(19) OFICINA ESPAÑOLA DE PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

(11) Número de publicación: **2 677 111**

(51) Int. Cl.:

C07K 16/28 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01)
A61K 47/68 (2007.01)
A61P 25/00 (2006.01)

(12) TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA T3

(86) Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **10.01.2013** **PCT/US2013/021041**

(87) Fecha y número de publicación internacional: **18.07.2013** **WO13106577**

(96) Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **10.01.2013** **E 13702529 (2)**

(97) Fecha y número de publicación de la concesión europea: **25.04.2018** **EP 2802606**

(54) Título: **Mejora del transporte de moléculas terapéuticas a través de la barrera hematoencefálica**

(30) Prioridad:

10.01.2012 US 201261585039 P

(45) Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
30.07.2018

(73) Titular/es:

BIOGEN MA INC. (100.0%)
225 Binney Street
Cambridge, MA 02142, US

(72) Inventor/es:

FARRINGTON, GRAHAM, K. y
SISK, WILLIAM

(74) Agente/Representante:

PONS ARIÑO, Ángel

ES 2 677 111 T3

Aviso: En el plazo de nueve meses a contar desde la fecha de publicación en el Boletín Europeo de Patentes, de la mención de concesión de la patente europea, cualquier persona podrá oponerse ante la Oficina Europea de Patentes a la patente concedida. La oposición deberá formularse por escrito y estar motivada; sólo se considerará como formulada una vez que se haya realizado el pago de la tasa de oposición (art. 99.1 del Convenio sobre Concesión de Patentes Europeas).

DESCRIPCIÓN

Mejora del transporte de moléculas terapéuticas a través de la barrera hematoencefálica

Antecedentes de la invención

La distribución de macromoléculas en todo el cuerpo generalmente está mediada por difusión con macromoléculas en la sangre que se difunden en los tejidos a través de revestimientos de células endoteliales altamente fenestradas de la vasculatura capilar. La difusión libre de macromoléculas no existe en el cerebro altamente vascularizado. Las células endoteliales capilares del cerebro carecen de las fenestraciones que se observan en el resto del sistema circulatorio y tienen uniones intracelulares altamente especializadas para células endoteliales. Estas uniones estrechas sirven para prevenir la difusión libre de moléculas de más de 400 kDa desde el lado luminal hasta el lado abluminal del capilar. Además, los capilares contienen varios sistemas transportadores tales como los transportadores de aniones orgánicos (OATS) y los sistemas de resistencia multifármaco (MDR) que establecen de manera activa gradientes de transporte de moléculas que de otra manera podrían difundirse a través de las células endoteliales. La combinación de barreras restrictivas impide la entrada de agentes adventicios, incluidas toxinas y virus, por ejemplo, y limita la difusión de entidades terapéuticas. Además, estas barreras hematoencefálicas (BHE) bloquean de manera efectiva la administración pasiva de proteínas, péptidos y pequeñas moléculas potencialmente terapéuticas en el parénquima cerebral a dosis farmacológicamente terapéuticas.

Una estrategia efectiva para lograr el transporte de moléculas terapéuticas a través de las células endoteliales de BHE ha sido aprovechar la transcitosis mediada por receptor (TMR). Esta estrategia utiliza anticuerpos o moléculas que se unen específicamente a proteínas en células endoteliales en la BHE que normalmente están involucradas en el transporte de moléculas a través de las células endoteliales de la BHE. Dichos anticuerpos se usan como moléculas transportadoras para administrar cargas útiles adheridas mientras experimentan transcitosis a través de las células endoteliales de la BHE. Los ejemplos de las aplicaciones de esta tecnología incluyen el uso de anticuerpos contra el receptor de transferrina y los receptores de insulina (Yu y col. 2011. Science Translational Medicine. Volumen 3). En estos dos casos, los anticuerpos para TMR se fusionaron C-terminalmente con dominios proteicos terapéuticos y se ha demostrado que transportan moléculas a través de la BHE. Desafortunadamente, las dianas de la TMR que se usan habitualmente, la transferrina y los receptores de insulina se expresan alta y ampliamente en numerosos tejidos. Esta amplia expresión de la diana da como resultado una semivida circulante corta, que a su vez limita el tiempo de exposición a las células endoteliales de la BHE y, por lo tanto, la dosificación de la molécula en el cerebro. Además, estos anticuerpos se dirigen a funciones celulares metabólicamente críticas, creando así un riesgo potencial de seguridad.

Los restos de direccionamiento mejorados que hacen uso de moléculas de transporte para BHE activas para cruzar la BHE, p.ej., sitios de unión derivados de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE, serían de gran beneficio para la administración de agentes terapéuticos en el cerebro.

Abulrob y col (International Congress Series, Excerpta Medica, 2005, vol. 1277: 212-223) describen el anticuerpo anti-TME30A de dominio único FC5 que es un conjugado químico con una proteína de fusión HRP-IgG, así como una proteína de fusión que comprende FC5 y restos de verotoxina.

Resumen de la invención

La materia en cuestión de la invención se define en las reivindicaciones. La invención se basa, al menos en parte, en el descubrimiento de que una proteína de fusión que comprende un anticuerpo que transmigra la barrera hematoencefálica (BHE), p. ej., se descubrió que un anticuerpo que se une a TMEM30A (CDC-50A) (como, p.ej., el anticuerpo de dominio único FC5) mejora en gran medida el transporte a través de la BHE en comparación con V_{HH} monovalente. Los experimentos de unión inicial y de transporte endotelial en la BHE mostraron que FC5, un anticuerpo de V_{HH} de dominio único de llama (sdAb), podría facilitar el transporte a través de una capa de células endoteliales de la BHE (véase, p.ej., la patente de los EE. UU. N.º 7,943,129). Se sabe que la semivida circulante de un V_{HH} es corta debido al bajo peso molecular y la falta de un dominio Fc (Jain, M., Kamal, N., y Batra, S. K. (2007) Trends in biotechnology 25(7), 307-316;Batra, S. K., Jain, M., Wittel, U. A., Chauhan, S. C., y Colcher, D. (2002) Current opinion in biotechnology 13(6), 603-608). Sorprendentemente, la semivida circulante de esta construcción se mejoró en gran medida fusionando un anticuerpo de dominio único que transmigra la BHE al extremo N-terminal de una Fc humana dando como resultado una construcción de tipo anticuerpo divalente. La incorporación de dicho sitio de unión en una construcción Fc crea una molécula divalente, con el potencial de unión divalente a cada resto de unión unido a la diana supuesta, por ejemplo, TMEM30A, expresada en la superficie celular. La unión divalente puede provocar un cambio significativo en la aparente afinidad de unión debido a un efecto de avidez (Reynolds, J.

A. (1979) Biochemistry 18(2), 264-269;Hubble, J. (1999) Molecular immunology 36(1), 13-18). Como se demuestra en el presente documento, la afinidad de la interacción se incrementó. Dado este aumento de afinidad, no se esperaba el descubrimiento de que la adición de Fc para formar una molécula divalente aumentaba significativamente el transporte a través de la BHE. El aumento del transporte no se esperaba porque, aunque la adición de un dominio Fc puede extender la farmacocinética en fase beta debido al aumento de la masa que previene la filtración renal de la molécula y la promoción del reciclado de anticuerpos in vivo mediante la unión a FcRn, el incremento aparente de afinidad podría también haber tenido el efecto opuesto debido a la eliminación de moléculas de unión circulantes al unirse a una diana altamente expresada. Más sorprendentemente, sin embargo, como se demuestra en este documento, se encontró que las proteínas de fusión en la conformación del sitio de unión-Fc (del extremo amino al carboxi, es decir, el sitio de unión fusionado al extremo N-terminal de Fc) tenían una actividad mayor que las de la formación del sitio de unión a Fc (sitio de unión fusionado al extremo C-terminal de Fc). Esto fue cierto a pesar del hecho de que las proteínas de fusión del sitio de unión a Fc (sitio de unión fusionado al extremo C-terminal de Fc) mostraron una unión incrementada a las células endoteliales en los experimentos iniciales realizados *in vitro*. También se proporcionan versiones homovalentes de las construcciones del sitio de unión-Fc.

Por consiguiente, en un aspecto, la divulgación proporciona una molécula de unión que comprende al menos un agente farmacológicamente activo y al menos un sitio de unión, por ejemplo, un sitio de unión de transmigración de la BHE, que se une a TMEM30A, en la que el al menos un sitio de unión que se une a TMEM30A se fusiona i) directamente o ii) mediante una secuencia de aminoácidos intermedia al extremo N-terminal de un resto Fc. La unión de la invención comprende al menos dos sitios de unión.

En un aspecto de la divulgación, el al menos un sitio de unión comprende la secuencia de aminoácidos FC5. En un aspecto de la divulgación, la molécula de unión comprende al menos dos o al menos tres (por ejemplo, dos o tres) sitios de unión que se unen a TMEM30A. En un aspecto de la divulgación, la molécula de unión comprende al menos tres o al menos cuatro (por ejemplo, tres o cuatro) sitios de unión que se unen a TMEM30A.

En un aspecto de la divulgación, el al menos un sitio de transmigración de la BHE (por ejemplo, un sitio de unión derivado de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE) está genéticamente fusionado directamente al resto Fc.

En un aspecto de la divulgación, el al menos un sitio de transmigración de la BHE (por ejemplo, un sitio de unión derivado de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE) está genéticamente fusionado al resto Fc mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende un conector peptídico.

En un aspecto de la divulgación, el al menos un sitio de transmigración de la BHE (por ejemplo, un sitio de unión derivado de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE) está genéticamente fusionado al resto Fc mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que consiste en un conector peptídico.

En un aspecto de la divulgación, dos sitios de transmigración de la BHE (p. ej., sitios de unión derivados de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE) se fusionan al extremo N-terminal de dos restos Fc diferentes de una región Fc completa mediante una secuencia de aminoácidos que comprende un conector peptídico.

En un aspecto de la divulgación, el al menos un sitio de transmigración de la BHE (por ejemplo, un sitio de unión derivado de moléculas de anticuerpo que transmigran a través de la BHE) está fusionado al extremo N-terminal de una molécula scFc.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo se fusiona con el extremo C-terminal de la región Fc.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo es una entidad química pequeña.

En una realización, la entidad química pequeña se fusiona a la molécula de unión en un residuo de cisteína. En una realización, el residuo de cisteína es un residuo de cisteína diseñado.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo es un polipéptido.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo comprende un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, un sitio de unión a antígeno derivado de un anticuerpo que no transmigra la BHE).

En una realización, el agente farmacológicamente activo se selecciona del grupo constituido por una molécula scFv, una molécula Fab y un anticuerpo de dominio único.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo está fusionado genéticamente a la molécula de unión.

En una realización, el al menos un agente farmacológicamente activo está unido covalentemente a la molécula de unión.

En un aspecto de la divulgación, el sitio de transmigración de la BHE está genéticamente fusionado mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende el dominio VH de una molécula de anticuerpo.

En un aspecto de la divulgación, el sitio de transmigración de la BHE está genéticamente fusionado mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende el dominio VL de una molécula de anticuerpo.

En un aspecto de la divulgación, al menos un sitio de transmigración de la BHE está genéticamente fusionado al extremo N-terminal de un dominio VH de una molécula de anticuerpo intacta.

En un aspecto de la divulgación, al menos un sitio de transmigración de la BHE está genéticamente fusionado al extremo N-terminal de un dominio VL de una molécula de anticuerpo intacta.

En un aspecto de la divulgación, dos sitios de transmigración de la BHE están genéticamente fusionados al extremo N-terminal de un dominio VH y un dominio VL de una molécula de anticuerpo intacta.

En una realización, la secuencia de aminoácidos intermedia comprende además un conector peptídico.

En una realización, el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo constituido por: un péptido neuroactivo, una pequeña entidad química y una región variable de un anticuerpo que se une a una diana en el sistema nervioso central.

En una realización, la invención se refiere a una molécula de unión de la invención para uso en un procedimiento para tratar un trastorno neurológico, que comprende administrar la molécula de unión de la invención a un sujeto.

En una realización, el trastorno neurológico es un trastorno de almacenamiento. En una realización, el trastorno neurológico es dolor crónico. En una realización, el trastorno neurológico es epilepsia. En una realización, el trastorno neurológico es esclerosis múltiple. En una realización, el trastorno neurológico es proteinopatía. En una realización, el trastorno neurológico es un trastorno desmielinizante.

En otra realización, la invención se refiere al uso de una molécula de unión de la invención en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de un trastorno neurológico.

Breve descripción de los dibujos

La Figura 1 muestra representaciones esquemáticas del anticuerpo de dominio único pesado FC5 (a) solo, (b) fusionado o bien N-terminalmente (FC5-Fc) o (c) C-terminalmente (Fc-FC5) a un dominio Fc de IgG1 humana y también como posibles construcciones similares a anticuerpos que incorporan como resto farmacéuticamente activo un dominio que no transmigra la BHE (d, e). Las moléculas (f) y (g) ilustran la adición de anticuerpo de dominio único pesado FC5 a una molécula de anticuerpo completa; el anticuerpo de dominio único pesado puede fusionarse, por ejemplo, al dominio VL o VH, o a ambos.

Figura 2. Se muestra la electroforesis de 2,5 µg de cada proteína purificada en un Bis-Tris SDS PAGE del 4 al 12 %. Los patrones de peso molecular en SDS PAGE de 10 a 220 kD están marcados en cada gel. En el Panel A se muestra FC5 sin agente reductor en el carril (1) y con agente reductor en el carril (2), en el Panel B FC5-Fc sin agente reductor en el carril (1) y con agente reductor en el carril (2), y en el Panel C Fc-FC5 sin agente reductor en el carril (1) y con agente reductor en el carril (2).

Figura 3. Muestra la mayor velocidad de transporte de FC5Fc, FcFC5 y FC5 a través de una línea de células endoteliales de BHE de rata transformada in vitro con SV40 en comparación con los anticuerpos de control 12F6A (hIgG1), CRL2434 (mIgG1) y C37H (V_{HH} solo).

Figura 4a-c. El panel 4 (a) muestra la unión de FC5-Fc (○), Fc-FC5 (■) o un camélido V_{HH} de control irrelevante fusionado en los extremos N-terminales de un dominio huFc agly (V_{HH}-Fc) (Δ) a una línea de células endoteliales de BHE de rata transformada con SV40. El panel (4b) muestra la unión de FC5-Fc (○) y Fc-FC5 (■) a una línea celular endotelial de BHE primaria de rata. El panel 4c muestra la unión de FC5-Fc a TMEM30A de rata (□) o de humano (◊) y de Fc-FC5 a TMEM30A de rata (▲) o de humano (●) expresado transitoriamente en células EBNA293.

Figura 5a-c. El Panel 5a muestra la capacidad de FC5 reticulado covalentemente a dalargina (FC5-Dal) de suprimir el dolor en el modelo animal de Hargreaves. La tasa de retirada de la pata se expresa como porcentaje del efecto máximo posible (% de EMP) en base a un marco de tiempo de 20 segundos. El control negativo muestra la tasa de retirada de la pata para la pata de control contralateral no inflamada (●) y el control positivo muestra la tasa de retirada rápida de la pata de la pata inflamada cuando a la rata se le inyecta IV solo PBS (○). La eficacia de una sola dosis IV (■) de FC5-Dal a 21 mg/Kg (mpk) se compara con tres dosis IV de FC5-Dal a 7 mpk (□) para suprimir la tasa de retirada de la pata en el animal de Hargreaves. El Panel 5b muestra el área promedio bajo la curva para el porcentaje de EMP de respuesta en función del tiempo para cada pata evaluada. El Panel 5c muestra experimentos de control negativo adicionales en los que las ratas se inyectan IV con tres dosis en el tiempo 0, 1 h y 2 h con 7 mpk de un V_{HH}-Dal irrelevante (cajas grises) o FC5 solo (cajas abiertas). También se muestra la pata de control contralateral (círculos cerrados). El porcentaje de EMP para la supresión de la tasa de retirada de la pata se determinó en el animal de Hargreaves.

Figura 6a-d. La eficacia de Fc-FC5-Dal se evaluó en el modelo de Hargreaves. Las ratas se dosificaron IV a 2 mpk a tiempo 0 en el Panel 6a y en el tiempo 0 y 2 h en el panel 6B. En los paneles 6C y 6D, se administraron IV a cada rata 6,5 mpk en el tiempo 0.

Figura 7a-d. La eficacia de FC5-Fc-Dal en el modelo de Hargreaves se comparó con un control negativo Fc-Dal. A las ratas se les administró IV en el tiempo 0 una concentración única de FC5-Fc-Dal o Fc-Dal a 0,5, 2,5 o 6,0 mpk. Los datos se presentan en los paneles 7a y 7b como el porcentaje del efecto máximo posible (EMP) en el momento dado o en los paneles 7c y 7d como el área porcentual bajo la curva.

Descripción detallada de la invención

Se encontró que una proteína de fusión que comprende al menos un anticuerpo de dominio único que transmigra la BHE, por ejemplo, que se une a TMEM30A (CDC-50A) (como un dominio único FC5) mejora en gran medida el transporte a través de la BHE en comparación con V_{HH} monovalente. En particular, la conformación del sitio de unión-Fc (del extremo amino al extremo carboxi) demostró actividad mejorada. Basado, al menos en parte, en este transporte significativamente aumentado, se describen en el presente documento las moléculas con transporte incrementado a través de la barrera hematoencefálica, los procedimientos para aumentar el transporte a través de la barrera hematoencefálica y los procedimientos de tratamiento que usan dichas moléculas.

Antes de una descripción adicional de la invención, por conveniencia, se describen ciertos términos a continuación:

I. Definiciones

Como se usa en la presente memoria, el término "proteína" o "polipéptido" se refiere a un polímero de dos o más de los aminoácidos naturales o aminoácidos no naturales.

El término "aminoácido" incluye alanina (Ala o A); arginina (Arg o R); asparagina (Asn o N); ácido aspártico (Asp o D); cisteína (Cys o C); glutamina (Gln o Q); ácido glutámico (Glu o E); glicina (Gly o G); histidina (His o H); isoleucina (Ile o I): leucina (Leu o L); lisina (Lys o K); metionina (Met o M); fenilalanina (Phe o F); prolina (Pro o P); serina (Ser o S); treonina (Thr o T); triptófano (Trp o W); tirosina (Tyr o Y); y valina (Val o V). Los aminoácidos no tradicionales también están dentro del alcance de la invención e incluyen norleucina, omitina, norvalina, homoserina y otros análogos de residuos de aminoácidos tales como los descritos enEllman y col. Meth. Enzym. 202:301-336 (1991). Para generar dichos residuos de aminoácidos no naturales, se pueden usar los procedimientos deNoren y col. Science 244:182 (1989) y Ellman y col.,supra. En resumen, estos procedimientos implican activar químicamente un ARNt supresor con un residuo de aminoácido no natural seguido de transcripción y traducción *in vitro* del ARN. La introducción del aminoácido no tradicional también puede lograrse usando químicas de péptidos conocidas en la técnica. Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido polar" incluye aminoácidos que tienen carga neta cero, pero tienen cargas parciales distintas de cero en diferentes partes de sus cadenas laterales (por ejemplo, M, F, W, S, Y, N, Q, C). Estos aminoácidos pueden participar en interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas. Como se usa en la presente memoria, el término "aminoácido cargado" incluye aminoácidos que pueden tener una carga neta diferente de cero en sus cadenas laterales (por ejemplo, R, K, H, E, D). Estos

aminoácidos pueden participar en interacciones hidrofóbicas e interacciones electrostáticas.

Como se usa en la presente memoria, el término "péptido conector" se refiere a secuencias de aminoácidos que conectan o unen dos secuencias polipeptídicas, p. ej., que unen dos dominios polipeptídicos, cuyas secuencias de aminoácidos no conectan o unen los dos dominios polipeptídicos de forma natural en la naturaleza. En una realización, un péptido conector es sintético. Como se usa en la presente memoria, el término "sintético" se refiere a secuencias de aminoácidos que no son de origen natural.

Los péptidos conectores de la invención conectan dos secuencias de aminoácidos mediante enlaces peptídicos. En una realización, un péptido conector conecta un resto que transmigra la BHE a un segundo resto, por ejemplo, un dominio o región de un resto Fc. En una realización, un péptido conector de la invención conecta un resto farmacológicamente activo con un segundo resto en una secuencia lineal, por ejemplo, un segundo resto que es un resto que transmigra la BHE o un dominio o región de un resto Fc. En otra realización, un péptido conector conecta dos restos farmacológicamente activos. En una realización, un péptido conector conecta o fusiona genéticamente uno o más dominios Fc o regiones a un resto no Fc.

En el contexto de polipéptidos, una "secuencia lineal" o una "secuencia" es el orden de los aminoácidos en un polipéptido en una dirección amino a carboxilo terminal en la que los residuos que se encuentran en la secuencia son contiguos en la estructura primaria del polipéptido.

Como se usa en el presente documento, los términos "unido", "fusionado" o "fusión" se usan indistintamente. Estos términos se refieren a la unión de dos o más elementos o componentes, por cualquier medio, incluida la conjugación química o medios recombinantes. Como se usa en el presente documento, la expresión "fusionado de forma covalente" o "acoplado de forma covalente" significa que los restos especificados están unidos de forma covalente directamente entre sí, o si no, están unidos de forma covalente indirectamente entre sí por medio de un resto o restos intermedios, tales como un péptido o resto que actúan de unión. En una realización preferida, los restos se fusionan de forma covalente. Un tipo de enlace covalente es un enlace peptídico. Los procedimientos de conjugación química (por ejemplo, mediante agentes de reticulación heterobifuncionales) son conocidos en la técnica. Los restos fusionados también pueden estar fusionados genéticamente. Como se usa en el presente documento, el término "fusionado genéticamente", "unido genéticamente" o "fusión genética" se refiere al enlace colinear y covalente o unión de dos o más proteínas, polipéptidos o fragmentos de los mismos a través de sus cadenas peptídicas individuales, a través de expresión genética de una sola molécula de polinucleótido que codifica esas proteínas, polipéptidos o fragmentos. Dicha fusión genética da como resultado la expresión de una única secuencia genética contigua. Las fusiones genéticas preferidas están en fase, es decir, dos o más marcos de lectura abiertos (ORF) se fusionan para formar un ORF continuo más largo, de una manera que mantiene el marco de lectura correcto de los ORF originales. De este modo, la proteína de fusión recombinante resultante es un único polipéptido que contiene dos o más segmentos de proteína que corresponden a polipéptidos codificados por los ORF originales (cuyos segmentos normalmente no están tan unidos en la naturaleza). En este caso, el único polipéptido se escinde durante el procesamiento para producir moléculas diméricas que comprenden dos cadenas polipeptídicas.

