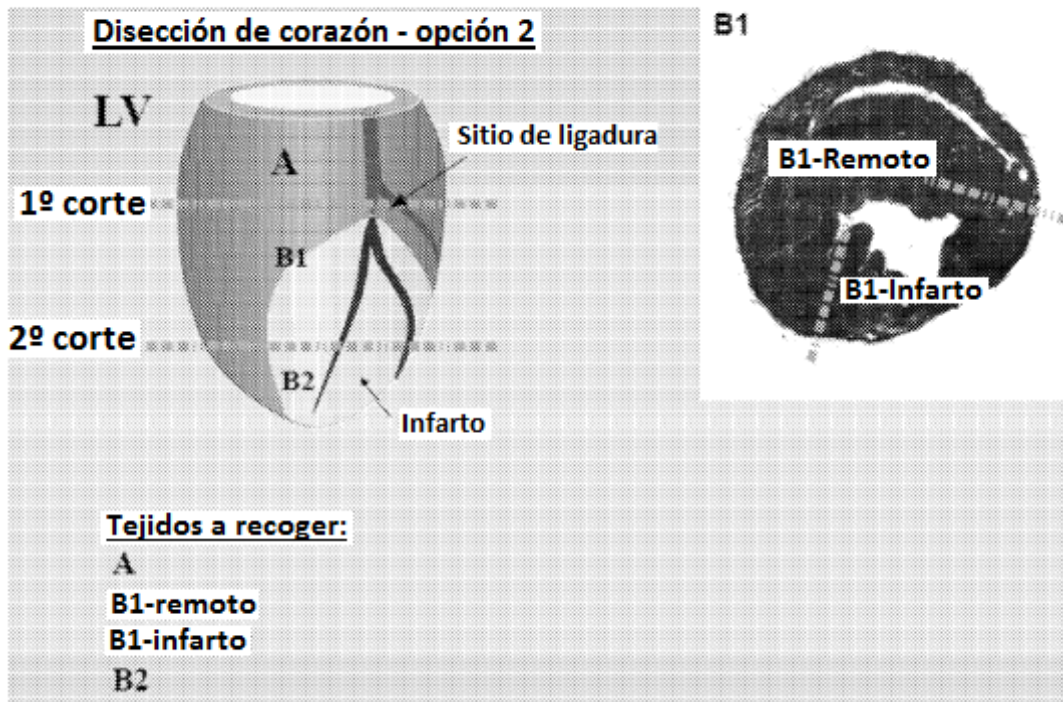


FIG. 28

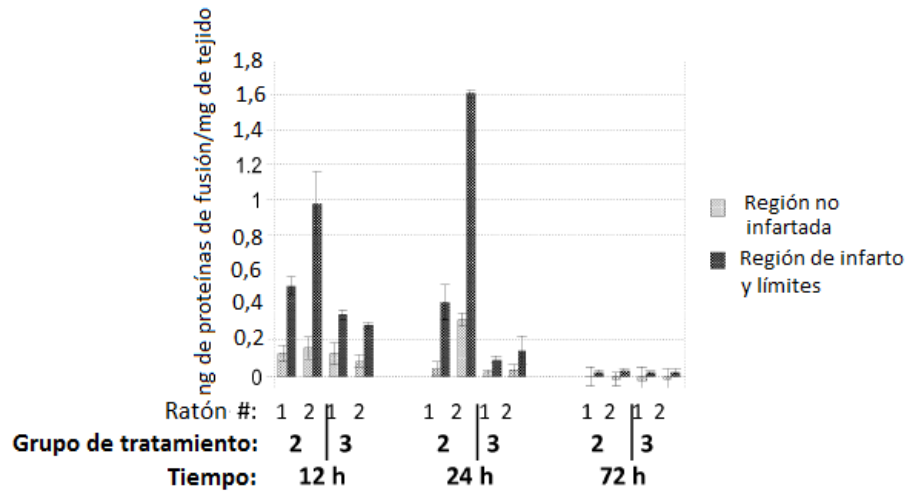