Los polipéptidos sujeto comprenden al menos un resto farmacológicamente activo. Un resto farmacológicamente activo se refiere a un resto capaz de realizar una acción o una reacción en un contexto biológico. Por ejemplo, el término "resto farmacológicamente activo" se refiere a moléculas farmacológicamente activas o partes de las mismas que se unen a componentes de un sistema biológico (por ejemplo, proteínas en fluidos biológicos o en la superficie de células o en la matriz celular) y cuya unión da como resultado una efecto biológico (por ejemplo, medido por un cambio en el resto activo y/o el componente al que se une (por ejemplo, una escisión del resto activo y/o del componente al que se une, la transmisión de una señal, o el aumento o inhibición de una respuesta biológica en una célula o en un sujeto)). Los restos farmacéuticamente activos preferidos son restos terapéuticos.

Los ejemplos de restos farmacológicamente activos pueden comprender, por ejemplo, un fármaco, un fragmento de unión a antígeno de una molécula de anticuerpo o una parte del mismo (por ejemplo, F(ab), scFv, un dominio VH o un dominio VL) (p. ej., transmitir, inducir o bloquear una respuesta biológica), una porción de unión a ligando de un receptor o una porción de unión a receptor de un ligando, una enzima, etc. En una realización, un resto farmacológicamente activo comprende la forma madura de una proteína. En otra realización, un resto farmacológicamente activo comprende una parte de una proteína de longitud completa que retiene actividad biológica. Otros ejemplos de restos farmacológicamente activos incluyen aminoácidos, péptidos, proteínas, ácidos nucleicos terapéuticamente útiles, que incluyen, pero no se limitan a, polinucleótidos, oligonucleótidos, carbohidratos y lípidos. Los ejemplos de restos farmacológicamente activos de la presente invención incluyen factores neurotróficos, factores de crecimiento, enzimas, anticuerpos, neurotransmisores, neuromoduladores, antibióticos,

agentes antivirales, agentes antifúngicos, agentes para la formación de imágenes médicas o detectables, isótopos y agentes quimioterapéuticos y similares. Los restos farmacológicamente activos de la presente invención también incluyen fármacos, profármacos y precursores que pueden activarse cuando el agente terapéutico se administra al tejido diana. El término "restos farmacológicamente activos" no pretende incluir un resto que transmigra la BHE. Los agentes farmacológicamente activos son restos que no transmigran la BHE.

Las moléculas de unión de la invención son proteínas "quiméricas" o "de fusión". Dichas proteínas comprenden una primera secuencia de aminoácidos unida a una segunda secuencia de aminoácidos a la que no está unida de forma natural en la naturaleza. Las secuencias de aminoácidos pueden existir normalmente en proteínas separadas que se juntan en el polipéptido de fusión o pueden existir normalmente en la misma proteína pero se sitúan en una nueva disposición en el polipéptido de fusión. Se puede crear una proteína quimérica mediante procedimientos bien conocidos en la técnica, por ejemplo, mediante síntesis química, o creando y traduciendo un polinucleótido en el que las regiones peptídicas están codificadas en la relación deseada.

Los polipéptidos de la divulgación son moléculas de unión, es decir, que comprenden dominios de unión o sitios de unión derivados de anticuerpos que transmigran la BHE. Un anticuerpo que transmigra la BHE facilita la transmigración a través de la BHE de un resto unido al mismo. Ejemplos de los sitios de unión a anticuerpos que transmigran la BHE se describen en la patente de los EE. UU. N.º 7,943,129. En un aspecto, un anticuerpo que transmigra la BHE se une a TMEM30A.
Los términos "dominio de unión" o "sitio de unión", como se usan en la presente memoria, se refieren a la parte, región o sitio del polipéptido que media la unión específica con una molécula diana (por ejemplo, un sitio de unión a TMEM30A u otro sitio que facilita la transmigración de la BHE). Los ejemplos de dominios de unión incluyen un sitio de unión a antígeno (por ejemplo, un dominio VH y/o VL) o moléculas que comprenden dicho sitio de unión (por ejemplo, un anticuerpo o un anticuerpo de dominio único).

Los polipéptidos de la divulgación son monovalentes o multivalentes con respecto al resto que transmigra la BHE, por ejemplo, comprenden al menos 1, 2, 3, 4, 5 o más restos que transmigran la BHE,.

Los restos farmacológicamente activos como se describen en el presente documento también pueden incluir dominios de unión o sitios de unión, por ejemplo, derivados de una molécula de anticuerpo (por ejemplo, un dominio VH y/o VL de un anticuerpo que no transmigra a través de la BHE), moléculas que comprenden dicho sitio de unión (por ejemplo, un anticuerpo o anticuerpo de dominio único), un dominio de unión a receptor de un ligando, un dominio de unión a ligando de un receptor o un dominio catalítico. El término "dominio de unión a ligando" como se usa en el presente documento se refiere a un receptor nativo (por ejemplo, receptor de superficie celular) o una región o derivado del mismo que retiene al menos una capacidad de unión de ligando cualitativa, y preferentemente la actividad biológica del receptor nativo correspondiente. El término "dominio de unión a receptor" como se usa en el presente documento se refiere a un ligando nativo o una región o derivado del mismo que retiene al menos una capacidad de unión al receptor cualitativa, y preferentemente la actividad biológica del ligando nativo correspondiente.

En una realización, los polipéptidos de la invención son anticuerpos modificados. Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo modificado" incluye formas sintéticas de anticuerpos que están alterados de tal manera que no son de origen natural, por ejemplo, anticuerpos que comprenden al menos dos porciones de cadena pesada pero no dos cadenas pesadas completas (tales como anticuerpos con dominios eliminados o minicuerpos); formas multiespecíficas de anticuerpos (por ejemplo, biespecíficos, triespecíficos, etc.) alterados para unirse a dos o más antígenos diferentes, p. ej., a TMEM30A y un sitio de unión diana terapéuticamente relevante) unidos a restos Fc, dominios, regiones o regiones scFc.

Como se usa en el presente documento, el término "región Fc" se definirá como la parte de un polipéptido que corresponde a la región Fc de la inmunoglobulina nativa, es decir, como se forma por la asociación dimérica de los respectivos dominios Fc (o restos Fc) de sus dos cadenas pesadas. Una región Fc nativa es homodimérica y comprende dos cadenas polipeptídicas. Por el contrario, el término "región Fc fusionada genéticamente" o "región Fc monocatenaria" (región scFc), como se usa en el presente documento, se refiere a una región Fc sintética dimérica compuesta de dominios Fc (o restos Fc) genéticamente unidos dentro de una única cadena polipeptídica (es decir, codificada en una única secuencia genética contigua) como se describe, por ejemplo, en la solicitud estadounidense N.º 20110243966. En un aspecto, cuando se usa una región scFc, la molécula de unión es monovalente con respecto al resto que transmigra la BHE.

Como se usa en el presente documento, el término "dominio Fc" se refiere a la parte de una única cadena pesada de inmunoglobulina que comienza en la región de bisagra justo cadena arriba del sitio de escisión de papaína (es decir,

el residuo 216 en IgG, tomando el primer resto de la región constante de cadena pesada como 114) y termina en el extremo C-terminal del anticuerpo. Por consiguiente, un dominio Fc completo comprende al menos un dominio de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3. Como se usa en la presente memoria, el término "región Fc" se refiere a dominios Fc dimerizados que se asemejan a la región Fc de anticuerpos nativos (por ejemplo, ya sea en el formato tradicional de dos cadenas polipeptídicas o como una región Fc de cadena única).

Como se usa en la presente memoria, el término "parte del dominio Fc" o "resto Fc" incluye una secuencia de aminoácidos de un dominio Fc o derivada de un dominio Fc. En ciertos aspectos, un resto Fc comprende al menos una de las siguientes opciones: un dominio de bisagra (por ejemplo, región bisagra superior, media y/o inferior), un dominio CH2, un dominio CH3, un dominio CH4, o una variante, parte o fragmento de los mismos. En otras realizaciones, un resto Fc comprende un dominio Fc completo (es decir, un dominio de bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3). En un aspecto, un resto Fc comprende un dominio de bisagra (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una parte del mismo). En otra realización, un resto Fc comprende un dominio CH2 (o una parte del mismo) fusionado a un dominio CH3 (o una parte del mismo). En otro aspecto, un resto Fc consiste en un dominio CH3 o una parte del mismo. En otro aspecto, un resto Fc consiste en un dominio de bisagra (o una parte del mismo) y un dominio CH3 (o una parte del mismo). En otro aspecto, un resto Fc consiste en un dominio CH2 (o una parte del mismo) y un dominio CH3 (o una parte del mismo). En otro aspecto, un resto Fc consiste en un dominio de bisagra (o una parte del mismo) y un dominio CH2 (o una parte del mismo). En un aspecto, un resto Fc carece de al menos una parte de un dominio CH2 (por ejemplo, todo o parte de un dominio CH2).

En una realización, una molécula de unión de la invención comprende una región Fc completa, o bien puede estar presente como una cadena polipeptídica (una molécula scFc) o en forma de tipo salvaje como dos cadenas polipeptídicas.

Específicamente unido se refiere a dos moléculas que forman un complejo que es relativamente estable en condiciones fisiológicas. La unión específica se caracteriza por una alta afinidad y una capacidad baja a moderada a diferencia de la unión inespecífica que generalmente tiene una baja afinidad con una capacidad de moderada a alta. Normalmente, la unión se considera específica cuando la constante de afinidad KA es superior a 10^6M^{-1}, o más preferiblemente superior a 10^8M^{-1}. Si es necesario, la unión no específica se puede reducir sin afectar sustancialmente a la unión específica variando las condiciones de unión. Las condiciones de unión apropiadas tales como concentración de las moléculas, fuerza iónica de la solución, temperatura, tiempo permitido para la unión, concentración de un agente bloqueante (por ejemplo, albúmina sérica, caseína de leche), etc., pueden ser optimizadas por un experto en la técnica mediante técnicas rutinarias. Un resto Fc de la invención comprende al menos la parte de una molécula de Fc conocida en la técnica que se requiere para la unión a FcRn, denominada en la presente memoria compañero de unión del receptor neonatal (FcRn). Un compañero de unión a FcRn es una molécula o una porción de la misma al que se puede unir específicamente el receptor FcRn con el consiguiente transporte activo por el receptor FcRn del compañero de unión a FcRn.

Los compañeros de unión a FcRn de la presente invención abarcan moléculas a las que se puede unir específicamente el receptor de FcRn e incluyen IgG completa, el fragmento de Fc de IgG y otros fragmentos que incluyen la región de unión completa del receptor de FcRn. En otra realización, un dominio o región del resto Fc de una molécula de unión de la invención se modifica de manera que muestra una unión reducida o mínima a FcRn. La región de la porción Fc de IgG que se une al receptor FcRn se ha descrito basándose en cristalografía de rayos X (Burmeister y col. 1994, Nature 372:379). El área de contacto principal del Fc con el FcRn está cerca de la unión de los dominios CH2 y CH3. Los contactos Fc-FcRn están todos dentro de una sola cadena pesada de Ig. Los compañeros de unión a FcRn incluyen IgG completa, el fragmento Fc de IgG, y otros fragmentos de IgG que incluyen la región de unión completa de FcRn. Los principales sitios de contacto incluyen los residuos de aminoácidos 248, 250-257, 272, 285, 288, 290-291, 308-311, y 314 del dominio CH2 y los residuos de aminoácidos 385-387, 428, y 433-436 del dominio CH3. Las referencias a la numeración de aminoácidos de inmunoglobulinas o fragmentos de inmunoglobulinas, o regiones, se basan en Kabat y col. 1991, Sequences of Proteins of Immunological Interest, U.S. Department of Public Health, Bethesda, Md.

La región Fc de IgG puede modificarse de acuerdo con procedimientos bien reconocidos tales como mutagénesis de sitio dirigido, y similares, para producir fragmentos modificados de IgG o Fc o porciones de los mismos, que se unirán por FcRn. Dichas modificaciones incluyen modificaciones alejadas de los sitios de contacto de FcRn, así como modificaciones dentro de los sitios de contacto que preservan o incluso mejoran la unión a FcRn. Por ejemplo, los siguientes residuos de aminoácidos individuales en Fc de IgG1 humano (Fc γ1) pueden sustituirse sin pérdida significativa de afinidad de unión a Fc por FcRn: P238A, S239A, K246A, K248A, D249A, M252A, T256A, E258A, T260A, D265A, S267A, H268A, E269A, D270A, E272A, L274A, N276A, Y278A, D280A, V282A, E283A, H285A, N286A, T289A, K290A, R292A, E293A, E294A, Q295A, Y296F, N297A, S298A, Y300F, R301A, V303A, V305A,

T307A, L309A, Q311A, D312A, N315A, K317A, E318A, K320A, K322A, S324A, K326A, A327Q, P329A, A330Q, P331A, E333A, K334A, T335A, S337A, K338A, K340A, Q342A, R344A, E345A, Q347A, R355A, E356A, M358A, T359A, K360A, N361A, Q362A, Y373A, S375A, D376A, A378Q, E380A, E382A, S383A, N384A, Q386A, E388A, N389A, N390A, Y391F, K392A, L398A, S400A, D401A, D413A, K414A, R416A, Q418A, Q419A, N421A, V422A, S424A, E430A, N434A, T437A, Q438A, K439A, S440A, S444A, y K447A, donde, por ejemplo, P238A representa la prolina de tipo salvaje sustituida por alanina en la posición número 238.

Algunas de las mutaciones anteriores pueden conferir nuevas funcionalidades al resto de Fc. Por ejemplo, una realización incorpora N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. El efecto de esta mutación es reducir la glucosilación, lo que reduce la función efectora y/o la inmunogenicidad. Como ejemplo adicional de la nueva funcionalidad que surge a partir de las mutaciones descritas anteriormente, la afinidad por FcRn puede aumentar en algunos casos más allá de la de tipo salvaje. Esta afinidad aumentada puede reflejar un aumento de la frecuencia "activada", una disminución de la frecuencia "inactiva" o tanto un aumento de la frecuencia "activada" como una disminución de la frecuencia "inactiva". Las mutaciones que se cree que proporcionan una mayor afinidad por FcRn incluyen T256A, T307A, E380A, y N434A (Shields y col. 2001, J. Biol. Chem. 276:6591).

En una realización, el compañero de unión a FcRn es un polipéptido que incluye la secuencia PKNSSMISNTP (SEQ ID NO:) y opcionalmente además incluye una secuencia seleccionada de entre HQSLGTQ (SEQ ID NO:), HQNLSDGK (SEQ ID NO:), HQNISDGK (SEQ ID NO:), o VISSHLGQ (SEQ ID NO:) (patente estadounidense Nº. 5,739,277).

Los expertos en la técnica estarán familiarizados con muchos otros mutantes Fc o análogos de los mismos que exhiben una función efectora alterada y/o unión a FcRn. Además, los medios para modificar químicamente regiones constantes de inmunoglobulina (por ejemplo, pegiladas), o fragmentos de las mismas (véase, p.ej.,Aslam y Dent 1998, Bioconjugation: Protein Coupling Techniques For the Biomedical Sciences Macmilan Reference, London) se conocen bien en la técnica, por ejemplo, en lasolicitud estadounidense N.º 20120003210.

En una realización, un resto Fc se aglicosila mediante procedimientos conocidos en la técnica, por ejemplo, mutando residuos que normalmente están glicosilados o alterando la expresión del polipéptido de manera que no se produce la glicosilación. Por ejemplo, una realización específica, incorpora la mutación N297A, que elimina un sitio de N-glicosilación altamente conservado. En otra realización, un resto Fc incorpora una mutación en la posición 299, por ejemplo, una mutación T299 a otro aminoácido como se describe enen la patente de EE. UU. N.º 7,863,419. Además de alanina, otros aminoácidos se pueden sustituir por los aminoácidos de tipo salvaje en las posiciones especificadas anteriormente o conocidas en la técnica para reducir la función Fc.

En otra realización, las mutaciones descritas en Armour, K.L., Clark, M.R., Hadley, A.G. y Williamson L.M. (1999), Eur J Immunol 29: 2613-2624 se pueden introducir en las moléculas de unión sujeto.

Las mutaciones pueden introducirse individualmente en Fc dando lugar a más de cien restos de Fc distintos del Fc nativo. Además, las combinaciones de dos, tres o más de estas mutaciones individuales se pueden introducir juntas, dando lugar a cientos de regiones Fc potenciales adicionales. Además, uno de los restos Fc de una construcción de la invención puede estar mutado y el otro resto Fc no estar mutado, o ambos pueden estar mutados pero con diferentes mutaciones.

También se contemplan miméticos peptídicos de al menos una parte de una región constante de inmunoglobulina, por ejemplo, un mimético peptídico de un fragmento Fc o un mimético peptídico de un compañero de unión a FcRn. En un aspecto, el mimético peptídico se identifica mediante la técnica de expresión en fago o mediante el cribado de bibliotecas químicas (véase p.ej.,McCafferty y col. 1990, Nature 348:552,Kang y col. 1991, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4363;EP 0 589 877 B1).

En otro aspecto, una región Fc de la invención (por ejemplo, una región scFc) comprende al menos la parte de una molécula Fc conocida en la técnica porque se la requiere para la unión a FcγR.

En otro aspecto, una región Fc de la invención (por ejemplo, una región scFc) comprende al menos la parte de una molécula Fc conocida en la técnica porque se la requiere para la unión a proteína A. En otro aspecto, una región Fc de la invención (por ejemplo, una región scFc) comprende al menos la parte de una molécula Fc conocida en la técnica porque se la requiere para la unión a proteína G. En un aspecto, dicha molécula no se une a FcRn.

Tal y como se describe en el presente documento, un experto habitual en la materia entenderá que un dominio Fc también puede modificarse incluyendo uno o más cambios de aminoácidos (sustituciones, adiciones o deleciones)

de manera que varíe en la secuencia de aminoácidos de un resto Fc de tipo silvestre. Muchos de estos cambios o alteraciones son conocidos en la técnica. En ciertas realizaciones ejemplares, el resto Fc conserva una función efectora (por ejemplo, unión a FcyR) y en ciertas realizaciones, el resto Fc carece o tiene una función efectora reducida.

Los dominios Fc o restos de un polipéptido de la invención pueden ser de cualquier isotipo (A, E, G o M) y pueden derivarse de diferentes moléculas de inmunoglobulina. Por ejemplo, un dominio Fc o resto de un polipéptido puede comprender un dominio CH2 y/o CH3 derivado de una molécula IgG1 y una región bisagra derivada de una molécula IgG3. En otro ejemplo, un dominio o resto Fc puede comprender una región bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG3. En otro ejemplo, un dominio o resto Fc puede comprender una bisagra quimérica derivada, en parte, de una molécula de IgG1 y, en parte, de una molécula de IgG4.

Los polipéptidos que comprenden los péptidos conectores de la invención pueden prepararse usando técnicas que son conocidas en la técnica. En una realización, los polipéptidos de la invención se producen de "manera recombinante", es decir, se producen usando tecnología de ADN recombinante. Las técnicas a modo de ejemplo para fabricar los polipéptidos de la invención se exponen con más detalle en el presente documento.

Como se usa en el presente documento, el término "vehículo farmacéuticamente aceptable" significa una composición o compuesto químico con el que se puede combinar un ingrediente activo y que, después de la combinación, se puede usar para administrar el ingrediente activo a un sujeto. Como se usa en la presente memoria, el término éster o sal "fisiológicamente aceptable" significa un éster o forma de sal del ingrediente activo que es compatible con cualquier otro ingrediente de la composición farmacéutica, que no sea nocivo para el sujeto al que se administrará la composición. Como se usa en la presente memoria, "vehículo farmacéuticamente aceptable" también incluye, pero no se limita a, uno o más de las siguientes opciones: excipientes; agentes tensioactivos; agentes dispersantes; diluyentes inertes; agentes de granulación y desintegración; agentes de unión; agentes lubricantes; agentes edulcorantes; agentes aromatizantes; agentes colorantes; conservantes; composiciones fisiológicamente degradables tales como gelatina; vehículos acuosos y solventes; vehículos y solventes aceitosos; agentes de suspensión; agentes dispersantes o humectantes; agentes emulsionantes, demulcentes; tampones; sales; agentes espesantes; materiales de relleno; agentes emulsionantes; antioxidantes; agentes estabilizantes; y materiales poliméricos o hidrófobos farmacéuticamente aceptables. Otros "ingredientes adicionales" que pueden incluirse en las composiciones farmacéuticas de la invención son conocidos en la técnica y se describen, por ejemplo, enGenaro, ed., 1985, Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co., Easton, Pa. Como se usa en el presente documento, "una cantidad efectiva" es una cantidad suficiente para producir una respuesta terapéutica.

Como se usa en el presente documento, el término "proteinopatía" se refiere a trastornos caracterizados por proteínas plegadas incorrectamente o proteínas agregadas y esos trastornos tienen un componente genético.

II. Anticuerpos que transmigran la BHE

En un aspecto, un resto que transmigra la BHE es como se describe en la patente de los EE. UU. N.º. 7,943,129. Por ejemplo, en una realización, un resto que transmigra la BHE comprende una secuencia de aminoácidos expuesta en una secuencia seleccionada del grupo que constituido por: SEQ ID NO:85 (FC5), SEQ ID NO:86 (FC44), and SEQ ID NO:87 (FC7) tal como se expone en la patente de los EE. UU. N.º 7,943,129. En una realización, un resto que transmigra la BHE es un resto FC5. FC5 es un anticuerpo de cadena pesada (HCA, también conocido como anticuerpo de dos cadenas, de dos cadenas pesadas, V_{HH} o anticuerpo de dominio único) derivado de un camélido. En comparación con las inmunoglobulinas convencionales de cuatro cadenas de tipo IgG, que también son producidas por los camélidos, estos anticuerpos carecen de las cadenas ligeras y los dominios CH1 de las inmunoglobulinas convencionales. Una de las características principales de estos anticuerpos de cadena pesada de origen natural es la presencia predominante de Glu, Arg y Gly que se sitúan en el interfaz VL 44, 45 y 47 (numeración de Kabat), respectivamente, de su dominio variable (denominado V_{HH}). Las mismas posiciones en el dominio variable de la cadena pesada de anticuerpos de cuatro cadenas convencionales (denominadas VH) están ocupadas casi exclusivamente por Gly, Leu y Trp. Se cree que estas diferencias son responsables de la alta solubilidad y estabilidad del dominio variable HCA (V_{HH}) de camélidos, en comparación con la insolubilidad relativa del dominio VH de los anticuerpos convencionales de cuatro cadenas. Otras dos características clave de los dominios V_{HH} de los camélidos son su CDR3 comparativamente más larga y la alta incidencia de pares de cisteína en las CDR. Parece que los pares de cisteína median en la formación de un puente disulfuro y, por lo tanto, están implicados en la modulación de la topología superficial del sitio de combinación del anticuerpo. En la estructura cristalina de un complejo sdAb-lisozima de camello, un bucle rígido que sobresale del sdAb y que está parcialmente estabilizado por un enlace disulfuro de la CDR se extiende fuera del sitio de combinación y penetra profundamente

en el sitio activo de la lisozima (Desmyter y col., Nature Struct. Biol., 3, 803-811 (1996)).

En un aspecto, un anticuerpo que transmigra la BHE se une a TMEM30A (C6orf67, CDC50A). Los restos ejemplares que se unen a TMEM30A son conocidos o pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que comprende la secuencia de aminoácidos de TMEM30A o una parte de la misma se puede usar para producir anticuerpos que reconocen específicamente la secuencia de aminoácidos TMEM30A o para seleccionar restos de unión que se unen específicamente a TMEM30A de una biblioteca de sitios de unión. Los sitios de unión de dichos anticuerpos o derivados de bibliotecas se pueden usar en una molécula de unión de la invención. La secuencia de aminoácidos de TMEM30A se muestra a continuación:

```
10         20         30         40         50         60
MAMNYNAKDE VDGGPPCAPG GTAKTRRPDN TAFKQQRLPA WQPILTAGTV LPIFFIIGLI

        70         80         90        100        110        120
FIPIGIGIFV TSNNIREIEI DYTGTEPSSP CNKCLSPDVT PCFCTINFTL EKSFEGNVFM

       130        140        150        160        170        180
YYGLSNFYQN HRRYVKSRDD SQLNGDSSAL LNPSKECEPY RRNEDKPIAP CGAIANSMFN

       190        200        210        220        230        240
DTLELFLIGN DSYPIPIALK KKGIAWWTDK NVKFRNPPGG DNLEERFKGT TKPVNWLKPV

       250        260        270        280        290        300
YMLDSDPDNN GFINEDFIVW MRTAALPTFR KLYRLIERKS DLHPTLPAGR YSLNVTYNYP

       310        320        330        340        350        360
VHYFDGRKRM ILSTISWMGG KNPFLGIAYI AVGSISFLLG VVLLVINHKY RNSSNTADIT
```

Los polipéptidos de la invención pueden comprender una región variable o parte de la misma (por ejemplo, un dominio VL y/o VH) derivada de un anticuerpo que se une a TMEM30A usando protocolos reconocidos en la técnica. Por ejemplo, el dominio variable puede derivarse de un anticuerpo producido en un mamífero no humano, por ejemplo, murino, cobaya, primate, conejo o rata, mediante inmunización del mamífero con el antígeno o un fragmento del mismo. Véase Harlow y Lane, supra. La inmunoglobulina puede generarse mediante múltiples inyecciones subcutáneas o intraperitoneales del antígeno relevante (por ejemplo, antígenos purificados asociados a tumores o células o extractos celulares que comprenden tales antígenos) y un adyuvante. Esta inmunización normalmente provoca una respuesta inmune que comprende la producción de anticuerpos reactivos contra antígenos a partir de esplenocitos o linfocitos activados.

Si bien la región variable puede derivarse de anticuerpos policlonales cosechados a partir del suero de un mamífero inmunizado, a menudo es deseable aislar linfocitos individuales del bazo, de los nódulos linfáticos o de la sangre periférica para proporcionar preparaciones homogéneas de anticuerpos monoclonales (MAb) a partir de los cuales se deriva la región variable deseada. Para producir anticuerpos policlonales, normalmente se usan conejos o conejillos de indias. Para producir anticuerpos monoclonales, se usan normalmente ratones. Los anticuerpos monoclonales se pueden preparar contra un fragmento inyectando un fragmento de antígeno en un ratón, preparando "hibridomas" y seleccionando los hibridomas para un anticuerpo que se une específicamente al antígeno. En este procedimiento ya conocido en la técnica (Kohler y col., (1975), Nature, 256:495) los linfocitos relativamente efímeros o mortales del ratón que se han inyectado con el antígeno se fusionan con una línea celular tumoral inmortal (por ejemplo, una línea celular de mieloma), produciendo así células híbridas o "hibridomas" que son inmortales y capaces de producir el anticuerpo genéticamente codificado por la célula B. Los híbridos resultantes se segregan en cepas genéticas individuales por selección, dilución y recrecimiento con cada cepa individual que comprende genes específicos para la formación de un único anticuerpo. Producen anticuerpos que son homogéneos contra un antígeno deseado y, en referencia a su origen genético puro, se denominan "monoclonales".

Las células de hibridoma preparadas de esa manera se pueden sembrar y cultivar en un medio de cultivo adecuado que preferentemente contiene una o más sustancias que inhiben el crecimiento o la supervivencia de las células de mieloma parentales no fusionadas. Los expertos en la técnica apreciarán que los reactivos, las líneas celulares y los medios para la formación, selección y crecimiento de hibridomas están disponibles en el mercado a partir de varias fuentes y que los protocolos estandarizados están bien establecidos. Generalmente, el medio de cultivo en el que se cultivan las células de hibridoma se somete a ensayo para la producción de anticuerpos monoclonales contra el

antígeno deseado. Preferentemente, la especificidad de unión de los anticuerpos monoclonales producidos por células de hibridoma se determina mediante inmunoprecipitación o mediante un ensayo in vitro, tal como un radioinmunoensayo (RIA) o un ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA). Después de identificar las células de hibridoma que producen anticuerpos de la especificidad, afinidad y/o actividad deseadas, los clones se pueden subclonar mediante procedimientos de dilución limitante y cultivar mediante procedimientos estándar (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, págs. 59-103 (Academic Press, 1986)). Se apreciará además que los anticuerpos monoclonales secretados por los subclones se pueden separar del medio de cultivo, fluido de ascitis o suero mediante procedimientos de purificación convencionales tales como, por ejemplo, cromatografía de afinidad (por ejemplo, cromatografía de afinidad con proteína A, proteína G o proteína L), cromatografía de hidroxiapatita, electroforesis en gel o diálisis.

Opcionalmente, los anticuerpos pueden cribarse para unirse a una región específica o fragmento deseado del antígeno sin unirse a otros fragmentos no solapantes del antígeno. El último cribado puede realizarse determinando la unión de un anticuerpo a una colección de mutantes de deleción del antígeno y determinando qué mutantes de deleción se unen al anticuerpo. La unión se puede evaluar, por ejemplo, mediante transferencia Western o ELISA. El fragmento más pequeño para mostrar la unión específica al anticuerpo define el epítopo del anticuerpo. Como alternativa, puede determinarse la especificidad de los epítopos mediante un ensayo de competición en el que una prueba y un anticuerpo de referencia compiten por la unión al antígeno. Si la prueba y los anticuerpos de referencia compiten, entonces se unen al mismo epítopo o epítopos suficientemente proximal, de manera que la unión de un anticuerpo interfiere con la unión del otro.

El ADN que codifica el anticuerpo monoclonal deseado puede aislarse y secuenciarse fácilmente usando cualquiera de los procedimientos convencionales descritos para el aislamiento de secuencias de dominio de región constante (por ejemplo, usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a genes que codifican las cadenas pesadas y ligeras de anticuerpos murinos). Las células de hibridoma aisladas y subclonadas sirven como una fuente preferida de dicho ADN. Más particularmente, el ADN aislado (que puede ser sintético como se describe en la presente memoria) puede usarse para clonar las secuencias de la región variable deseada para la incorporación en los polipéptidos de la invención.

En otras realizaciones, el sitio de unión se deriva de un anticuerpo completamente humano. Se pueden generar anticuerpos humanos o sustancialmente humanos en animales transgénicos (por ejemplo, ratones) que son incapaces de producir inmunoglobulinas endógenas (véase, por ejemplo, las patentes de los EE. UU. N.º 6,075,181,5,939,598,5,591,669 y 5,589,369, cada uno de los cuales se incorpora en el presente documento por referencia). Por ejemplo, se ha descrito que la deleción homocigótica de la región de unión de la cadena pesada del anticuerpo en ratones mutantes quiméricos y de la línea germinal da como resultado la inhibición completa de la producción de anticuerpos endógenos. La transferencia de una matriz de genes de inmunoglobulina humana a tales ratones mutantes de la línea germinal dará como resultado la producción de anticuerpos humanos tras la exposición al antígeno. Otro medio preferido para generar anticuerpos humanos usando ratones SCID se describe en la patente de los Estados Unidos N.º 5,811,524. Se apreciará que el material genético asociado con estos anticuerpos humanos también se puede aislar y manipular como se describe en el presente documento.

Aún otro medio altamente eficiente para generar anticuerpos recombinantes es descrito porNewman, Biotechnology, 10: 1455-1460 (1992)). Específicamente, esta técnica da como resultado la generación de anticuerpos primatizados que contienen dominios variables de mono y secuencias constantes humanas. Esta bibliografía se incorpora por referencia en su totalidad en el presente documento. Además, esta técnica también se describe en las patentes de los Estados Unidos N.º 5,658,570,5,693,780 y 5,756,096 asignadas comúnmente. En otra realización, se pueden seleccionar los linfocitos mediante micromanipulación y aislar los genes variables. Por ejemplo, las células mononucleares de sangre periférica pueden aislarse de un mamífero inmunizado y cultivarse durante aproximadamente 7 días *in vitro.* Los cultivos pueden examinarse para detectar anticuerpos específicos que cumplan los criterios de selección. Las células de pocillos positivos se pueden aislar. Las células B productoras de Ig individuales pueden aislarse mediante FACS o identificarlas en un ensayo en placa hemolítica mediada por el complemento. Las células B productoras de Ig pueden micromanularse en un tubo y los genes de VH y VL pueden amplificarse usando, por ejemplo, RT-PCR. Los genes VH y VL pueden clonarse en un vector de expresión de anticuerpo y transfectarse en células (por ejemplo, células eucarióticas o procariotas) para su expresión.

Como alternativa, los dominios variables (V) se pueden obtener a partir de bibliotecas de secuencias génicas variables de un animal de elección. Las bibliotecas que expresan combinaciones aleatorias de dominios, por ejemplo, dominios V_H y/o V_L, pueden cribarse con un antígeno deseado para identificar elementos que tienen características de unión deseadas. Procedimientos de dicho cribado se conocen bien en la técnica. Por ejemplo, los repertorios de genes de anticuerpos se pueden clonar en un vector de expresión de bacteriófagos λ (Huse, WD y

col. (1989). Science, 2476:1275). Además, se pueden cribar células (Francisco y col. (1994), PNAS, 90:10444;Georgiou y col. (1997), Nat. Biotech., 15:29; Boder y Wittrup (1997) Nat. Biotechnol. 15:553; Boder y col.(2000), PNAS, 97:10701;Daugtherty, P. y col. (2000) J. Immunol. Methods. 243:211) o virus (p. ej.,Hoogenboom, HR. (1998), Immunotechnology 4:1;Winter y col. (1994). Annu. Rev. Immunol. 12:433;Griffiths, AD. (1998). Curr. Opin. Biotechnol. 9:102) que expresan anticuerpos en su superficie.

Los expertos en la técnica apreciarán también que los dominios variables de anticuerpo que codifican ADN también pueden derivarse de librerías de anticuerpos expresadas en fagos, levaduras o bacterias mediante procedimientos conocidos en la técnica. Procedimientos ejemplares se exponen, por ejemplo,en el documento EP 368 684 B1;la patente de los EE. UU. N.º 5,969,108;Hoogenboom y col., (2000) Immunol. Today 21:371;Nagy y col. (2002) Nat. Med. 8:801;Huie y col. (2001), PNAS, 98:2682;Lui y col. (2002), J. Mol. Biol. 315:1063. Varias publicaciones (p.ej.,Marks y col. (1992), Bio/Technology 10:779-783) han descrito la producción de anticuerpos humanos de alta afinidad mediante barajado de cadenas, así como la infección combinatoria y la recombinación in vivo como una estrategia para construir grandes bibliotecas de fagos. En otra realización, se puede usar la presentación en ribosomas para reemplazar el bacteriófago como plataforma de presentación (véase, p.ej.,Hanes, y col. (1998), PNAS 95:14130;Hanes y Pluckthun. (1999), Curr. Top. Microbiol. Immunol. 243:107; He y Taussig. (1997), Nuc. Acids Res., 25:5132; Hanes y col. (2000), Nat. Biotechnol. 18:1287; Wilson y col. (2001), PNAS, 98:3750; oIrving y col. (2001) J. Immunol. Methods 248:31).

Las bibliotecas ejemplares para cribado son bibliotecas de genes variables humanos. También se pueden usar los dominios V_L y V_H de una fuente no humana. Las bibliotecas pueden ser de sujetos no inmunizados, de sujetos inmunizados o semisintéticas (Hoogenboom y Winter. (1992). J. Mol. Biol. 227:381;Griffiths y col. (1995) EMBO J. 13:3245;de Kruif y col. (1995). J. Mol. Biol. 248:97;Barbas y col. (1992), PNAS, 89:4457). En una realización, pueden realizarse mutaciones en dominios de inmunoglobulina para crear una biblioteca de moléculas de ácido nucleico que tienen una mayor heterogeneidad (Thompson y col. (1996), J. Mol. Biol. 256:77; Lamminmaki y col. (1999), J. Mol. Biol. 291:589; Caldwell y Joyce. (1992), PCR Methods Appl. 2:28; Caldwell y Joyce. (1994), PCR Methods Appl. 3:S136). Se pueden usar procedimientos de selección estándar para seleccionar variantes de alta afinidad. En otra realización, los cambios en las secuencias V_H y V_L pueden aumentar la avidez del anticuerpo, por ejemplo, usando información obtenida de estructuras cristalinas mediante técnicas conocidas en la técnica.

Otro ejemplo de biblioteca es una biblioteca de camélidos que comprende anticuerpos de dominio único. Los ejemplos de moléculas de un solo dominio incluyen un dominio aislado y variable de cadena pesada (V_H) de un anticuerpo, es decir, un dominio variable de cadena pesada, sin un dominio variable de cadena ligera, y un dominio aislado y variable de cadena ligera (V_L) de un anticuerpo, es decir, cadena ligera de dominio variable, sin un dominio variable de cadena pesada. Los ejemplos de anticuerpos de dominio único empleados en las moléculas de unión de la invención incluyen, por ejemplo, el dominio variable de la cadena pesada de camélidos (de aproximadamente 118 a 136 residuos de aminoácido) como se describe en Hamers-Casterman, y col., Nature 363:446-448 (1993), y Dumoulin, y col., Protein Science 11:500-515 (2002). Otros ejemplos de anticuerpos de dominio único incluyen dominios VH o VL únicos, también conocidos como Dabs® (Domantis Ltd., Cambridge, Reino Unido). Otros anticuerpos más de dominio único incluyen anticuerpos de tiburón (por ejemplo, Ig-NAR de tiburón). Los Ig-NAR de tiburón comprenden un homodímero de un dominio variable (V-NAR) y cinco dominios constantes tipo C (C-NAR), en los que la diversidad se concentra en una región alargada de CDR3 que tiene una variación de longitud de 5 a 23 residuos. En especies de camélidos (por ejemplo, llamas), la región variable de la cadena pesada, denominada V_{HH}, forma el dominio de unión al antígeno completo. Las principales diferencias entre las regiones V_{HH} variables de camélidos y las derivadas de anticuerpos convencionales (VH) incluyen (a) aminoácidos más hidrófobos en la superficie de contacto de la cadena ligera de VH en comparación con la región correspondiente en V_{HH}, (b) una CDR3 más larga en V_{HH}, y (c) la frecuente aparición de un enlace disulfuro entre CDR1 y CDR3 en V_{HH}. Los procedimientos para preparar moléculas de unión de dominio único se describen en las patentes de los EE. UU. N.º 6,005,079 y 6,765,087, ambas se incorporan por referencia en el presente documento. Los anticuerpos de dominio único ejemplares que comprenden dominios V_{HH} incluyen Nanobodies® (Ablynx NV, Gante, Bélgica).

Además, las secuencias de región variable útiles para producir los polipéptidos de la presente invención se pueden obtener a partir de varias fuentes diferentes. Por ejemplo, como se indica anteriormente, una variedad de secuencias de genes humanos están disponibles en forma de depósitos de acceso público. Se han publicado muchas secuencias de anticuerpos y genes que codifican anticuerpos (por ejemplo, anticuerpos de los que se sabe que tienen propiedades clínicamente beneficiosas) y se pueden sintetizar secuencias de región variable adecuadas (por ejemplo, secuencias VL y VH) a partir de estas secuencias mediante técnicas reconocidas en la técnica.

En otra realización, un dominio de unión de un polipéptido de la invención consiste en un dominio V_H, por ejemplo, derivado de camélidos, que es estable en ausencia de una cadena de V_L (Hamers-Casterman y col. (1993). Nature,

363:446;Desmyter y col. (1996). Nat. Struct. Biol. 3: 803;Decanniere y col. (1999). Structure, 7:361;Davies y col. (1996). Protein Eng., 9:531;Kortt y col. (1995). J. Protein Chem., 14:167).

Un polipéptido de la invención puede comprender un dominio variable o CDR derivado de un anticuerpo completamente murino, completamente humano, quimérico, humanizado, de primates no humanos o primatizado. Los anticuerpos no humanos, o fragmentos o dominios de los mismos, se pueden alterar para reducir su inmunogenicidad mediante técnicas reconocidas en la técnica. Los anticuerpos humanizados son anticuerpos derivados de anticuerpos no humanos, que se han modificado para retener o retener sustancialmente las propiedades de unión del anticuerpo parental, pero que son menos inmunogénicos en humanos que los anticuerpos parentales no humanos. En el caso de anticuerpos diana humanizados, esto puede lograrse mediante diversos procedimientos, que incluyen (a) injertar los dominios variables no humanos completos en regiones constantes humanas para generar anticuerpos diana quiméricos; (b) injertar al menos una parte de una o más de las regiones determinantes de la complementariedad no humana (CDR) en un marco humano y regiones constantes con o sin retención de residuos estructurales críticos; (c) trasplantar los dominios variables no humanos completos, pero "enmascararlos" con una sección de tipo humano mediante el reemplazo de residuos superficiales. Dichos procedimientos se describen en Morrison y col., (1984), PNAS. 81: 6851-5;Morrison y col., (1988), Adv. Immunol. 44: 65-92;Verhoeyen y col., (1988), Science 239: 1534-1536;Padlan, (1991), Molec. Immun. 28: 489-498;Padlan, (1994), Molec. Immun. 31: 169-217; y las patentes de los EE. UU. N.º 5,585,089, 5,693,761y5,693,762. También se puede usar la desinmunización para disminuir la inmunogenicidad de un polipéptido de la invención. Como se usa en el presente documento, el término "desinmunización" incluye la modificación de epítopos de células T (véase, p.ej., los documentos WO9852976A1,WO0034317A2). Por ejemplo, las secuencias VH y VL se analizan y se genera un "mapa" epitópico de células T humano de cada región V que muestra la ubicación de los epítopos en relación con las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) y otros residuos clave dentro de la secuencia. Los epítopos de células T individuales del mapa de epítopos de células T se analizan con el fin de identificar sustituciones de aminoácidos alternativas con un riesgo bajo de alterar la actividad del anticuerpo final. Se diseña una serie de secuencias de VH y VL alternativas que comprenden combinaciones de sustituciones de aminoácidos y estas secuencias se incorporan posteriormente en una serie de polipéptidos de la invención cuya funcionalidad se analiza. Normalmente, se generan y prueban entre 12 y 24 anticuerpos variantes. Los genes completos de la cadena pesada y ligera que comprenden las regiones V y C humanas modificadas se clonan a continuación en vectores de expresión y los plásmidos posteriores se introducen en líneas celulares para la producción de anticuerpo completo. Luego se comparan los anticuerpos en ensayos bioquímicos y biológicos adecuados, y se identifica la variante óptima.