Figura 29

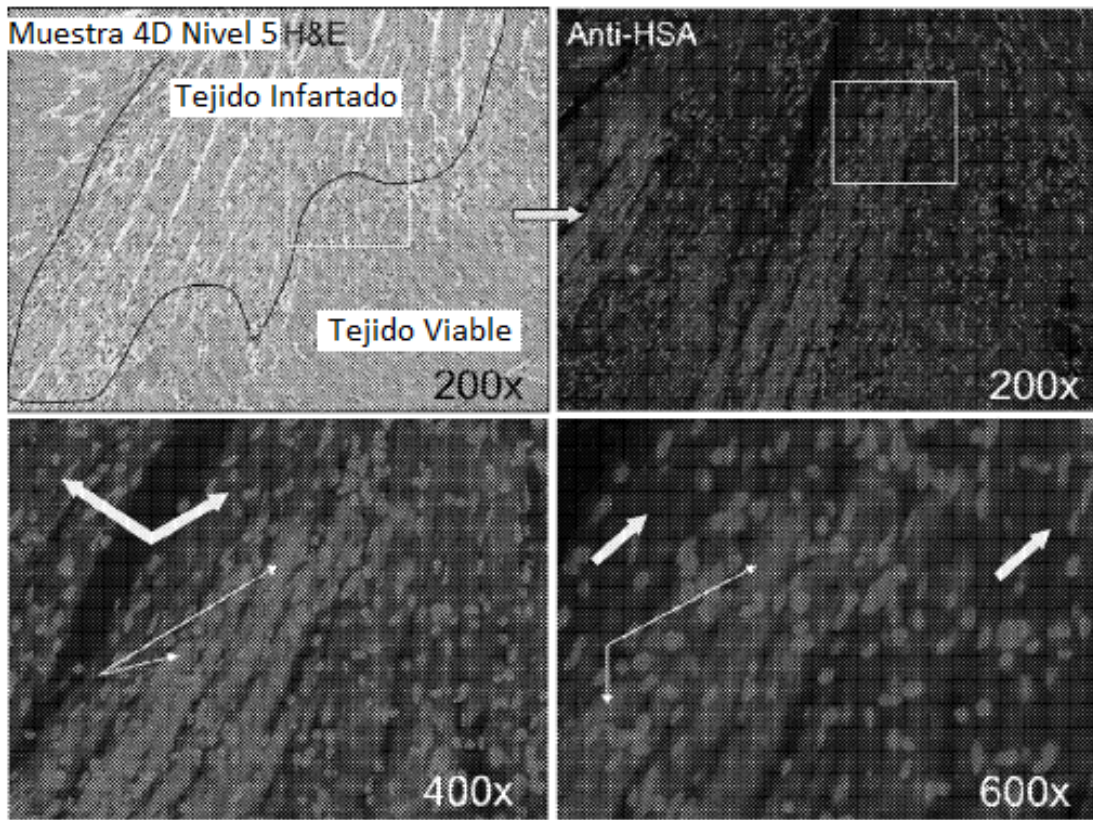


FIG. 30