En una realización, los dominios variables empleados en un polipéptido de la invención se alteran mediante al menos una sustitución parcial de una o más CDR. En otra realización, los dominios variables pueden alterarse opcionalmente, por ejemplo, mediante una sustitución parcial de una región de marco y un cambio de secuencia. Al preparar una región variable humanizada, las CDR pueden derivarse de un anticuerpo de la misma clase o incluso una subclase como el anticuerpo del que se derivan las regiones estructurales, sin embargo, se prevé que las CDR se derivarán de un anticuerpo de una clase diferente y preferentemente de un anticuerpo de una especie diferente. Puede que no sea necesario reemplazar todas las CDR con las CDR completas de la región variable del donante para transferir la capacidad de unión del antígeno de un dominio variable a otro. Por el contrario, puede que solo sea necesario transferir los residuos que son necesarios para mantener la actividad del dominio de unión. Dadas las explicaciones expuestas en las patentes de los EE. UU. N.º 5,585,089,5,693,761 y 5,693,762, será de la competencia de los expertos en la técnica, obtener un sitio funcional de unión a antígeno con inmunogenicidad reducida, ya sea llevando a cabo la experimentación de rutina o mediante pruebas de ensayo y error.

FC5 es un resto de unión a TMEM30A ejemplar que puede incorporarse en un polipéptido de la invención. La secuencia de aminoácidos de FC5 se expone a continuación:

E V Q L Q A S G G G L V Q A G G S L R L S C A A S G F K I T H Y T M
G W F R Q A P G K E R E F V S R I T W G G D N T F Y S N S V K G R F
T I S R D N A K N T V Y L Q M N S L K P E D T A D Y Y C A A G S T S
T A T P L R V - - - D Y W G K G T Q V T V S S

III. Péptidos conectores opcionales

Los polipéptidos de la invención comprenden opcionalmente al menos un péptido conector. En una realización, dos o más péptidos conectores están presentes en un polipéptido del polipéptido de la invención. En otra realización, un polipéptido de la invención comprende 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 péptidos conectores.

WWLos péptidos conectores de la invención pueden aparecer una vez en una posición dada, o pueden ocurrir múltiples veces (es decir, la secuencia del péptido conector puede repetirse x veces en la secuencia) en una posición dada en un polipéptido recombinante. Por ejemplo, en una realización, un péptido conector de la invención se repite entre 1 y 10 veces (inclusive) en una posición dada en un polipéptido. En otra realización, un péptido conector se da 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10 veces en una posición dada en un polipéptido.

Los péptidos conectores de la invención pueden ser de diferentes longitudes. En una realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 75 aminoácidos. En otra realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 5 a aproximadamente 50 aminoácidos. En otra realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 10 a aproximadamente 40 aminoácidos. En otra realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 35 aminoácidos. En otra realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 15 a aproximadamente 20 aminoácidos. En otra realización, un péptido conector de la invención tiene una longitud de aproximadamente 15 aminoácidos.

Los péptidos conectores se usan con tanta frecuencia en la ingeniería de proteínas que se han convertido en piezas de ensamblaje estándar en biología sintética (véase p. ej.,Anderson, J.C., y col. Journal of Biological Engineering 2010. 4:1y el sitio web de registro de partes que enumera las partes biológicas estándar que se usan en construcciones genéticas).

Algunos ejemplos de usos actuales reconocidos en la técnica para péptidos conectores incluyen usos en: moléculas scFv (Freund y col. FEBS 1993. 320:97); moléculas de inmunoglobulina monocatenarias (Shu y col. 1993. PNAS. USA 90:7995); minicuerpos (Hu y col. 1996 Cancer Res. 56:3055); anticuerpos con el dominio CH2 eliminado (Mueller, B.M., y col. 1990 PNAS USA. 87:5702); anticuerpos biespecíficos monocatenarios (Schlereth y col. 2005 Cancer Res. 65:2882); anticuerpos biespecíficos tipo IgG de longitud completa (Marvin, J.S. Y col.2005 Acta Pharmacol Sin 26:649 y la bibliografía citada en esos documentos, así como Michaelson, J.S., y col. 2009 MAbs.1:128 y Orcutt K.D. y col. 2010 Protein Eng Des Sel. 23:221); proteínas de fusión scFv (deGraaf y col. 2002 British Journal of Cancer 86:811); el desarrollo ensayos de complementación de fragmentos de proteínas (Remy, I. y col. 2007 BioTechiques 42:137).

Otros péptidos conectores ejemplares incluyen aquellos que reducen la xilosa (p. ej., como se describe en el documento WO2012088461) pueden emplearse en las moléculas de unión instantánea.

Los péptidos conectores se pueden unir al extremo N-terminal o al extremo C-terminal (o ambos) de los polipéptidos a los que están unidos.

IV. Ejemplos de restos farmacéuticamente activos

Dependiendo de la enfermedad o trastorno o condición diana, se puede administrar una variedad de cargas de fármacos, por ejemplo, agentes farmacológicamente activos o, de forma equivalente, restos farmacéuticamente activos, con éxito in vivo usando moléculas de unión de la invención. Como se usa en el presente documento, los términos "resto farmacéuticamente activo" y "compuesto farmacológico" se referirán a cualquier resto o compuesto útil en el tratamiento o la mejora de los efectos de una enfermedad o trastorno. Por ejemplo, las enfermedades o trastornos que incluyen enfermedades neurodegenerativas tales como la enfermedad de Alzheimer, la enfermedad de Parkinson, la enfermedad de Huntington, la esclerosis lateral amiotrófica (ELA, enfermedad de Lou Gehrig), la epilepsia del dolor, las enfermedades de almacenamiento y la esclerosis múltiple pueden ser la diana.

Las moléculas farmacéuticamente activas ejemplares incluyen: factor de crecimiento nervioso (NGF), factor neurotrófico derivado del cerebro (BDNF), factor neruotrófico ciliar (CNTF), factor neurotrófico de la línea celular glial (GDNF) y factor de crecimiento similar a la insulina (IGF). Además, otros compuestos que han demostrado tener potencial terapéutico y que pueden administrarse mediante anticuerpos son neuropéptidos, que incluyen, pero no se limitan a, Sustancia P, neuropéptido Y, dalargina, alfa sinucleína, péptido intestinal vasoactivo (VIP), gamma-amino ácido butírico (GABA), dopamina, colecistoquinina (CCK), endorfinas, encefalinas y hormona liberadora de tirotropina (TRH). Otros ejemplos terapéuticos pueden incluir citoquinas, agentes ansiolíticos, anticonvulsivos, polinucleótidos y transgenes, que incluyen, por ejemplo, ARN de interferencia pequeño que pueden usarse para dichos trastornos neuronales, que incluyen, pero no se limitan a, enfermedades psiquiátricas, tales como, por ejemplo, ansiedad , depresión, esquizofrenia y trastornos del sueño, así como epilepsias, trastornos convulsivos, apoplejía y trastornos cerebrovasculares, encefalitis y meningitis, trastornos de la memoria y la cognición, dolor agudo o crónico (por ejemplo, refractario) y trauma físico.

En una realización, un resto farmacéuticamente activo comprende un sitio de unión a antígeno que no se une a TMEM30A. En ciertas realizaciones, los polipéptidos de la invención tienen al menos un sitio de unión específico para una molécula diana diferente de TMEM30A que media un efecto biológico. En una realización, el sitio de unión modula la activación o inhibición celular (por ejemplo, uniéndose a un receptor de superficie celular y dando como resultado la transmisión de una señal activadora o inhibidora). En una realización, el sitio de unión es capaz de iniciar la transducción de una señal que produce la muerte de la célula (por ejemplo, mediante una vía inducida por señal celular, por fijación del complemento o exposición a una carga útil (por ejemplo, una carga tóxica) presente en el molécula de unión), o que modula una enfermedad o trastorno en un sujeto (por ejemplo, mediando o promoviendo la muerte celular, promoviendo la lisis de un coágulo de fibrina o promoviendo la formación de coágulos, o modulando la cantidad de una sustancia que es biodisponible). En otra realización, los polipéptidos de la invención tienen al menos un sitio de unión específico para un antígeno dirigido para reducción o eliminación, por ejemplo, un antígeno de superficie celular o un antígeno soluble).

En otras realizaciones más, un polipéptido de la invención se une a una molécula que es útil en el tratamiento de una enfermedad o trastorno neurológico. Por ejemplo, un polipéptido se puede unir a un antígeno presente en una célula neuronal (por ejemplo, una neurona, una célula glial, o a). En ciertas realizaciones, el antígeno asociado con un trastorno neurológico puede ser un trastorno autoinmune o inflamatorio descrito anteriormente. Como se usa en el presente documento, el término "enfermedad o trastorno neurológico" incluye trastornos o afecciones en un sujeto en el que el sistema nervioso o bien degenera (por ejemplo, trastornos neurodegenerativos, así como trastornos en los que el sistema nervioso no se desarrolla adecuadamente o no se regenera después de una lesión; por ejemplo, una lesión de la médula espinal). Los ejemplos de trastornos neurológicos que pueden ser diagnosticadas, prevenidas o tratadas con composiciones de la presente invención incluyen, pero no se limitan a, esclerosis múltiple, enfermedad de Huntington, enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, dolor neuropático, lesión cerebral traumática, síndrome de Guillain-Barré y polineuropatía desmielinizante inflamatoria crónica (CIDP).

A continuación se analizan otros restos farmacológicamente activos adicionales:

i. Porciones de unión a antígeno

En ciertas realizaciones, un resto farmacéuticamente activo comprende al menos una porción de unión a antígeno (sitio de unión), por ejemplo, de un anticuerpo o anticuerpo de dominio único. En una realización, la porción de unión a antígeno dirige la composición a un tipo o tejido de célula particular.

En otras realizaciones, un sitio de unión de un resto farmacéuticamente activo de la invención puede comprender una parte o fragmento de unión a antígeno. El término "porción de unión a antígeno" se refiere a un fragmento polipeptídico de una inmunoglobulina, anticuerpo o variante de anticuerpo que se une al antígeno o compite con el anticuerpo intacto (es decir, con el anticuerpo intacto del que derivaban) para la unión al antígeno (es decir, una unión específica). Por ejemplo, los fragmentos de unión a antígeno se pueden derivar de anticuerpos o variantes de anticuerpos descritos. Las porciones de unión a antígeno se pueden producir por procedimientos recombinantes o bioquímicos que son bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de fragmentos de unión a antígeno incluyen VH y/o VL (si cualquier región variable sola es suficiente para unir el antígeno), Fv, Fab, Fab' y $(Fab')_2$.

En otras realizaciones, un resto farmacéuticamente activo de la invención puede comprender un sitio de unión de una molécula de unión monocatenaria (por ejemplo, una región variable de cadena única o scFv). Las técnicas descritas para la producción de anticuerpos monocatenarios (patente de los EE. UU. N.º. 4,694,778;Bird, Science 242:423-442 (1988);Huston y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 (1988); y Ward y col., Nature 334:544-554 (1989)) pueden adaptarse para producir moléculas de unión monocatenarias. Los anticuerpos monocatenarios se forman uniendo los fragmentos de cadena pesada y ligera de la región Fv por medio de un puente de aminoácidos, dando como resultado un anticuerpo monocatenario. También se pueden usar técnicas para el ensamblaje de fragmentos Fv funcionales en E. coli. (Skerra y col., Science 242:1038-1041 (1988)).

En ciertas realizaciones, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende uno o más sitios de unión o regiones que comprenden o consisten en una secuencia de región variable de cadena única (scFv). Las secuencias de la región variable de cadena única comprenden un único polipéptido que tiene uno o más sitios de unión a antígeno, por ejemplo, un dominio de V_L unido por un péptido conector a un dominio de V^H. Los dominios VL y/o VH pueden derivarse de anticuerpos conocidos en la técnica o variantes de los mismos. Las moléculas ScFv se pueden construir en una orientación V_H-conector-V_L o V_L-conector-V_H.

En ciertas realizaciones, una molécula de scFv empleada en un resto farmacéuticamente activo de la invención es

una molécula de scFv estabilizada. En una realización, la molécula scFv estabilizada puede comprender un péptido conector interpuesto entre un dominio V_H y un dominio V_L, en el que los dominios V_H y V_L están unidos por un enlace disulfuro entre un aminoácido en el dominio V_H y un aminoácido en el dominio V_L. En otras realizaciones, la molécula scFv estabilizada puede comprender un conector scFv con una longitud o composición optimizada. En otras formas de realización más, la molécula scFv estabilizada puede comprender un dominio V_H o V_L que tiene al menos una sustitución de aminoácido estabilizador. En otra realización más, una molécula de scFv estabilizada puede tener al menos dos de las características de estabilización enumeradas anteriormente.

Las moléculas scFv estabilizadas tienen una estabilidad proteica mejorada o imparten estabilidad proteica mejorada al polipéptido al que están operativamente unidos. Ejemplos de moléculas scFv estabilizadas que pueden estar presentes en los polipéptidos de la invención se describen enla patente de los EE. UU. N.º 7,951,918. En ciertas realizaciones ejemplares, los restos farmacéuticamente activos de la invención comprenden al menos una molécula de scFv que está operativamente unida mediante un péptido conector al extremo C-terminal y/o al extremo N-terminal de una región Fc.

En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende al menos una CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la presente invención comprende al menos dos CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la presente invención comprende al menos tres CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la presente invención comprende al menos cuatro CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la presente invención comprende al menos cinco CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la presente invención comprende las seis CDR de un anticuerpo que reconoce una diana deseada. En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende la secuencia de aminoácidos completa de una molécula de anticuerpo que reconoce una diana deseada (por ejemplo, en el caso de una molécula de anticuerpo tetravalente biespecífica).

Los ejemplos de anticuerpos a partir de los cuales pueden derivarse sitios de unión para el uso en un resto farmacéuticamente activo de la invención son conocidos en la técnica. Por ejemplo, los anticuerpos actualmente aprobados por la FDA para su uso en el tratamiento pueden usarse para derivar sitios de unión. En una realización, un sitio de unión ejemplar se deriva de un anticuerpo anti-Lingo (véase, p.ej.,WO2008086006). En otros aspectos, un resto farmacéuticamente activo de la invención puede comprender una molécula de anticuerpo modificada o un sitio de unión a antígeno (o partes del mismo) derivado de una forma modificada de un anticuerpo. Los ejemplos de tales formas incluyen, p. ej., minicuerpos, diacuerpos, triacuerpos, nanoanticuerpos, camélidos, Dabs, anticuerpos tetravalentes, intradiacuerpos (p.ej.,Jendreyko y col. 2003. J. Biol. Chem. 278:47813), proteínas de fusión (p.ej., proteínas de fusión de citocinas de anticuerpos, proteínas fusionadas a al menos una parte de un receptor de Fc), y anticuerpos biespecíficos. Se describen otros anticuerpos modificados, por ejemplo, en la patente de EE. UU. N.º N.º 4,745,055;EP 256,654;Faulkner y col., Nature 298:286 (1982);EP 120,694;EP 125,023;Morrison, J. Immun. 123:793 (1979);Kohler y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:2197 (1980);Raso y col., Cancer Res. 41:2073 (1981);Morrison y col., Ann. Rev. Immunol. 2:239 (1984); Morrison, Science 229:1202 (1985); Morrison y col., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:6851 (1984); EP 255,694; EP 266,663; y WO 88/03559. También se conocen cadenas de inmunoglobulinas reasignadas. Véase, por ejemplo, la patente de los EE. UU. N.º 4,444,878;WO 88/03565; y EP 68,763 y la bibliografía citada en esos documentos.

En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio o región de unión a antígeno que es un diacuerpo o un sitio de unión a antígeno derivado del mismo. Los diacuerpos son moléculas diméricas, tetravalentes y cada una tiene un polipéptido similar a las moléculas scFv, pero normalmente tienen un conector de residuos de aminoácidos corto (por ejemplo, menos de 10 y preferentemente de 1 a 5) que conecta ambos dominios variables, de manera que los dominios V_L y V_H en la misma cadena de polipéptidos no pueden interactuar. En cambio, el dominio V_L y V_H de una cadena polipeptídica interactúa con el dominio V_H y V_L (respectivamente) en una segunda cadena polipeptídica (véase, por ejemplo, el documento WO 02/02781). En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un diacuerpo que está unido operativamente al extremo N-terminal y/o al extremo C-terminal de al menos una región Fc fusionada genéticamente (es decir, región scFc).

En ciertas realizaciones, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de anticuerpo que no transmigra la BHE (por ejemplo, una molécula de unión de dominio único que no se une a TEME30A, tal como un anticuerpo de dominio único).

ii. Moléculas de unión no inmunoglobulínicas

En ciertas otras realizaciones, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende uno o más sitios de unión derivados de una molécula de unión que no es una inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, el término "moléculas de unión no inmunoglobulínicas" son moléculas de unión cuyos sitios de unión comprenden una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido distinto de una inmunoglobulina. Los ejemplos de moléculas de unión que comprenden sitios de unión no derivados de moléculas de anticuerpo incluyen sitios de unión a receptor y sitios de unión a ligando que se analizan con más detalle más adelante.

Los restos farmacéuticamente activos no inmunoglobulínicos pueden comprender secuencias de aminoácidos que se derivan de un miembro de la superfamilia de inmunoglobulinas que no es una inmunoglobulina (por ejemplo, un receptor de células T o una proteína de adhesión celular (por ejemplo, CTLA-4, N-CAM, telokin)). En otras realizaciones, las secuencias de aminoácidos pueden comprender una topología de proteína que no se basa en el pliegue de inmunoglobulina (por ejemplo, proteínas de repetición de anquirina o fibronectinas) pero que, no obstante, son capaces de unirse específicamente a una diana.

Los restos farmacéuticamente activos no inmunoglobulínicos se pueden identificar mediante selección o aislamiento de una variante de unión a diana a partir de una biblioteca de moléculas de unión que tienen sitios de unión diversificados artificialmente. Se pueden generar bibliotecas diversificadas usando enfoques completamente aleatorios (por ejemplo, PCR propensa a error, mezcla aleatoria de exones o evolución dirigida) o ayudadas por estrategias de diseño reconocidas en la técnica. Por ejemplo, las posiciones de aminoácidos que generalmente están involucradas cuando el sitio de unión interactúa con su molécula diana análoga se pueden aleatorizar mediante la inserción de codones degenerados, trinucleótidos, péptidos aleatorios o bucles enteros en posiciones correspondientes dentro del ácido nucleico que codifica el sitio de unión (véase p. ej., la Pub. de EE. UU., Nº. 20,040,132,028). La ubicación de las posiciones de aminoácidos se puede identificar mediante la investigación de la estructura cristalina del sitio de unión en complejo con la molécula diana. Las posiciones candidatas para la aleatorización incluyen bucles, superficies planas, hélices y cavidades de unión del sitio de unión. En ciertas realizaciones, los aminoácidos dentro del sitio de unión que son candidatos probables para la diversificación pueden identificarse por su homología con el pliegue de inmunoglobulina. Por ejemplo, los residuos dentro de los bucles de fibronectina similares a CDR pueden aleatorizarse para generar una biblioteca de moléculas de unión a fibronectina (véase, p.ej.,Koide y col., J. Mol. Biol., 284: 1141-1151 (1998)). Otras partes del sitio de unión que pueden aleatorizarse incluyen superficies planas. La selección puede lograrse mediante procedimientos reconocidos en la técnica, como la presentación en fagos, la presentación en levadura o la presentación en ribosomas.

En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de una molécula de unión a fibronectina. Las moléculas de unión a fibronectina (por ejemplo, moléculas que comprenden los dominios de fibronectina de tipo I, II o III) muestran bucles similares a CDR que, a diferencia de las inmunoglobulinas, no dependen de enlaces disulfuro intracatenarios. Los procedimientos para fabricar polipéptidos de fibronectina se describen, por ejemplo, en el documento WO 01/64942 y en las patentes de los EE.UU. N.º 6,673,901,6,703,199,7,078,490, y 7,119,171. En una realización a modo de ejemplo, el polipéptido de fibronectina es AdNectin® (Adnexus Therpaeutics, Waltham, MA).

En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un Affibody® (Abcam, Cambridge, MA). Los affibody se derivan de los dominios de unión a inmunoglobulina de la proteína A estafilocócica (SPA) (véase p.ej.,Nord y col., Nat. Biotechnol., 15: 772-777 (1997)). Los procedimientos para preparar sitios de unión de affibody se describen en las patentes de los EE. UU. N.º 6,740,734 y 6,602,977y en el documento WO 00/63243.

En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un Anticalin® (Pieris AG, Friesing, Alemania). Las anticalinas (también conocidas como lipocalinas) son miembros de una familia diversa de proteínas β-barril cuya función es unir moléculas diana en su región de barril/bucle. Los sitios de unión a lipocalina pueden diseñarse aleatorizando secuencias de bucle conectando los filamentos del barril (véase, p.ej.,Schlehuber y col., Drug Discov. Today, 10: 23-33 (2005); Beste y col., PNAS, 96: 1898-1903 (1999)). Los sitios de unión a anticalina empleados en las moléculas de unión de la invención se pueden obtener partiendo de polipéptidos de la familia de las lipocalinas que están mutados en cuatro segmentos que corresponden a las posiciones de secuencias de la secuencia polipeptídica lineal que comprende las posiciones de aminoácidos 28 a 45, 58 a 69, 86 a 99 y 114 a 129 de la proteína de unión a bilina (BBP) de Pieris brassica. Otros procedimientos para preparar sitios de unión a anticalina se describen en los documentos WO99/16873 y WO 05/019254.

En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de un polipéptido rico en cisteína. Los dominios ricos en cisteína empleados en la práctica de la presente invención normalmente no

forman una estructura de hélice α, lámina β o barril β. Típicamente, los enlaces disulfuro promueven el plegamiento del dominio en una estructura tridimensional. Habitualmente, los dominios ricos en cisteína tienen al menos dos enlaces disulfuro, más típicamente al menos tres enlaces disulfuro. Un polipéptido rico en cisteína ejemplar es una proteína de dominio A. Los dominios A (a veces llamados "repeticiones tipo complemento") contienen de aproximadamente 30 a 50 o 30 a 65 aminoácidos. En algunas realizaciones, los dominios comprenden de aproximadamente 35 a 45 aminoácidos y en algunos casos aproximadamente 40 aminoácidos. En los 30-50 aminoácidos, hay aproximadamente 6 residuos de cisteína. De las seis cisteínas, los enlaces disulfuro se encuentran normalmente entre las siguientes cisteínas: C1 y C3, C2 y C5, C4 y C6. El dominio A constituye un resto de unión a ligando. Los residuos de cisteína del dominio están unidos por disulfuro para formar un resto compacto, estable, funcionalmente independiente. Los grupos de estas repeticiones forman un dominio de unión a ligando, y el agrupamiento diferencial puede impartir especificidad con respecto a la unión del ligando. Los ejemplos de proteínas que contienen dominios A incluyen, por ejemplo, componentes del complemento (por ejemplo, C6, C7, C8, C9 y Factor I), serina proteasas (por ejemplo, enteropeptidasa, matriptasa y corina), proteínas transmembrana (por ejemplo, ST7, LRP3, LRP5 y LRP6) y receptores endocíticos (por ejemplo, receptor relacionado con sortilina, receptor LDL, VLDLR, LRP1, LRP2 y ApoER2). Los procedimientos para fabricar proteínas de dominio A de una especificidad de unión deseada se describen, por ejemplo, en los documentos WO 02/088171andWO 04/044011.

En otra realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención comprende un sitio de unión de una proteína con repeticiones. Las proteínas con repeticiones son proteínas que contienen copias consecutivas de unidades estructurales pequeñas (por ejemplo, de aproximadamente 20 a aproximadamente 40 aminoácidos) o repeticiones que se acumulan para formar dominios contiguos. Las proteínas con repeticiones se pueden modificar para adaptarlas a un sitio de unión diana específico ajustando el número de repeticiones en la proteína. Los ejemplos de proteínas con repeticiones incluyen proteínas con repeticiones de anquirina diseñadas (es decir, un DARPins®, Molecular Partners, Zúrich, Suiza) (véase, p. ej., Binz y col., Nat. Biotechnol., 22: 575-582 (2004)) o proteínas con repeticiones ricas en leucina (es decir, LRRP) (véase, p.ej., Pancer y col., Nature, 430: 174-180 (2004)). Todas las estructuras terciarias determinadas hasta ahora de unidades repetitivas de anquirina comparten una característica compuesta por una horquilla β seguida de dos hélices α antiparalelas y terminando con un bucle que conecta la unidad de repetición con la siguiente. Los dominios construidos de unidades repetitivas de anquirina se forman apilando las unidades repetitivas en una estructura extendida y curva. Los sitios de unión a LRRP forman parte del sistema inmune adaptativo de lampreas de mar y otros peces sin mandíbula y se asemejan a los anticuerpos en que se forman por la recombinación de un conjunto de genes repetidos ricos en leucina durante la maduración de linfocitos. Los procedimientos para preparar DARpins o sitios de unión a LRRP se describen en los documentos WO 02/20565 y WO 06/083275.

Otros sitios de unión no inmunoglobulínicos que pueden emplearse en moléculas de unión de la invención incluyen sitios de unión derivados de dominios de homología de Src (por ejemplo, dominios SH2 o SH3), dominios PDZ, beta-lactamasa, inhibidores de proteasa de alta afinidad o andamios de proteína de unión a disulfuro pequeños como las toxinas del escorpión. Los procedimientos para preparar sitios de unión derivados de estas moléculas se han descrito en la técnica, véase p.ej.,Silverman y col., Nat. Biotechnol., 23(12): 1493-4 (2005);Panni y col, J. Biol. Chem., 277: 21666-21674 (2002),Schneider y col., Nat. Biotechnol., 17: 170-175 (1999);Legendre y col., Protein Sci., 11:1506-1518 (2002); Stoop y col., Nat. Biotechnol., 21: 1063-1068 (2003); y Vita y col., PNAS, 92: 6404-6408 (1995)). Otros sitios de unión más pueden derivarse de un dominio de unión seleccionado del grupo constituido por un dominio similar a EGF, un dominio Kringle, un dominio PAN, un dominio Gla, un dominio SRCR, un dominio inhibidor de tripsina pancreática de Kunitz/bovino, un dominio del inhibidor de la serina proteasa de tipo Kazal, un dominio de tipo trébol (tipo P), un dominio tipo C de von Willebrand, un dominio similar a anafilatoxina, un dominio CUB, una repetición tipo I de tiroglobulina, un dominio clase A del receptor LDL, un dominio sushi, un dominio de enlace, un dominio de tipo I de trombospondina, un dominio de tipo inmunoglobulina, un dominio de lectina de tipo C, un dominio MAM, un dominio de tipo A de von Willebrand, un dominio B de somatomedina, un dominio de cuatro núcleos de disulfuro de tipo WAP, un dominio C de tipo F5/8, un dominio de hemopexina, un dominio similar a EGF de tipo laminina, un dominio C2, un dominio CTLA-4 y otros dominios similares conocidos por los expertos en la técnica, así como derivados y/o variantes de los mismos. Los polipéptidos no inmunoglobulínicos adicionales incluyen Avimers® (Avidia, Inc., Mountain View, CA, véase la publicación PCT internacional N.º WO 06/055689 y la patente de los EE.UU. N.º 2006/0234299), Telobodies® (Biotech Studio, Cambridge, MA), Evibodies® (Evogenix, Sydney, Australia, véase la patente de los EE. UU. N.º 7,166,697), y Microbodies® (Nascacell Technologies, Múnich, Alemania).

iii. Porciones de unión de receptores o ligandos

En otros aspectos, un resto farmacéuticamente activo de la invención es una porción de unión a ligando de un receptor y/o una porción de unión a un ligando de un receptor.

En otras realizaciones ejemplares, un resto farmacéuticamente activo de la invención puede comprender uno o más dominios de unión a ligando o dominios de unión a receptor derivados de una o más de las siguientes proteínas:

a. Citoquinas y receptores de citoquinas

Las citoquinas tienen efectos pleiotrópicos sobre la proliferación, la diferenciación y la activación funcional de los linfocitos. Diversas citoquinas, o porciones de unión a receptores de las mismas, se pueden utilizar en las proteínas de fusión de la invención. Las citocinas ejemplares incluyen las interleuquinas (por ejemplo, IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-10, IL-11, IL-12 , IL-13 e IL-18), los factores estimulantes de colonias (CSF) (por ejemplo, CSF de granulocitos (G-CSF), CSF de granulocitos-macrófagos (GM-CSF) y CSF de macrófagos de monocitos (M-CSF)) factor de necrosis (TNF) alfa y beta, antígeno 4 de linfocitos T citotóxicos (CTLA-4) e interferones tales como interferón-a, β o γ (patentes de los EE.UU. N.º 4,925,793 y 4,929,554).

Los receptores de citocina típicamente consisten en una cadena alfa específica de ligando y una cadena beta común. Los receptores de citoquina ejemplares incluyen los de GM-CSF, IL-3 (patente de los EE. UU. N.º 5,639,605), IL-4 (patente de los EE. UU. N.º 5,599,905), IL-5 (patente de los EE.UU. N.º 5,453,491), IL10 receptor, IFNγ (EP0240975), y la familia de receptores TNF (p.ej., TNFα (p.ej.,TNFR-1 (EP 417, 563), TNFR-2 (EP 417,014) receptor de linfotoxina beta).

b. Proteínas de adhesión

Las moléculas de adhesión son proteínas unidas a la membrana que permiten que las células interactúen entre sí. Diversas proteínas de adhesión, que incluyen receptores de *homing* leucocitarios y moléculas de adhesión celular, o porciones de unión a receptores de las mismas, pueden incorporarse en una proteína de fusión de la invención. Los receptores de *homing* leucocitarios se expresan en las superficies de las células leucocitarias durante la inflamación e incluyen las integrinas β-1 (por ejemplo, VLA-1, 2, 3, 4, 5 y 6) que median la unión a los componentes de la matriz extracelular y las integrinas β2 (p. ej., LFA-1, LPAM-1, CR3 y CR4) que se unen a las moléculas de adhesión celular (CAM) en el endotelio vascular. Los ejemplos de CAM incluyen ICAM-1, ICAM-2, VCAM-1 y MAdCAM-1. Otras CAM incluyen las de la familia de las selectinas, incluida la E-selectina, L-selectina y P-selectina.

c. Quimioquinas

Las quimiocinas, proteínas quimiotácticas que estimulan la migración de leucocitos hacia un sitio de infección, también se pueden incorporar en una proteína de fusión de la invención. Las quimiocinas ejemplares incluyen proteínas inflamatorias de macrófagos (MIP-1-α y MIP-1-β), el factor quimiotáctico de neutrófilos y RANTES (regulado en la activación normalmente expresada y secretada por células T).

d. Hormonas

Las hormonas de crecimiento ejemplares para uso como restos farmacológicamente activos en las proteínas de fusión de la invención incluyen renina, hormona de crecimiento humano (HGH;patente de los EE. UU. N.º 5,834,598), hormona de crecimiento humano N-metionil; hormona de crecimiento bovina; factor de liberación de la hormona del crecimiento; hormona paratiroidea (PTH); hormona estimulante de la tiroides (TSH); tiroxina; proinsulina e insulina (patentes de los EE. UU. N.º 5,157,021 y 6,576,608); hormona estimuladora folicular (FSH); calcitonina, hormona luteinizante (LH), leptina, glucagón; bombesina; somatropina; sustancia inhibidora de Müller; relaxina y prorelaxina; péptido asociado a gonadotropina; prolactina; lactógeno placentario; proteína OB; o sustancia inhibidora de Müller.

e. Receptores y ligandos

En una realización, un resto farmacéuticamente activo de la invención combina el(los) sitio(s) de unión del ligando o receptor (por ejemplo, el dominio extracelular (ECD) de un receptor) con al menos una región Fc fusionada genéticamente (es decir, región scFc). En ciertas realizaciones, el sitio de unión o dominio de la porción de unión a ligando de un receptor puede derivarse de un receptor unido por un anticuerpo o variante de anticuerpo. En otras realizaciones, la porción de unión a ligando de un receptor se deriva de un receptor seleccionado del grupo constituido por un receptor de la superfamilia de inmunoglobulina (Ig) (por ejemplo, un receptor de célula T soluble, por ejemplo, mTCR® (Medigene AG, Múnich, Alemania), un receptor de la superfamilia del receptor de TNF descrito anteriormente (por ejemplo, un receptor de TNFα soluble de una inmunoadhesina), un receptor de la familia de receptores del factor neurotrófico derivado de células gliales (GDNF) (por ejemplo, GFRα3), un receptor de la

superfamilia de receptores acoplados a la proteína G (GPCR), un receptor de la superfamilia de receptores de tirosina quinasa (TK), un receptor de la superfamilia activada por ligandos (LG), un receptor de la superfamilia de receptores de quimiocinas, IL-1/receptor de tipo Toll (superfamilia TLR) y una superfamilia de receptores de citocinas.

En otras realizaciones, el sitio de unión o dominio de la porción de unión a receptor a un ligando puede derivarse de un ligando unido por un anticuerpo o variante del anticuerpo. Por ejemplo, el ligando puede unirse a un receptor seleccionado del grupo constituido por un receptor de la superfamilia de inmunoglobulinas (Ig), un receptor de la superfamilia de receptores de TNF, un receptor de la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G (GPCR), un receptor de la superfamilia del receptor de tirosina quinasa (TK), un receptor de la superfamilia activada por ligandos (LG), un receptor de la superfamilia de receptores de quimiocinas, la superfamilia del receptor IL-1/receptor de tipo Toll (TLR) y una superfamilia de receptores de citoquinas. En una realización ejemplar, el sitio de unión de la porción de unión a receptor de un ligando se deriva de un ligando que pertenece a la superfamilia de ligando de TNF (por ejemplo, CD40L).

Los factores de crecimiento o sus receptores (o la unión al receptor o porciones de unión a ligando de los mismos) se pueden incorporar en las proteínas de fusión de la invención. Los factores de crecimiento ejemplares incluyen el factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF) y sus isoformas (patente de los EE. UU. N.º 5,194,596); factores de crecimiento fibroblástico (FGF), que incluyen a FGF y bFGF; factor natriurético atrial (ANF); factores de crecimiento hepáticos (HGF;patentes de EE. UU N.º 5,227,158 y 6,099,841), factores neurotróficos tales como el factor neurotrófico derivado de hueso (BDNF), ligandos del factor neurotrófico derivados de células gliales (p. ej., GDNF, neuturina, artemina y persefina), neurotrofina-3, -4, -5 o -6 (NT-3, NT-4, NT-5 o NT-6) o un factor de crecimiento nervioso como el factor de crecimiento derivado de plaquetas NGF-β (PDGF)(patentes de los EE.UU. N.º 4,889,919,4,845,075,5,910,574, y 5,877,016); factores de crecimiento transformantes (TGF) como TGF-alfa y TGF-beta (WO 90/14359), factores osteoinductores, incluida la proteína morfogenética ósea (BMP); factores de crecimiento tipo insulina-I y II (IGF-I y IGF-II; patentes de los EE. UU. N.º 6,403,764 y 6,506,874); eritropoyetina (EPO); trombopoyetina (TPO, factor de células madre (SCF), trombopoyetina (TPO, ligando c-Mpl) y los polipéptidos de Wnt (patente de los EE.UU. N.º 6,159,462).

Los ejemplos de los receptores de factores de crecimiento que pueden usarse como restos farmacológicamente activos de la invención incluyen receptores de EGF; receptores de VEGF (por ejemplo, Flt1 o Flk1/KDR), receptores de PDGF (WO 90/14425); receptores de HGF (patentes de los EE. UU. N.º 5,648,273, y5,686,292), y receptores neurotróficos que incluyen el receptor de baja afinidad (LNGFR), también denominado $p75^{NTR}$ o p75, que se une a NGF, BDNF y NT-3, y receptores de alta afinidad que son miembros de la familia trk del receptor tirosina quinasas (p.ej., trkA, trkB (EP 455,460), trkC (EP 522,530)).

f. Fármacos

En otra realización, un agente farmacológicamente activo es un principio activo que se usa en el tratamiento, cura, prevención o diagnóstico de la enfermedad o que se usa para mejorar de otro modo el bienestar físico o mental. Dichos fármacos pueden ser entidades químicas y ejemplos de dichas entidades se describen con más detalle en el presente documento.

La presente invención se puede aplicar para administrar otros agentes para el tratamiento de trastornos que afectan al sistema nervioso y también se puede aplicar con fines diagnósticos. Las clases preferidas de agentes para el tratamiento de trastornos del SNC incluyen:

Fármacos que actúan en sitios de unión sináptica y neuroefectoras; analgésicos y anestésicos generales y locales tales como analgésicos y antagonistas opioides; hipnóticos y sedantes; medicamentos para el tratamiento de trastornos psiquiátricos tales como depresión, esquizofrenia; antiepilépticos y anticonvulsivos; enfermedad de Huntington, envejecimiento y enfermedad de Alzheimer; agentes neuroprotectores (tales como antagonistas de aminoácidos excitadores y factores neurotrópicos) y agentes neurorregenerativos; factores tróficos tales como el factor neurotrófico derivado del cerebro, el factor neurotrófico ciliar o el factor de crecimiento nervioso; medicamentos dirigidos al tratamiento del trauma del SNC o apoplejía; y medicamentos para el tratamiento de la adicción y el abuso de drogas; autacoides y medicamentos antiinflamatorios; agentes quimioterapéuticos para infecciones parasitarias y enfermedades microbianas; agentes inmunosupresores y fármacos contra el cáncer; hormonas y antagonistas de hormonas; metales pesados y antagonistas de metales pesados; antagonistas para agentes tóxicos no metálicos; agentes citostáticos para el tratamiento del cáncer; sustancias de diagnóstico para su uso en medicina nuclear, y agentes inmunoactivos e inmunorreactivos de radioterapia; y un número de otros agentes tales como transmisores y sus respectivos receptores-agonistas y antagonistas, sus respectivos precursores o

metabolitos; antibióticos, antiespasmódicos, antihistamínicos, antinauseantes, relajantes, estimulantes, oligonucleótidos "sentido" y "antisentido", dilatadores cerebrales, psicotrópicos, antimaníacos, dilatadores y constrictores vasculares, antihipertensivos, tratamientos para la migraña, hipnóticos, agentes hiper o hipoglucemiantes, agentes minerales o nutricionales, medicamentos contra la obesidad, anabólicos y antiasmáticos.

Los ingredientes activos típicos (por ejemplo, medicamentos) pueden ser cualquier sustancia que afecte el sistema nervioso o que se use para pruebas de diagnóstico del sistema nervioso. Estos han sido descritos por Gilman y col. (1990), "Goodman and Gilman's--The Pharmacological Basis of Therapeutics", Pergamon Press, New York, e incluyen los siguientes agentes:
acetilcolina y ésteres de colina sintéticos, alcaloides colinomiméticos naturales y sus congéneres sintéticos, agentes anticolinesterásicos, estimulantes ganglionares, atropina, escopolamina y fármacos antimuscarínicos relacionados, catecolaminas y fármacos simpaticomiméticos, como epinefrina, norepinefrina y dopamina, agonistas adrenérgicos, antagonistas de los receptores adrenérgicos, transmisores tales como GABA, glicina, glutamato, acetilcolina, dopamina, 5-hidroxitriptamina e histamina, péptidos neuroactivos;
analgésicos y anestésicos tales como analgésicos opioides y antagonistas; medicamentos preanestésicos y anestésicos como benzodiazepinas, barbitúricos, antihistamínicos, fenotiazinas y butilfenonas; opioides; antieméticos; fármacos anticolinérgicos tales como atropina, escopolamina o glicopirrolato; cocaína; derivados de cloral; etilclorovinol; glutetimida; metiprilón; meprobamato; paraldehído; disulfiram; morfina, fentanilo y naloxona;
agentes antitusivos de acción central;
fármacos psiquiátricos tales como fenotiazinas, tioxantenos y otros compuestos heterocíclicos (por ejemplo, halperiodol); antidepresivos tricíclicos tales como desimipramina e imipramina; antidepresivos atípicos (por ejemplo, fluoxetina y trazodona), inhibidores de la monoaminooxidasa tales como isocarboxazida; sales de litio; ansiolíticos tales como clordiazepóxido y diazepam;
antiepilépticos que incluyen hidantoínas, barbitúricos anticonvulsivos, iminostilbinas (como carbamazepina), succinimidas, ácido valproico, oxazolidindionas y benzodiazepinas.
medicamentos contra el Parkinson tales como L-DOPA/CARBIDOPA, apomorfina, amantadina, ergolinas, selegilina, ropinorol, mesilato de bromocriptina y agentes anticolinérgicos;
agentes antiespasticidad tales como baclofeno, diazepam y dantroleno;
agentes neuroprotectores, tales como antagonistas de aminoácidos excitadores, factores neurotróficos y factor neurotrófico derivado del cerebro, factor neurotrófico ciliar o factor de crecimiento nervioso; neurotrofina (NT) 3 (NT3); NT4 y NT5; gangliósidos; agentes neurorregenerativos;
los fármacos para el tratamiento de la adicción y el abuso de drogas incluyen antagonistas opioides y antidepresivos;
autacoides y fármacos antiinflamatorios tales como histamina, bradiquinina, calidina y sus agonistas y antagonistas respectivos;
agentes quimioterapéuticos para infecciones parasitarias y enfermedades microbianas;
fármacos anticáncer que incluyen agentes alquilantes (por ejemplo, nitrosoureas) y antimetabolitos; mostazas nitrogenadas, etilenaminas y metilmelaminas; alquilsulfonatos; análogos de ácido fólico; análogos de pirimidina, análogos de purina, alcaloides de vinca; y antibióticos.

La presente invención también es útil para la administración de medicamentos anti-náusea, relajantes, estimulantes, oligonucleótidos "sentido" y "antisentido", dilatadores cerebrales, psicotrópicos, dilatadores y constrictores vasculares, antihipertensivos, tratamientos para la migraña, agentes hiper o hipoglicémicos, agentes minerales o nutricionales, fármacos contra la obesidad, anabólicos y antiasmáticos, fármacos antiinflamatorios tales como fenilbutazona, indometacina, naproxeno, ibuprofeno, flurbiprofeno, diclofenaco, dexametasona, prednisona y prednisolona; vasodilatadores cerebrales tales como soloctidilum, vincamina, oxalato de naftidrofurilo, mesilato de codergocrina, ciclandelato, papaverina, ácido nicotínico, agentes antiinfecciosos tales como estearato de eritromicina y cefalexina;
hormona adrenocorticotrópica, adenosina deaminasa ribonucleasa, fosfatasa alcalina, angiotensina, anticuerpos, arginasa, arginina deaminasa, asparaginasa, caeruleína, calcitonina, quimiotripsina, colecistoquinina, factores de coagulación, dinorfinas, endorfinas, endorfinas, encefalinas, encefalinas, eritropoyetina, péptido liberador de gastrina, glucagón, hemoglobina, factores de liberación hipotalámica, interferón, katacalcina, motilina, neuropéptido Y, neurotensina, opioides no naturales, oxitosina, papaína, hormona paratiroidea, péptidos prolactina, CD-4 soluble, somatomedina, somatostatina, somatostatina, somatotropina, superóxido dismutasa, hormona estimulante de la tiroides, activador del plasminógeno tisular, tripsina, vasopresina y análogos de tales péptidos, así como otras enzimas, hormonas, proteínas, polipéptidos, conjugados enzima-proteína, conjugados anticuerpo-hapteno, epítopos víricos, etc. adecuados.