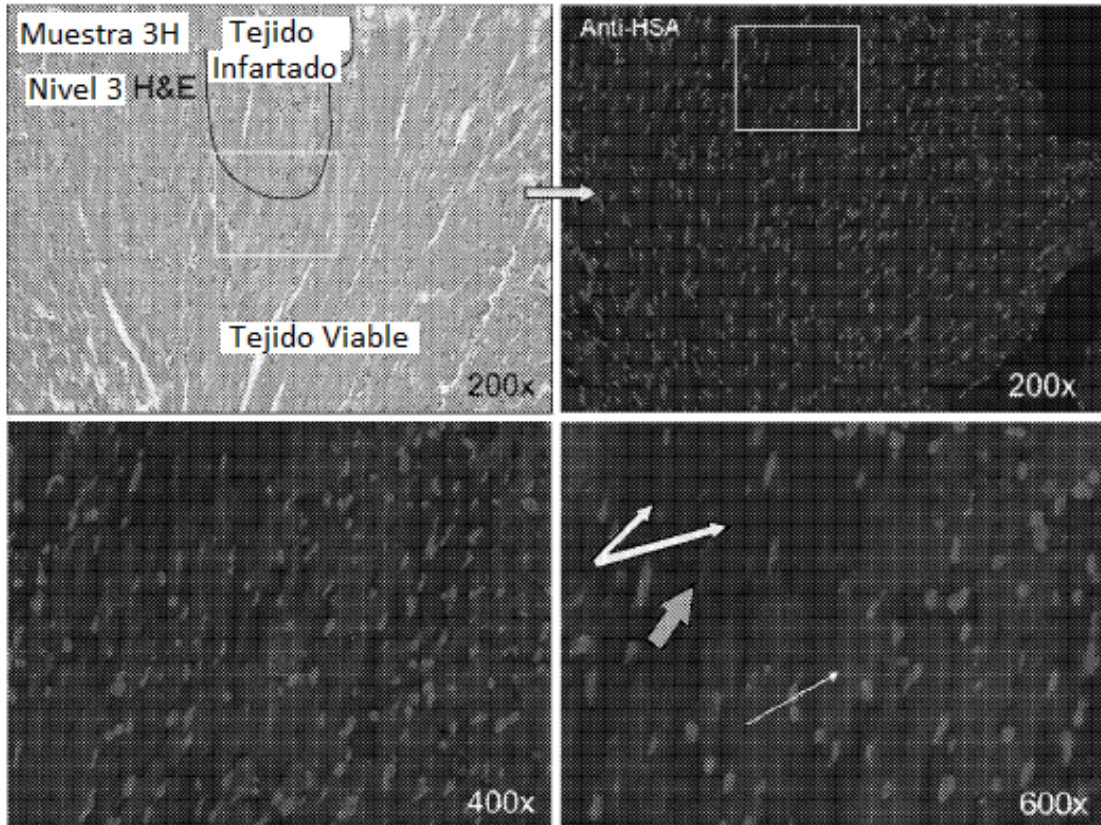


FIG. 31

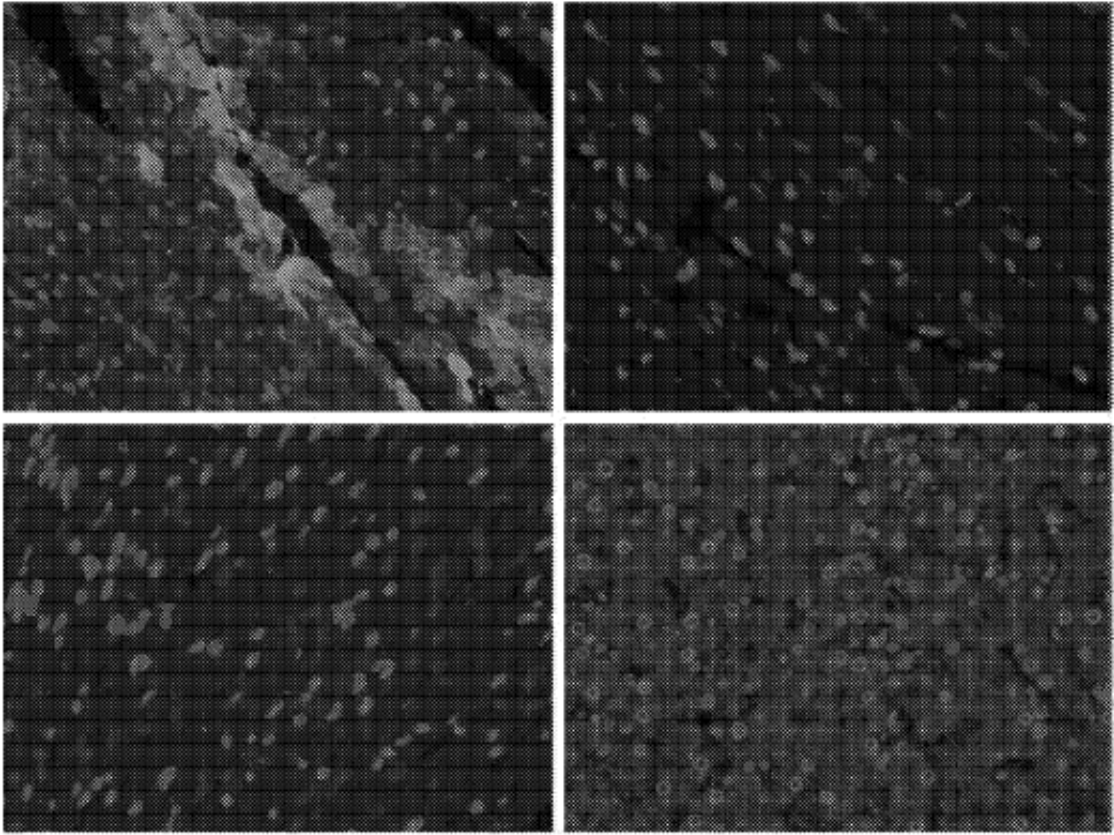


FIG. 32