V. Formatos de polipéptidos ejemplares

Los ejemplos de formatos de moléculas de unión se exponen en las figuras adjuntas. Por ejemplo, la Fig. 1 incluye

ejemplos en los que el resto farmacéuticamente activo no se ilustra (por ejemplo, las estructuras de FC5Fc y FcFC5 a las que se pueden añadir restos farmacéuticamente activos) así como los ejemplos en los que el resto farmacéuticamente activo es un sitio de unión del anticuerpo. Por ejemplo, en una realización, una estructura de una molécula de unión (es decir, una construcción a la que puede añadirse un resto farmacéuticamente activo) comprende dos restos que transmigran la BHE unidos covalentemente (por ejemplo, fusionados genéticamente) a una región, dominio o resto Fc. Los restos que transmigran la BHE se pueden unir directamente o mediante un péptido conector. En un aspecto preferido, los restos que transmigran la BHE pueden estar unidos al extremo N-terminal de la región, dominio o resto Fc. En un aspecto, los restos de unión adicionales (por ejemplo, restos farmacológicamente activos diferentes de TMEM30A en forma de moléculas scFv) también se pueden unir al extremo C-terminal de la región, dominio o resto Fc.

En otro aspecto, los restos que transmigran la BHE pueden estar unidos al extremo C-terminal de la región, dominio o resto Fc. Los restos que transmigran la BHE se pueden unir directamente o mediante un péptido conector.

En otro aspecto, una molécula de unión comprende un resto que transmigra la BHE fusionado en el extremo N-terminal al dominio VH de una molécula de anticuerpo intacta. En otro aspecto, una molécula de unión comprende un resto que transmigra la BHE fusionado en el extremo N-terminal al dominio VL de una molécula de anticuerpo intacta. En otro aspecto adicional, una molécula de unión comprende dos restos que transmigran la BHE fusionado en el extremo C-terminal a una molécula de anticuerpo intacta. Los restos que transmigran la BHE se pueden unir directamente o mediante un péptido conector.

Se entenderá que los restos farmacéuticamente activos (o restos farmacológicamente activos adicionales) se pueden unir a cualquiera de estos constructos mediante procedimientos conocidos en la técnica.

En una realización, los polipéptidos de la invención comprenden solo un resto farmacéuticamente activo (que crea una molécula que es monomérica con respecto al resto farmacéuticamente activo, pero que es multimérica (por ejemplo, dimérica) con respecto a los restos que transmigran la BHE). En otra realización, un polipéptido de la invención comprende más de un resto farmacológicamente activo, por ejemplo, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más restos farmacológicamente activos. Los restos farmacéuticamente activos pueden ser iguales o diferentes.

En una realización de la invención, un resto farmacéuticamente activo está unido operativamente mediante un péptido enlazador al extremo N-terminal de un dominio, región o resto Fc. En otra realización, el resto farmacológicamente activo está unido operativamente mediante un péptido enlazador al extremo C-terminal de un dominio, región o resto Fc.

En otras realizaciones, dos o más restos farmacéuticamente activos están unidos entre sí (p. ej., mediante un péptido conector) en serie. En una realización, la matriz tándem de restos farmacéuticamente activos está operativamente unida mediante un péptido conector al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de una región, dominio o resto Fc.

Otros procedimientos para conjugar, unir y acoplar proteínas a compuestos farmacológicamente activos son bien conocidos en el campo. Por ejemplo, véase Wu A M, Senter P D, Arming antibodies: prospects and challenges for immunoconjugates, Nat. Biotechnol. 2005 Septiembre; 23(9):1137-46 y Trail P A, King H D, Dubowchik G M, Monoclonal antibody drug immunoconjugates for targeted treatment of cancer, Cancer Immunol Immunother. 2003 Mayo; 52(5):328-37;Saito G, Swanson J A, Lee K D. Drug delivery strategy utilizing conjugation via reversible disulfide linkages: role and site of cellular reducing activities, Adv Drug Deliv Rev. 2003 Feb. 10; 55(2):199-215. Además, los presentes anticuerpos pueden proporcionarse en combinación con liposomas, nanopartículas u otros vehículos análogos cargados con un compuesto farmacéuticamente activo. Los procedimientos de preparación de dichas composiciones son conocidos en el campo (véase, por ejemplo,Sugano y col., Antibody Targeting of Doxorubicin-loaded Liposomes Suppresses the Growth and Metastatic Spread of Established Human Lung Tumor Xenografts in Severe Combined Immunodeficient Mice Cancer Research 60, 6942-6949, Dec. 15, 2000 y Martin y col., Nanomaterials in Analytical Chemistry, Analytical Chemistry News & Features, 1 de mayo, 1998; págs. 322 A-327 A).

Muchas moléculas efectoras carecen de grupos funcionales adecuados a los que se pueden unir polipéptidos de unión. En una realización, una molécula efectora, por ejemplo, un fármaco o profármaco está unido al polipéptido mediante una molécula de unión. En una realización, la molécula de unión contiene un enlace químico que permite la activación de la citotoxicidad en un sitio particular. Los enlaces químicos adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen enlaces disulfuro, enlaces lábiles frente a ácidos, enlaces fotolábiles, enlaces lábiles frente a peptidasa, enlaces tioéter formados entre grupos sulfhidrilo y maleimida, y enlaces lábiles frente a esterasa. Más

preferentemente, la molécula de enlace comprende un enlace disulfuro o un enlace tioéter. De acuerdo con la invención, la molécula de enlace comprende preferentemente un grupo químico reactivo. Los grupos químicos reactivos particularmente preferidos son ésteres de N-succinimidilo y ésteres de N-sulfosuccinimidilo. En una realización preferida, el grupo químico reactivo se puede unir covalentemente al efector por enlace disulfuro entre grupos tiol. En una realización, se modifica una molécula efectora para que comprenda un grupo tiol. Un experto habitual en la materia apreciará que un grupo tiol contiene un átomo de azufre unido a un átomo de hidrógeno y normalmente también se denomina en la técnica como grupo sulfhidrilo, que se puede indicar como "--SH" o "RSH".

En una realización, se puede usar una molécula de unión para unir una molécula efectora con un polipéptido de la invención. La molécula de enlace puede ser escindible o no escindible. En una realización, la molécula de unión escindible es una molécula de unión escindible por redox, de manera que la molécula de unión sea escindible en entornos con un potencial redox inferior, tal como el citoplasma y otras regiones con concentraciones más altas de moléculas con grupos sulfhidrilo libres. Los ejemplos de moléculas de unión que pueden escindirse debido a un cambio en el potencial redox incluyen aquellos que contienen disulfuros. El estímulo de escisión puede proporcionarse tras la absorción intracelular de la proteína de unión de la invención en la que el potencial redox inferior del citoplasma facilita la escisión de la molécula de unión. En otra realización, una disminución del pH desencadena la liberación de la carga del maitansinoide en la célula diana. La disminución del pH está implicada en muchos procesos fisiológicos y patológicos, como el tráfico de endosomas, el crecimiento tumoral, la inflamación y la isquemia miocárdica. El pH desciende desde un valor fisiológico de 7,4 a 5-6 en los endosomas o de 4-5 en los lisosomas. Los ejemplos de moléculas de unión sensibles a los ácidos que pueden usarse para atacar los lisosomas o los endosomas de las células cancerosas incluyen aquellos con enlaces escindibles por ácido, como los que se encuentran en acetales, cetales, ortoésteres, hidrazonas, tritiles, cis-aconitilos o tiocarbamoilos (véase, por ejemplpo, Willner y col., (1993), Bioconj. Chem., 4: 521-7;Patente;patente de los EE. UU. N.º 4,569,789,4,631,190,5,306,809, y 5,665,358). Otros ejemplos de moléculas de unión sensibles a ácidos comprenden secuencias dipeptídicasPhe-Lys y Val-Lys (King y col., (2002), J. Med. Chem., 45: 4336-43). El estímulo de escisión puede proporcionarse después del tráfico de captación intracelular a compartimentos endosómicos de pH bajo (por ejemplo, lisosomas). Otras ejemplos de moléculas de unión escindibles por ácido son las moléculas que contienen dos o más enlaces escindibles por ácido para la unión de dos o más maitansinoides (King y col., (1999), Bioconj. Chem., 10: 279-88;WO 98/19705).

Las moléculas de unión escindibles pueden ser sensibles a agentes de escisión suministrados biológicamente que están asociados con una célula diana particular, por ejemplo, enzimas lisosómicas o asociadas a tumores. Los ejemplos de moléculas de unión que pueden escindirse enzimáticamente incluyen, pero sin limitación, péptidos y ésteres. Los ejemplos de moléculas de unión escindibles por enzimas incluyen aquellas que son sensibles a las proteasas asociadas a tumores tales como la catepsina B o la plasmina.(Dubowchik y col., (1999), Pharm. Ther., 83: 67-123; Dubowchik y col., (1998), Bioorg. Med. Chem. Lett., 8: 3341-52;de Groot y col., (2000), J. Med. Chem., 43: 3093-102; de Groot y col.,(1999)m 42: 5277-83). Los sitios escindibles por catepsina B incluyen las secuencias dipeptídicas valina-citrulina y fenilalanina-lisina (Doronina y col., (2003), Nat. Biotech., 21(7): 778-84); Dubowchik y col., (2002), Bioconjug. Chem., 13: 855-69). Otros ejemplos de sitios escindibles por enzimas incluyen aquellos formados por secuencias oligopéptidas de 4 a 16 aminoácidos (por ejemplo, Suc-β-Ala-Leu-Ala-Leu) que son reconocidos por proteasas de trouse como la oliogopeptidasa Thimet (TOP), una enzima que es liberada preferentemente por neutrófilos, macrófagos y otros granulocitos.

En ciertos aspectos particulares, un polipéptido de unión de la invención es multiespecífico, por ejemplo, tiene al menos un sitio de unión que se une a una primera molécula o epítopo de una molécula y al menos un segundo sitio de unión que se une a una segunda molécula o a un segundo epítope de la primera molécula. Las moléculas de unión multiespecíficas de la invención pueden comprender al menos dos sitios de unión. En ciertas realizaciones, al menos dos sitios de unión de una molécula de unión multiespecífica de la invención son sitios de transmigración de la BHE.

VI. Síntesis de moléculas de unión

Habiendo seleccionado el formato de un polipéptido de la invención, están disponibles una variedad de procedimientos para producir el polipéptido. Dichos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, técnicas de síntesis química y técnicas de expresión de ADN recombinante.

En un aspecto, la descripción se refiere a una construcción de ácido nucleico que comprende una secuencia de ácido nucleico que codifica una molécula polipeptídica de la invención. Se entenderá que debido a la degeneración del código, una variedad de secuencias de ácido nucleico codificará la secuencia de aminoácidos del polipéptido. El polinucleótido deseado puede producirse mediante procedimientos conocidos en la técnica (por ejemplo, por síntesis

de ADN en fase sólida de novo o mediante mutagénesis por PCR de un polinucleótido preparado anteriormente que codifica el polipéptido diana).

La mutagénesis mediada por oligonucleótidos es un procedimiento para preparar una sustitución, inserción en marco o alteración (por ejemplo, codón alterado) para introducir un codón que codifica una sustitución de aminoácido (por ejemplo, en un resto variante de Fc). Por ejemplo, el ADN polipeptídico de partida se altera hibridando un oligonucleótido que codifica la mutación deseada con un molde de ADN monocatenario. Después de la hibridación, se usa una ADN polimerasa para sintetizar una segunda hebra complementaria completa de la plantilla que incorpora el cebador oligonucleotídico. En un aspecto, la ingeniería genética, por ejemplo, la mutagénesis por PCR basada en cebadores, es suficiente para incorporar una alteración, como se define en el presente documento, para producir un polinucleótido que codifica un polipéptido de la invención.

Para la producción recombinante, se inserta una secuencia de polinucleótidos que codifica el polipéptido en un vehículo de expresión apropiado, es decir, un vector que contiene los elementos necesarios para la transcripción y traducción de la secuencia de codificación insertada, o en el caso de un vector de ARN viral, los elementos necesarios para la replicación y la traducción.

El ácido nucleico que codifica el polipéptido se inserta en el vector en el marco de lectura correcto. El vector de expresión se transfecta a continuación en una célula diana adecuada que expresará el polipéptido. Las técnicas de transfección conocidas en la técnica incluyen, pero no se limitan a, precipitación de fosfato cálcico (Wigler y col. 1978, Cell 14: 725) y electroporación (Neumann y col. 1982, EMBO, J. 1: 841). Se puede usar una variedad de sistemas de vectores de expresión del huésped para expresar el polipéptido descrito en el presente documento en células eucarióticas. En un aspecto, la célula eucariótica es una célula animal, que incluye células de mamífero (por ejemplo, células CHO, BHK, Cos, HeLa). Cuando el polipéptido se expresa en una célula eucariota, el ADN que codifica el polipéptido también puede codificar una secuencia señal que permitirá que el polipéptido se secrete. Un experto en la técnica entenderá que, mientras que la proteína se traduce, la secuencia señal es escindida por la célula para formar el polipéptido maduro. En una realización, la invención se refiere a polipéptidos maduros que comprenden un péptido conector de la invención. Como alternativa, cuando no se incluye una secuencia señal, se puede recuperar el polipéptido al lisar las células.

El polipéptido de la invención también se puede sintetizar en un animal transgénico, tal como un roedor, cabra, oveja, cerdo o vaca. El término "animales transgénicos" se refiere a animales no humanos que han incorporado un gen extraño en su genoma. Dado que este gen está presente en los tejidos de la línea germinal, se pasa de padres a hijos. Los genes exógenos se introducen en embriones unicelulares (Brinster y col. 1985, Proc. Natl. Acad.Sci. USA 82: 4438). Los procedimientos para producir animales transgénicos son conocidos en la técnica, incluidos los transgénicos que producen moléculas de inmunoglobulina (Wagner y col. 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 6376; McKnight y col. 1983, Cell 34: 335; Brinster y col. 1983, Nature 306: 332; Ritchie y col. 1984, Nature 312: 517; Baldassarre y col. 2003, Theriogenology 59: 831; Robl y col. 2003, Theriogenology 59: 107; Malassagne y col. 2003, Xenotransplantation 10 (3): 267).

Los vectores de expresión pueden codificar etiquetas que permitan una fácil purificación o identificación del polipéptido producido de manera recombinante. Los ejemplos incluyen, pero sin limitación, el vector pUR278 (Ruther y col. 1983, EMBO J. 2: 1791) en el que el polipéptido descrito en la presente memoria, la secuencia codificante puede ligarse en el vector en fase con la región codificante lac z, de manera que se produce una proteína híbrida; los vectores pGEX pueden usarse para expresar proteínas con una etiqueta de glutatión S-transferasa (GST). Estas proteínas son generalmente solubles y pueden purificarse fácilmente de las células por adsorción a las columnas de glutatión-agarosa, seguidas de elución en presencia de glutatión libre. Los vectores incluyen sitios de escisión (por ejemplo PresCission Protease (Pharmacia, Peapack, N. J.)) para la eliminación fácil de la etiqueta después de la purificación.

Para los propósitos de la presente invención, se pueden emplear numerosos sistemas diferentes de vectores de expresión reconocidos en la técnica.

Estos vectores de expresión son normalmente replicables en los organismos hospedadores como episomas o como parte integral del ADN cromosómico del huésped. Los vectores de expresión pueden incluir secuencias de control de la expresión que incluyen, pero no se limitan a, promotores (por ejemplo, promotores heterólogos o asociados de forma natural), potenciadores, secuencias señal, señales de empalme, elementos potenciadores y secuencias de terminación de la transcripción. Preferentemente, las secuencias de control de la expresión son sistemas promotores eucarióticos en vectores capaces de transformar o transfectar células hospedadoras eucariotas. Los vectores de expresión también pueden utilizar elementos de ADN que se derivan de virus animales tales como virus del papiloma

bovino, virus del polioma, adenovirus, virus vaccinia, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV o MOMLV), citomegalovirus (CMV) o virus SV40. Otros implican el uso de sistemas policistrónicos con sitios de unión a ribosomas internos.

Habitualmente, los vectores de expresión contienen marcadores de selección (por ejemplo, resistencia a ampicilina, resistencia a higromicina, resistencia a tetraciclina o resistencia a neomicina) para permitir la detección de aquellas células transformadas con las secuencias de ADN deseadas (véase, p. ej., Itakura y col., patente de los EE. UU. N.º 4,704,362). Las células que han integrado el ADN en sus cromosomas se pueden seleccionar introduciendo uno o más marcadores que permitan la selección de células hospedadoras transfectadas. El marcador puede proporcionar prototrofía a un hospedador auxótrofo, resistencia a biocidas (por ejemplo, antibióticos) o resistencia a metales pesados tales como cobre. El gen marcador seleccionable se puede unir directamente a las secuencias de ADN que se van a expresar, o introducir en la misma célula mediante cotransformación. Los polipéptidos de la presente invención se pueden expresar mediante construcciones policistrónicas. En estos sistemas de expresión, pueden producirse múltiples productos génicos de interés, tales como múltiples polipéptidos de proteína de unión a multímeros, a partir de una única construcción policistrónica. Estos sistemas usan ventajosamente un sitio interno de entrada al ribosoma (IRES) para proporcionar niveles relativamente altos de polipéptidos de la invención en células hospedadoras eucariotas. Las secuencias de IRES compatibles se describen en la patente de los EE. UU. N.º 6,193,980 que también se incorpora a la presente memoria. Los expertos en la técnica apreciarán que dichos sistemas de expresión se pueden usar para producir de forma efectiva la gama completa de polipéptidos descritos en la presente solicitud.

Más en general, una vez que se ha preparado el vector o la secuencia de ADN que codifica un polipéptido, el vector de expresión se puede introducir en una célula hospedadora apropiada. Es decir, las células hospedadoras pueden transformarse. La introducción del plásmido en la célula hospedadora se puede llevar a cabo mediante diversas técnicas bien conocidas por los expertos en la técnica. Estos incluyen, pero no se limitan a, transfección (que incluye electroforesis y electroporación), fusión de protoplastos, precipitación con fosfato de calcio, fusión celular con ADN con envoltura, microinyección e infección con virus intactos. Véase,Ridgway, A. A. G. "Mammalian Expression Vectors" Chapter 24.2, págs. 470-472 Vectors, Rodriguez y Denhardt, eds. (Butterworths, Boston, Mass. 1988). Lo más preferible es la introducción del plásmido en el anfitrión por electroporación. Las células transformadas se cultivan en condiciones adecuadas para la producción de cadenas ligeras y cadenas pesadas, y se someten a ensayo para la síntesis de proteínas de cadena pesada y/o ligera. Las técnicas de ensayo ejemplares incluyen ensayo de inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA), radioinmunoensayo (RIA), o análisis de clasificador de células activado por fluorescencia (FACS), inmunohistoquímica y similares.

Como se usa en el presente documento, el término "transformación" se usará en un sentido amplio para referirse a la introducción de ADN en una célula hospedadora receptora que cambia el genotipo y en consecuencia da como resultado un cambio en la célula receptora.

En la misma línea, "células hospedadoras" se refiere a células que se han transformado con vectores construidos mediante técnicas de ADN recombinante y que codifican al menos un gen heterólogo. En las descripciones de procedimientos para el aislamiento de polipéptidos de huéspedes recombinantes, los términos "célula" y "cultivo celular" se usan indistintamente para indicar la fuente del polipéptido, a menos que se especifique claramente lo contrario. En otras palabras, la recuperación del polipéptido de las "células" puede significar tanto de células enteras centrifugadas, como del cultivo celular que contiene tanto el medio como las células suspendidas.

La línea celular hospedadoras que se usa para la expresión de proteínas es muy preferentemente de origen mamífero; a los expertos en la técnica se les atribuye la capacidad de determinar de forma preferente líneas celulares hospedadoras particulares que son las más adecuadas para que el producto génico deseado se exprese en ellas. Ejemplos de líneas celulares hospedadoras incluyen, pero no están limitadas a, DG44 y DUXB11 (líneas de ovario de hámster chino, DHFR minus), HELA (carcinoma de cuello uterino humano), CVI (línea de riñón de mono), COS (un derivado de CVI con antígeno T de SV40) , R1610 (fibroblasto de hámster chino) BALBC/3T3 (fibroblastos de ratón), HAK (línea de riñón de hámster), SP2/O (mieloma de ratón), P3x63-Ag3.653 (mieloma de ratón), BFA-1c1BPT (células endoteliales de bovino), RAJI (linfocito humano) y 293 (riñón humano). Las células CHO son particularmente preferidas. Por lo general, las líneas celulares hospedadoras están disponibles en los servicios comerciales, la American Tissue Culture Collection o la bibliografía publicada.

Los genes que codifican los polipéptidos de la invención también pueden expresarse en células que no son de mamífero tales como bacterias o levaduras o células vegetales. A este respecto, se apreciará que también pueden transformarse diversos microorganismos unicelulares no mamíferos, tales como bacterias; es decir, aquellos que pueden crecer en cultivos o fermentación. Las bacterias, que son susceptibles de transformación, incluyen miembros

de las enterobacteriáceas, tales como cepas de Escherichia coli o Salmonella; Bacillaceae, tal como Bacillus subtilis; Pneumococcus; Streptococcus y Haemophilus influenzae. Se apreciará adicionalmente que, cuando se expresan en bacterias, los polipéptidos normalmente se vuelven parte de los cuerpos de inclusión. Los polipéptidos se deben aislar, purificar y luego ensamblar en moléculas funcionales.

Además de procariotas, también pueden usarse microbios eucariotas. Saccharomyces cerevisiae, o la levadura de panadería común, es el que más habitualmente se usa entre los microorganismos eucariotas, aunque varias otras cepas están disponibles habitualmente. Para la expresión en Saccharomyces, se usa habitualmente el plásmido YRp7, por ejemplo, (Stinchcomb y col., Nature, 282:39 (1979);Kingsman y col., Gene, 7:141 (1979);Tschemper y col., Gene, 10:157 (1980)). Este plásmido ya contiene el gen TRP1 que proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, N.º 44076 o PEP4-1 (Jones, Genetics, 85:12 (1977)). La presencia de la lesión trpl como una característica del genoma de la célula hospedadora de la levadura proporciona entonces un entorno efectivo para detectar la transformación por crecimiento en ausencia de triptófano. También se pueden emplear otros huéspedes de levadura tales como Pichia. Vectores de expresión de levadura que tienen secuencias de control de la expresión (por ejemplo, promotores), un origen de replicación, secuencias de terminación y similares según se desee. Los promotores típicos incluyen 3-fosfoglicerato quinasa y otras enzimas glicolíticas. Los promotores de levadura inducibles incluyen, entre otros, promotores de la alcohol deshidrogenasa, el citocromo C y las enzimas responsables de la utilización de metanol, maltosa y galactosa.

Como alternativa, las secuencias de nucleótidos que codifican los polipéptidos pueden incorporarse en transgenes para la introducción en el genoma de un animal transgénico y la posterior expresión en la leche del animal transgénico (véase, p.ej.,Deboer y col., US 5,741,957,Rosen, US 5,304,489, yMeade y col., US 5,849,992). Los transgenes adecuados incluyen secuencias codificantes para polipéptidos en enlace operable con un promotor y potenciador de un gen específico de glándula mamaria, tal como caseína o beta lactoglobulina.

La producción *in vitro* permite la ampliación para dar grandes cantidades de los polipéptidos deseados. Las técnicas para el cultivo de células a gran escala de mamíferos en condiciones de cultivo tisular son conocidas en la técnica e incluyen un cultivo en suspensión homogéneo, p. ej., en un reactor de transporte aéreo o en un reactor de agitación continua, o cultivo celular inmovilizado o atrapado, p. ej., en fibras huecas, microcápsulas, microperlas de agarosa o cartuchos cerámicos. Si es necesario y/o se desea, las soluciones de polipéptidos pueden purificarse mediante los métodos de cromatografía habituales, por ejemplo filtración en gel, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía en DEAE-celulosa o cromatografía de (inmuno)afinidad, por ejemplo, después de la biosíntesis preferente de un polipéptido de una región de bisagra sintética o antes o después de la etapa de de interacción hidrofóbica (HIC) descrita en el presente documento. Una secuencia de etiqueta de afinidad (por ejemplo, una etiqueta His (6)) se puede unir o incluir opcionalmente dentro de la secuencia polipeptídica para facilitar la purificación cadena abajo.

Un experto en la técnica puede sintetizar fácilmente péptidos más pequeños para su uso en relación con la invención. Los procedimientos estándar para preparar péptidos sintéticos son bien conocidos en la técnica. Los péptidos se pueden sintetizar usando el método de síntesis de péptidos en fase sólida (SPPS) de Merrifield (J. Am. Chem. Soc., 85:2149 (1964)) o mediante métodos de solución estándar bien conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Bodanzsky, M., Principles of Peptide Synthesis 2ª revisión ed. (Springer-Verlag, 1988 y 1993)). Como alternativa, se pueden usar técnicas simultáneas de síntesis de péptidos múltiples (SMPS) bien conocidas en la técnica. Los péptidos preparados mediante el procedimiento de Merrifield se pueden sintetizar usando un sintetizador de péptidos automático tal como el sintetizador de péptidos 431 A-01 de Applied Biosystems (Mountain View, CA) o mediante la técnica manual de síntesis de péptidos descrita por Houghten, Proc. Nat. Acad. Sci., USA 82:5131(1985). Los péptidos se pueden sintetizar usando aminoácidos o análogos de aminoácidos, cuyos grupos activos están protegidos según sea necesario mediante, por ejemplo, un grupo t-butildicarbonato (t-BOC) o un grupo fluorenilmetoxi carbonilo (FMOC). Los aminoácidos y análogos de aminoácidos pueden adquirirse comercialmente (Sigma Chemical Co. Advanced Chemtec) o sintetizarse mediante procedimientos conocidos en la técnica. Los péptidos sintetizados mediante el método de fase sólida se pueden unir a resinas que incluyen 4-metilbenzhidrilamina (MBHA), 4-(oximetil)-fenilacetamidometilo y 4-(hidroximetil)fenoximetil-copoli (estireno-1 % de divinilbenceno) (resina de Wang), todos ellos están disponibles comercialmente, o al polímero de p-nitrobenzofenona oxima (resina de oxima), que se puede sintetizar como está descrito por De Grado y Kaiser, J. Org. Chem. 47:3258 (1982).

VII. Purificación de moléculas de unión

Una vez expresados, los polipéptidos de la invención se pueden purificar según los procedimientos estándar en la

técnica, que incluyen, por ejemplo, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía en columna de afinidad, purificación por HPLC, electroforesis en gel y similares (véase en términos generales Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, N.Y., (1982)). Un péptido recién sintetizado también puede purificarse mediante un procedimiento como la cromatografía líquida de alta resolución en fase inversa (RP-HPLC) u otros procedimientos de separación basados en el tamaño o la carga del péptido. Además, el péptido purificado puede caracterizarse usando estos y otros procedimientos bien conocidos tales como el análisis de aminoácidos y la espectrometría de masas.

Se prefieren proteínas sustancialmente puras de al menos aproximadamente un 90 a un 95 % de homogeneidad, y más preferentemente de un 98 a un 99 % o más de homogeneidad, para usos farmacéuticos.

VIII. Métodos de administración

Los procedimientos para preparar polipéptidos de la invención y administrarlos a un sujeto son bien conocidos o pueden determinarse fácilmente por los expertos en la técnica.

Las composiciones para administración a un sujeto incluyen moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica una molécula de unión de la invención (para aplicaciones de terapia génica) así como moléculas de polipéptido.

Los métodos de introducción incluyen, pero no se limitan a, vías intradérmica, intramuscular, intraperitoneal, intravenosa, subcutánea, intranasal, epidural y oral. Los conjugados pueden administrarse mediante cualquier ruta conveniente, por ejemplo, mediante infusión o inyección en bolo, mediante absorción a través de revestimientos epiteliales o mucocutáneos (por ejemplo, mucosa oral, mucosa rectal e intestinal, etc.) y se pueden administrar junto con otros agentes farmacológicamente activos. La administración puede ser sistémica o local.

En ciertas circunstancias, puede ser deseable introducir las composiciones farmacéuticas de la invención directamente en el sistema nervioso central por cualquier ruta adecuada, que incluye inyección intraventricular e intratecal; la inyección intraventricular puede ser facilitada por un catéter intraventricular, por ejemplo, unido a un depósito, tal como un depósito de Ommaya.

La administración pulmonar o nasal también puede emplearse, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y la formulación con un agente aerosolizante.

En otra realización, los conjugados se pueden administrar en un sistema de liberación controlada. En una realización, se puede usar una bomba (véase Langer, supra; Sefton, CRC Crit. Ref. Biomed. Eng. 14:201 (1987); Buchwald y col., Surgety 88:507 (1980);Saudek y col., N. Engl. J. Med. 321:574 (1989)). En otra realización más, se puede colocar un sistema de liberación controlada cerca de la diana terapéutica, es decir, el cerebro, requiriendo así solo una fracción de la dosis sistémica (véase, p.ej., Goodson, en Medical Applications of Controlled Release, supra, vol. 2, págs. 115-138 (1984)).

Otros sistemas de liberación controlada se describen en la revisión de Langer (Science 249:1527-1533 (1990)).

El sujeto es preferentemente un animal, que incluye, pero no se limita a, animales tales como vacas, cerdos, caballos, pollos, gatos, perros, etc., y es preferentemente un mamífero, y lo más preferentemente humano.

Habitualmente, una composición farmacéutica adecuada para inyección puede comprender un tampón (por ejemplo, tampón de acetato, fosfato o citrato), un tensioactivo (por ejemplo, polisorbato), opcionalmente un agente estabilizador (por ejemplo, albúmina humana), etc. Sin embargo, en otros procedimientos compatibles con las enseñanzas en la presente memoria, los polipéptidos pueden administrarse directamente en el sitio de la población celular adversa, aumentando así la exposición del tejido enfermo al agente terapéutico.

Las preparaciones para administración parenteral incluyen soluciones, suspensiones y emulsiones acuosas o no acuosas estériles. Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables tales como oleato de etilo. Los portadores acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones y suspensiones alcohólicas/acuosas, incluyendo solución salina y medios tamponados. En la presente invención, los vehículos farmacéuticamente aceptables incluyen, pero sin limitación, tampón de fosfato 0,01 a 0,1 M y preferentemente 0,05 M de tampón de fosfato o solución salina al 0,8 %. Otros vehículos parenterales comunes incluyen soluciones de fosfato de sodio, dextrosa de Ringer, cloruro de dextrosa y de sodio, solución láctica de Ringer, y aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de fluidos y nutrientes, reponedores de electrolitos como aquellos basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes

quelantes y gases inertes y similares.

Más particularmente, las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (cuando son solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de disoluciones o dispersiones inyectables estériles. En tales casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista facilidad de inyección. Debe ser estable en las condiciones de fabricación y almacenamiento y preferentemente se conservará frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El portador puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez adecuada se puede mantener, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones y mediante el uso de tensioactivos.

La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante la adición de varios agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes, tales como manitol, sorbitol o cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede conseguirse incluyendo en la composición un agente que retrasa la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

En cualquier caso, las soluciones inyectables estériles se pueden preparar incorporando un compuesto activo (por ejemplo, un polipéptido por sí mismo o en combinación con otros agentes activos) en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con un ingrediente o una combinación de ingredientes enumerados en el presente documento, según se requiera, seguido de esterilización por filtración. Generalmente, las dispersiones se preparan incorporando el compuesto activo a un vehículo estéril, que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de los polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los procedimientos de preparación preferidos son secado a vacío y liofilización, que producen un polvo de un ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución previamente esterilizada por filtración de los mismos. Las preparaciones para inyecciones se procesan, se introducen en recipientes tales como ampollas, bolsas, botellas, jeringas o viales, y se sellan en condiciones asépticas de acuerdo con procedimientos conocidos en la técnica. Además, las preparaciones se pueden envasar y vender en forma de un kit que preferentemente tendrá etiquetas o prospectos que indiquen que las composiciones asociadas son útiles para tratar a un sujeto que padece o está predispuesto a trastornos autoinmunes o neoplásicos.

Las dosis efectivas de las composiciones de la presente invención para el tratamiento de afecciones varían dependiendo de muchos factores diferentes, que incluyen medios de administración, el sitio diana, el estado fisiológico del paciente, si el paciente es humano o animal, otros medicamentos administrados, y si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. Habitualmente, el paciente es un ser humano pero los mamíferos no humanos que incluyen mamíferos transgénicos también pueden ser tratados.

Las dosis de tratamiento se pueden valorar mediante procedimientos de rutina conocidos por los expertos en la técnica para optimizar la seguridad y la eficacia. En una realización, un polipéptido de la invención es uno que se ha administrado previamente a pacientes, pero que se ha modificado para que comprenda un péptido conector de la invención en lugar de un péptido conector tradicional. En tales casos, la dosificación del polipéptido administrado será consistente con la que se descubrió anteriormente que es segura y efectiva, es decir, el estándar de cuidado.

Los polipéptidos de la invención se pueden administrar en múltiples ocasiones. Los intervalos entre dosis únicas pueden ser semanales, mensuales o anuales. Los intervalos también pueden ser irregulares, como se indica al medir los niveles en sangre de polipéptido, polipéptido diana o antígeno en el paciente. En algunos procedimientos, la dosificación se ajusta para alcanzar una concentración particular in vivo. Como alternativa, los polipéptidos se pueden administrar como una formulación de liberación sostenida, en cuyo caso se requiere una administración menos frecuente. La dosis y la frecuencia varían dependiendo de la semivida del polipéptido en el paciente.

La dosificación y la frecuencia de administración pueden variar dependiendo de si el tratamiento es profiláctico o terapéutico. En aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen los polipéptidos de la invención o un cóctel de los mismos se administran a un paciente que aún no está en el estado de enfermedad para potenciar la resistencia del paciente. Dicha cantidad se define como una "dosis efectiva profiláctica". Se puede administrar una dosificación relativamente baja a intervalos relativamente infrecuentes durante un período de tiempo largo. Algunos pacientes continúan recibiendo tratamiento durante el resto de sus vidas.

En aplicaciones terapéuticas, a veces se puede administrar una dosificación relativamente alta a intervalos

relativamente cortos hasta que la progresión de la enfermedad se reduzca o termine, y preferentemente hasta que el paciente muestre una mejoría parcial o completa de los síntomas de la enfermedad.

Se apreciará además que las moléculas de la presente invención se pueden usar en conjunción o en combinación con un agente o agentes (por ejemplo, para proporcionar un régimen terapéutico combinado). Los ejemplos de agentes con los que se puede combinar una molécula de la invención incluyen agentes que representan el estándar de cuidado actual para un trastorno particular que se está tratando. Dichos agentes pueden ser de naturaleza química o biológica. El término "biológico" o "agente biológico" se refiere a cualquier agente farmacéuticamente activo fabricado a partir de organismos vivos y/o sus productos que se pretende usar como un agente terapéutico.

Los polipéptidos de la invención pueden administrarse opcionalmente en combinación con otros agentes que son eficaces en el tratamiento del trastorno o afección que necesitan tratamiento (por ejemplo, profiláctico o terapéutico). Como se usa en el presente documento, la administración de polipéptidos de la invención en conjunción o combinación con una terapia adjunta significa la administración o aplicación secuencial, simultánea, coextensiva, concurrente, concomitante o contemporánea de la terapia y los polipéptidos descritos. Los expertos en la técnica apreciarán que la administración o la aplicación de los diversos componentes del régimen terapéutico combinado se puede programar para mejorar, en general, la eficacia del tratamiento. Por ejemplo, los agentes quimioterapéuticos o biológicos podrían administrarse en cursos de tratamiento estándar y bien conocidos junto con las moléculas de unión sujeto. Un experto en la técnica (por ejemplo, un médico) podría ser capaz de discernir regímenes terapéuticos combinados eficaces sin una experimentación excesiva basada en la terapia adjunta seleccionada y las enseñanzas de la presente memoria descriptiva.

En una realización, puede producirse un polipéptido en un paciente mediante la administración como una molécula de ácido nucleico. Las moléculas de ácido nucleico pueden administrarse mediante técnicas conocidas en la técnica, que pueden ser mediante vector, plásmido, liposoma, inyección de ADN, electroporación, pistola de genes, inyección intravenosa o infusión de la arteria hepática. Los vectores para su uso en realizaciones de terapia génica son conocidos en la técnica.

La cantidad de agente para su uso en combinación con los polipéptidos de la presente invención puede variar según el sujeto o puede administrarse de acuerdo con lo conocido en la técnica. Véase, por ejemplo, Bruce A Chabner y col., Antineoplastic Agents, en GOODMAN & GILMAN'S THE PHARMACOLOGICAL BASIS OF THERAPEUTICS 1233-1287 ((Joel G. Hardman y col., eds., 9ª ed. 1996). En otra realización, se administra una cantidad de dicho agente conforme al estándar de cuidado.

Como se ha descrito anteriormente, los polipéptidos de la presente invención se pueden administrar en una cantidad farmacéuticamente efectiva para el tratamiento *in vivo* de trastornos de mamíferos. A este respecto, se apreciará que la molécula de la invención se puede formular para facilitar la administración y promover la estabilidad del agente activo. Preferentemente, las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención comprenden un vehículo estéril, no tóxico y farmacéuticamente aceptable tal como una solución salina fisiológica, tampones no tóxicos, conservantes y similares. Para los fines de la presente solicitud, se debe considerar que una cantidad farmacéuticamente efectiva de un polipéptido de la invención, conjugado o no conjugado con un agente terapéutico, significa una cantidad suficiente para lograr la unión efectiva a un antígeno y para lograr un beneficio, por ejemplo, para mejorar los síntomas de una enfermedad o trastorno o para detectar una sustancia o una célula. En el caso de las células tumorales, el polipéptido será preferentemente capaz de interactuar con antígenos inmunorreactivos seleccionados en células neoplásicas o inmunorreactivas y proporcionar un aumento en la muerte de esas células. Por supuesto, las composiciones farmacéuticas de la presente invención se pueden administrar en dosis únicas o múltiples para proporcionar una cantidad farmacéuticamente efectiva del polipéptido.

De acuerdo con el alcance de la presente descripción, la molécula de la invención puede administrarse a un ser humano u otro animal de acuerdo con los procedimientos de tratamiento mencionados anteriormente en una cantidad suficiente para producir un efecto terapéutico o profiláctico.

La manera de administración y las formas de dosificación afectarán, por supuesto, a las cantidades terapéuticas de los compuestos que son deseables y eficaces para la aplicación de tratamiento dada. Una cantidad terapéuticamente efectiva es una cantidad necesaria para prevenir, retrasar o reducir la gravedad del inicio de la enfermedad, o una cantidad necesaria para detener o reducir la gravedad de una enfermedad en curso. Será evidente para un experto en la técnica que esta cantidad variará en función de factores tales como el peso y la salud del receptor, el tipo de células que se transforman, el modo de administración de las presentes composiciones y el tipo de trastorno médico que se está tratando.

La invención también proporciona un paquete o kit farmacéutico que comprende uno o más recipientes llenos con uno o más de los ingredientes de las composiciones farmacéuticas de la invención. Opcionalmente, asociado con dicho(s) contenedor(es) puede estar un aviso en la forma prescrita por una agencia gubernamental que regula la fabricación, uso o venta de productos farmacéuticos o biológicos, cuyo aviso refleja la aprobación por parte de la agencia de fabricación, uso o venta para administración humana.

La presente invención se ilustra, además, por los siguientes ejemplos, los cuales no deben construirse como limitantes.

EJEMPLOS

Expresión, purificación y caracterización de las moléculas FC5: FC5 se expresó en E. coli y se purificó mediante choque osmótico para liberar la proteína soluble del espacio periplásmico. A continuación, se capturó el FC5 marcado con His soluble del lisado en una columna de níquel, mediante intercambio catiónico en fractogel SE, seguido de filtración en gel en Superdex 200. El camélido Vhh se caracterizó por SDS PAGE (Fig. 2a-c). FC5-Fc, Fc-FC5 y FC5-scram-Fc se expresaron en líneas celulares DG44 CHO según los procedimientos descritos previamente. Las proteínas que contienen hFc deseadas se purificaron a partir del medio de fermentación de células CHO (1 L) ajustando el pH a 7,0 y capturando la proteína en una columna HiTrap rProteinA FF de 5 ml (GE heathcare) que se había equilibrado previamente. Todas las proteínas purificadas se caracterizaron por niveles de endotoxina antes de la inyección para garantizar que no se produjera ninguna apertura de la BHE generalizada dependiente de endotoxina. Los resultados se muestran en la Tabla I. Los péptidos neuroactivos, dalargina, galanina o NPY se unieron a la molécula deseada (FC5, FC5-Fc) usando sulfosuccinimidil-4-(N-maleidometilo)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) un conector químico bifuncional mediante los procedimientos que se describen en Utoy col. 1991 (Uto, I., Ishimatsu, T., Hirayama, H., Ueda, S., Tsuruta, J., y Kambara, T. (1991) Journal of immunological methods 138(1), 87-94). Cada péptido que se pretendía unir se sintetizó con un análogo de cisteamida en el extremo C-terminal que permitió la reticulación C-terminal del péptido por medio de la cadena libre de cisteína a las cadenas laterales de lisina en la proteína utilizando la química de reticulación bifuncional de SMCC. Después de la reticulación, se purificó cada una de las moléculas marcadas por filtración en gel preparativa S-200 para eliminar cualquier agregado formado durante la reacción de reticulación. El número promedio de péptidos dalargina, NPY o Galanina vinculados a cada dominio FC5 o dominios FC5-Fc se determinó mediante espectrometría de masas. La Tabla I muestra el número promedio de péptidos unidos por dominio FC5, FC5-Fc o Fc-FC5.

Farmacocinética en circulación de moléculas que contienen FC5: Para entender la exposición del endotelio de la BHE a cada uno de los anticuerpos que contienen FC5, se determinó la farmacocinética de las moléculas en ratas. Los animales fueron dosificados intraperitonealmente a 3 mpk con el FC5 Vhh fusionado N-terminalmente (FC5-Fc) o C-terminalmente (Fc-FC5) a un dominio humano Fc. Las concentraciones de FC5-Fc o Fc-FC5 en el plasma se determinaron en varios puntos temporales por ELISA. Los resultados fueron analizados para determinar la semivida en fase beta de cada constructo (Tabla II). Los resultados demostraron que la semivida de FC5-Fc y de Fc-FC5 es significativamente más larga cuando se fusiona con un Fc humano que cuando se fusiona con el FC5 Vhh solo, ya que es bien conocido que Fc proporciona reciclado y la mayor masa evitaría la filtración renal (Holt, L. J., Herring, C., Jespers, L. S., Woolven, B. P., y Tomlinson, I. M. (2003) Trends in biotechnology 21(11), 484-490).

La velocidad de transporte in vitro de moléculas que contienen FC5: Se utilizó una capa de células endoteliales de BHE in vitro para modelar las tasas de flujo que cruzan la BHE in vivo para cada FC5 que contiene proteína. El modelo *in vitro* usa una monocapa de células endoteliales adultas inmortalizadas del cerebro de rata (SV-ARBEC) en un sistema de ensayo monocapa validado para la estanqueidad con moléculas pequeñas (Garberg, P., Ball, M., Borg, N., Cecchelli, R., Fenart, L., Hurst, R. D., Lindmark, T., Mabondzo, A., Nilsson, J. E., Raub, T. J., Stanimirovic, D., Terasaki, T., Oberg, J. O., y Osterberg, T. (2005) Toxicol In Vitro 19(3), 299-334). Los procedimientos para las determinaciones de la tasa de vitroflujo son casi idénticos a los descritos en (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., y Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401). Los índices de entrada se determinaron para FC5, FC5-Fc y Fc-FC5 a través de la capa de células SV-ARBEC y los resultados se muestran en la Figura 3.

Afinidad de unión de moléculas FC5 para TMEM30A: La afinidad de unión de cada molécula se evaluó en ensayos de citometría de flujo fluorescente por separado usando células endoteliales de BHE de rata recién aisladas, células endoteliales BHE de rata transformadas con SV40 (Caram-Salas, N., Boileau, E., Farrington, G. K., Garber, E., Brunette, E., Abulrob, A., y Stanimirovic, D. Methods in molecular biology 763, ed. 2010, 383-401) y células Hek293 transfectadas transitoriamente con la diana TMEM30A identificada previamente. Las curvas de unión a cada línea celular se muestran en la Figura 4A-C, y los valores de afinidad calculados están en la Tabla III. Los resultados muestran que la unión de FC5Fc a células endoteliales de BHE primarias de rata tiene una afinidad de 11 nM,

mientras que la unión a la línea celular transformada con SV40 da como resultado un valor de EC50 de 75 nM, una unión aproximadamente 7 veces más débil. Mientras que la unión a la línea celular Hek293 transformada transitoriamente con TMEM30A de rata produce una afinidad de aproximadamente 1700 nM, casi 170 veces más débil que la unión a la línea de células endoteliales de BHE primaria. Estos datos muestran que FC5-Fc tiene un aumento sustancial en la afinidad aparente sobre FC5 Vhh solo cuando se mide por citometría de flujo, lo que sugiere que el FC5-Fc se une con avidez bidentada a las células que expresan TMEM-30A.

Evaluación de eficacia en modelos animales: para evaluar qué efecto tendría la dimerización del dominio Vhh de FC5 sobre la capacidad de la molécula para funcionar como transportador para entregar una carga útil molecular a través de la BHE a través de la TMR, se evaluó la actividad de estas moléculas en modelos animales. Se sabe que numerosos factores pueden afectar la eficiencia del transporte, por ejemplo, se ha informado que disminuir la afinidad de un anticuerpo contra el receptor de transferrina incluso varias veces tuvo un impacto positivo en la capacidad de la molécula para someterse efectivamente a la transmigración de la BHE (Yu, Y. J., Zhang, Y., Kenrick, M., Hoyte, K., Luk, W., Lu, Y., Atwal, J., Elliott, J. M., Prabhu, S., Watts, R. J., y Dennis, M. S. Science translational medicine 3(84), 84ra44). De acuerdo con este concepto, una mejora de afinidad significativa tras la dimerización de Fc del FC5 Vhh podría predecirse como un impacto negativo sobre la capacidad del FC5 Vhh para funcionar como una molécula efectiva de transporte de la BHE. Por lo tanto, la potencia de las moléculas a las que se había vinculado el péptido neuroactivo, teniendo cada molécula una valencia de FC5 diferente, se evaluó en un modelo in vivo.

El modelo de Hargreaves mide la sensibilidad aumentada al dolor térmico inducido por la inyección del adyuvante de Freud en una pata. El dolor térmico se puede suprimir tras la unión de dalargina, un péptido de seis aminoácidos, a los receptores de dolor mu expresados en la parte periaqueductal del cerebro. La dalargina inyectada por vía intravenosa no puede cruzar la BHE y no produce supresión del dolor, sin embargo, la inyección de ICV permite que la dalargina se difunda a los receptores mu y bloquee los receptores mu y bloquee de esa manera el dolor. Por lo tanto, la dalargina inyectada por vía intravenosa debe estar vinculado a un transportador mediado por receptor para permitir el transporte a través de la BHE y la supresión del dolor. Para evaluar el transporte de dalargina mediado por moléculas que contienen FC5 a través de la BHE, se utilizó el modelo animal de Hargreaves para comparar la potencia de diversas formas moleculares de FC5 Vhh ligadas a dalargina. La molécula de control negativo para FC5-Dalargina fue EG2-Dalargina y para FC5-Fc-Dalargina lo fue Fc-FC5-Dalargina.

Para asegurar la comparabilidad de los artículos de prueba positivos y negativos, FC5-Dal y EG2-Dal se caracterizaron por espectrometría de masas para mostrar que la relación de péptidos de dalargina vinculados a cada Vhh era comparable (Tabla I).

Antes de la inyección intravenosa (IV), cada molécula se probó inicialmente mediante inyección intracerebroventricular (ICV) como un control positivo para asegurar que todas las moléculas unidas sean funcionalmente activas y capaces de inducir la supresión del dolor. Se esperaría que tanto el control negativo como las moléculas de prueba positiva supriman el dolor tras la inyección de ICV, ya que las moléculas se inyectan directamente en el líquido cefalorraquídeo y pueden difundir y bloquear los receptores periaqueductales de dolor mu. En todos los casos, cuando se evaluó mediante inyección de ICV, FC5-Dal, EG2-Dal, FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal o solo dalargina dieron una potencia similar en función de la cantidad de dalargina administrada. A continuación, se evaluó la eficacia de cada molécula marcada con dalargina y la correspondiente proteína de control marcada con dalargina tras la administración IV. Inicialmente, se comparó la eficacia de FC5-Dal frente al control (EG2-Dal). Los resultados muestran una supresión total del dolor similar al nivel de supresión que se puede observar con la morfina sola (Figuras 5a y b). Es interesante observar que tres dosis de FC5-Dal a 7,5 mg por kg (mpk) por dosis son necesarias antes de observar la supresión inicial del dolor. Además, el grupo de control no mostró supresión del dolor incluso después de que los animales recibieron una dosis similar tres veces a 7,5 mg por kg (mpk). Estos datos demuestran y confirman que FC5 es capaz de funcionar como transportador mediado por receptor, transportando dalargina a través de la BHE al parénquima cerebral y permitiendo que dalargina se una y bloquee los receptores de dolor mu, mientras que el control EG2-Dalargina no mostró supresión del dolor. Estos datos se resumen en la Tabla IV.

Las formas FC5 dimerizadas, FC5-Fc y Fc-FC5, demostraron afinidades de unión muy diferentes para TMEM 30A en células endoteliales de la BHE (Tabla III). Para determinar si la afinidad mejorada se correlacionaba con una potencia mejorada en el modelo de dolor de Hargreaves, se evaluó tanto FC5-Fc-dal como Fc-FC5-dal para la supresión del dolor. Después de la inyección IV, Fc-FC5-dal no mostró eficacia (Figura 6a-d), mientras que FC5-Fc-dal (Figuras 7a y 7c) fue altamente eficaz en la supresión del dolor. Además, el control negativo de Fc-Dal no mostró eficacia in vivo (Figuras 7b y 7d). FC5-Fc mostró eficacia en la reducción del dolor en la primera hora, incluso con una dosis única inicialmente a 0,5 mpk, con un promedio de EMP del 50 % después de las primeras 0,5 h.

Comparando la potencia de FC5-dal con FC5-Fc-dal, los resultados mostraron que una dosis única de FC5-dal a 21 mpk daba aproximadamente el mismo nivel de supresión del dolor que FC5-Fc-Dal a 0,5 mpk. En base a la relación molar de dalargina inyectada, FC5Fc-Dal muestra una potencia 80 veces mayor que FC5-Dal en la capacidad de suprimir el dolor en el modelo de Hargreaves. Una segunda dosis de FC5-Fc-Dal a 2,5 mpk fue suficiente en un animal para proporcionar la máxima supresión posible del dolor. La actividad biológica potenciada de FC5-Fc-Dal, Fc-FC5-Dal y FC5-Dal observada en el modelo de dolor de Hargreaves correlaciona la mayor afinidad y mayor eficacia de FC5-Fc que se resume en la Tabla II.

Además, se pueden lograr eficacias similares para la supresión del dolor mediante otros péptidos neuroactivos. Por ejemplo, galanina, un péptido de 3,2 kDa de 29 aminoácidos unido a FC5 o FC5-Fc, con una química idéntica a la descrita anteriormente, suprimió el dolor crónico en el modelo de Hargreaves. Por el contrario, la galanina vinculada al Fc solo no fue capaz de proporcionar un alivio efectivo del dolor. Los resultados para el control positivo de ICV y las inyecciones IV se resumen en la Tabla VI. Para validar la actividad de la galanina enlazada para unirse a sus receptores afines GalR1 y GalR2 y suprimir el dolor tanto en el control negativo como en las moléculas de prueba, se probaron todas las moléculas y se demostró que suprimían el dolor después de la inyección ICV (Tabla VI). Cuando se inyectó IV, solo la galanina unida a las moléculas que contenían FC5, FC5 o FC5-Fc pudieron suprimir el dolor in vivo. Hubo una diferencia significativa en la dosificación de galanina unida a FC5 frente a FC5-Fc requerida para reducir el dolor en el modelo animal de Hargreaves. El galanina-FC5 en una dosis única de 6 mpk (Tabla VI) dio como resultado un EMP del 8 %, mientras que una dosis única de FC5-Fc-Gal dio como resultado un EMP del 45 %.

La administración intraperitoneal de pentilenotetrazol (PTZ) induce convulsiones en ratas y se ha usado como modelo de ataques eplilépticos (Chen, J.W.; Naylor, D.E.; Wasterlain, C.G. Advances in the pathophysiology of status epilepticus. Acta Neurol. Scand. Suppl., 2007, 186, 7-15.; Werner, F.M.; Coveñas, R. Neuropeptides involved in schizophrenia, Curr. Top. Neurochem., 2005, 4, 35-49.; Werner, F.M.; Coveñas, R. En: Focus on Neuropeptide Research, Coveñas, Mangas and Narváez, Eds.; Transworld Reasearch Network: Trivandrum, 2007; págs. 299-339; Werner, F.M.; Coveñas, R. Classical neurotransmiters and neuropeptides involved in major depression. Int. J. Neurosci., 2010, 120, 455-70). Se sabe que los péptidos neuroactivos tales como galanina y neuropéptido Y proporcionan protección contra las convulsiones inducidas por PTZ (Mazarati 1998a;Mazarati, A M., Hohmann, J. G., Bacon, A, Liu, H., Sankar, R., Steiner, R. A, Wynick, D., y col. Modulation of hippocampal excitability and seizures by galanin. The Journal of neuroscience : la revista oficial de la Sociedad de Neurociencia, 2000, 20(16), 6276-81). Mazarati y col. (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. J Neurosci 1998, 18:10070 -10077.). Estos estudios mostraron que el agotamiento de galanina del hipocampo de la rata se asocia con el desarrollo del estado epiléptico autosostenible. Además, la inyección de galanina en la región del hipocampo del cerebro puede suprimir las convulsiones (Mazarati A, Liu H, Soomets U, Sankar R, Shin D, Katsumori H, Langel U, Wasterlain CG Galanin modulation of seizures and seizure modulation of hippocampal galanin in animal models of status epilepticus. J Neurosci 1998, 18:10070 -10077.;Mazarati AM, Halaszi E, Telegdy G Anticonvulsive effects of galanin administered into the central nervous system upon the picrotoxinkindled seizure syndrome in rats. Brain Res 1992, 589:164 -166.). Sin embargo, los péptidos neuroactivos administrados por vía intravenosa no pueden atravesar la BHE y tienen una semivida breve debido a su pequeño tamaño (Jain, Kamal y Batra. Trends Biotechnol. Vol 25. ed.: 2007:307-16, Batra, Jain, Wittel, Chauhan y Colcher. Curr Opin Biotechnol. Vol 13. ed.: 2002:603-8). La eficacia de galanina en el modelo PTZ se evaluó probando galanina unida tanto a FC5, el anticuerpo de dominio único, como a FC5-Fc. Aunque se espera que ambas construcciones mejoren el transporte a través de la BHE, la construcción FC5-Fc mostró una mayor afinidad práctica debido a la unión ávida a su supuesta diana TMEM30A y a tener una semivida mucho más larga debido al aumento del tamaño y al reciclado dependiente de Fc.

En el modelo de convulsión inducido por PTZ, se inyecta el agente de interés por vía intravenosa o por inyección directa en el hipocampo. La inyección en el hipocampo libera al agente directamente en el sitio de acción permitiendo que la galanina se una a sus receptores afines y bloquee el inicio de las convulsiones. Además, la inyección directa en el hipocampo de cada una de las moléculas sirve como un control positivo para mostrar que la galanina unido a cada una de las moléculas, Fc, FC5 o FC5-Fc, retiene la actividad supresora de las convulsiones. Las dosis de cada molécula administrada se variaron para dar dosis equivalentes de galanina casi molares. Para el estudio de control positivo, las ratas Wistar macho (4-6 semanas de edad) recibieron una inyección intrahipocampal de una de las siguientes opciones: Ácido valproico, Gal-Cya o FC5-Gal en un volumen final de 5 µL, seguido 15 minutos más tarde por una inyección IP de 50 mpk de PTZ para inducir las convulsiones.

Para evaluar la efectividad de la galanina unida a FC5, FC5-Fc o Fc para cruzar la BHE, se inyectó cada una de estas moléculas sistémicamente tal como se detalla en la Figura 7A y 7B. Para el estudio sistémico, las ratas recibieron 1, 2 o 3 inyecciones intravenosas (a través de la vena de la cola) de Gal-Cya o FC5-Gal, o una dosis única

de FC5-Fc-Gal o Fc-Gal. En cada caso, después de la inyección IP de PTZ a una dosis de 50 mpk, se administró por vía intraperitoneal y se registraron los movimientos de la rata durante 30 minutos.

Todos los movimientos registrados fueron revisados y el tiempo hasta el inicio de las convulsiones y los tiempos de duración de las convulsiones fueron medidos por un investigador imparcial para cada uno de los tres cambios conductuales característicos: primer espasmo mioclónico (FMJ, que se caracteriza por tics de orejas, cabeza y hombros), primera convulsión clónica (FCJ; que se caracteriza por convulsiones mínimas, clonus de los músculos de la cabeza y extremidades anteriores, movimientos involuntarios de todo el cuerpo y movimientos de salto con reflejo de enderezamiento) y primera extensión tónica generalizada (TGE; que se caracteriza por la pérdida de la capacidad de enderezamiento, flexión o extensión de miembros anteriores y posteriores y clonus de todo el cuerpo).

La Tabla VIIa muestra los resultados de las inyecciones intrahipocampales de cada molécula. La inyección IP de la PTZ a 50 mpk dio como resultado el inicio rápido de cada tipo de convulsión, mioclónico, clónico y tónico generalizado con una progresión muy rápida desde la FMJ menos grave hasta la forma más común de convulsión más generalizada. El ácido valproico, una molécula pequeña de la que se sabe que suprime parcialmente el inicio de convulsiones inducidas por PTZ, (Pollack G.M., Shen D.D. J Pharmacol Methods. (1985) Apr;13(2):135-46) retrasó significativamente los tres tipos de convulsiones, pero no previno completamente el inicio de las convulsiones, con un retraso de aproximadamente 100 segundos en el inicio de las convulsiones mioclónicas y clónicas observadas. La inyección intrahipocampal de galanina sola o ligada a FC5 dio como resultado un retraso significativo de las convulsiones mioclónicas y la prevención completa de las convulsiones clónicas más serias y tónicas generalizadas.

Los resultados obtenidos con la dosificación intravenosa de cada molécula se muestran en la Tabla VIIb. La PTZ conduce a un inicio rápido de cada tipo de convulsión y el ácido valproico a una dosis de 11,2 mpk IV suprime la aparición de las convulsiones mioclónicas y clónicas. Galanina intravenosa y Galanina-Fc, una versión de semivida corta y larga del péptido neuroactivo, dieron como resultado una demora nula o muy leve del inicio de la convulsión, respectivamente. FC5-galanina dosificada a 6 mpk, 1 h antes de la dosificación de PTZ dio como resultado un retraso significativo de la convulsión mioclónica y la supresión completa de las convulsiones clónicas y clónicas generalizadas. Una dosis única de FC5-Fc-Galanina dos horas antes de la dosificación de PTZ también dio como resultado un retraso significativo de la convulsión mioclónica y la supresión completa de las convulsiones clónicas y clónicas generalizadas.

De estos resultados, se pueden extraer varias conclusiones. La galanina unida a FC5, Fc o FC5-Fc retiene actividad equivalente como se muestra cuando se dosifica ICV en el modelo de Hargreaves (Tablas IV y V), además la Tabla VIIa muestra que FC5-galanina mostró una actividad equivalente sobre una base molar a galanina solo cuando se inyecta en el hipocampo de ratas en el modelo de convulsiones de PTZ. Por el contrario, la galanina sola o como una molécula de larga vida unida a la molécula de hFc no cruza la barrera hematoencefálica de manera efectiva ni suprime las convulsiones inducidas por PTZ. Solo cuando se acopla a FC5, ya sea como FC5-Galanina o como FC5-Fc-Galanina, la galanina puede cruzar el BHE y demorar y suprimir efectivamente las convulsiones inducidas por PTZ. La galanina unida a FC5-Fc es mucho más efectiva que la galanina unida a FC5 solo en la reducción de las convulsiones en base a una comparación de dosificación molar; específicamente, es al menos dieciséis veces más potente. Además, FC5-Fc Galanina mostró un mayor retraso en el tiempo hasta el inicio de la primera convulsión mioclónica cuando se comparó FC5-Galanina. Estos resultados indican que la semivida mejorada y el aumento de la afinidad práctica del FC5-Fc hacia su diana mejora la entrega de galanina a través de la BHE y da como resultado una reducción más eficaz de las convulsiones en el modelo de convulsión de PTZ que FC5 Galanina.

Tabla I. Caracterización de moléculas expresadas y purificadas.

Molécula plásmido	FC5[1](EAG2333)	FC5-Fc[2](EAG2345)	Fc-FC5[2](EAG2304)	Fc
Peso molecular calculado (Dalton)	15.375	78.725	78.924	51.896
Endotoxina (EU/mg)	<1	<1	<1	<1
Peso molecular calculado LS (Dalton)	16.860	77.530	78.950	57.800
% del área de pureza del pico en la SEC analítica	99,7	98,9	95,0	99,7
Péptidos de	1,5	1,5	1,5	1,0

dalargina unidos en promedio (3)				
(1) contiene la etiqueta myc EQKLISEEDL, extremos C-terminales (pm 1202), etiqueta His 5H en el extremo C-terminal (2) Los dominios Fc son IgG1 humana y agly (todos los dominios Fc contienen una mutación puntual T299A en la secuencia hIgG para eliminar la N-glicosilación de Fc) (3) evaluado por EM, para determinar el número promedio de dalarginas unidas covalentemente a los dominios FC5-Fc.				

Tabla II. Determinaciones de semivida farmacocinética de dominios FC5 fusionados a una hFc.

	FC5-Fc		Fc-FC5	hIgG1	
Formato de ensayo	Fluorescencia	ELISA	Fluorescencia	Fluorescencia	ELISA
Semivida en fase beta (h)	39,4	35,7	38,6	43,5	48

La semivida se determinó mediante detección por ELISA del Fc humano a partir de suero de rata o con moléculas marcadas con AL680 y la fluorescencia se determinó a partir de los sueros. No se observó ninguna diferencia entre las moléculas en las que la semivida se determinó mediante fluorescencia frente a ELISA. Las moléculas se inyectaron por vía intraperitoneal a 3 mpk.

Tabla III. Resumen de las afinidades de unión y eficacia relativa de FC5-Dal, FC5-Fc-Dal y Fc-FC5-Dal en el modelo de Hargreaves, que muestra la correlación de la eficacia y afinidad con células endoteliales de la BHE.

Molécula	Afinidad (nM)		
	FC5	FC5-Fc	Fc-FC5
Células endoteliales de BHE de rata primarias	>2000	11	1700
SV-ARBEC		75	ND
Células endoteliales de la aorta de rata		1700	
Potencia en número de veces comparado con FC5-Dal en el modelo de Hargreaves	1	80	<0,1

Tabla IV. Resumen de la supresión del dolor crónico en el modelo de Hargreaves por dalargina sola o unida a FC5.

	ICV		IV	
molécula	Dosis (µg)	% de EMP	Dosis (mg/kg)	% de EMP
PBS	5	0 ± 0,8	800 (µL)	0 ± 0,6
Dalargina	2	35 ± 1	0,34 x 3 iny.	0,3 ± 0,3
FC5	69,75	0 ± 2	7 x 3 iny.	1,9 ± 0,3
EG2	69,75	0 ± 2	7 x 3 iny.	0 ± 1,3
A20.1			7,84 x 3 iny.	2,2 ± 0,3
FC5-Dalargina	74,4	47 ± 2	7 x 3 iny.	41 ± 0,5
EG2-Dalargina	74,4	31 ± 1	7 x 3 iny.	2,0 ± 0
A20.1-Dalargina			2,49 x 3 iny.	3,1 ± 0
FC5 + Dalargina			(0,65 µg + 7 mg/Kg) x 3 iny	0 ± 1,6

La supresión del dolor crónico se expresa como el porcentaje del efecto máximo posible (% de EMP). El valor se basa en el área bajo la curva para el animal con supresión del dolor en relación con la pata de control contralateral durante el marco de tiempo de medición. La eficacia de las moléculas inyectadas, ya sea ICV o IV se muestra como un porcentaje del efecto máximo posible (% de EMP) en el modelo de Hargreaves. A20.1 y EG2 son anticuerpos de dominio único no relacionados con FC5, que no tienen afinidad aparente por las células endoteliales de la BHE. La dosis en mpk para los valores de dosificación intravenosa (IV) se indica por inyección seguida del número de inyecciones.

Tabla V. Resumen de la supresión del dolor crónico en el modelo de Hargreaves por dalargina unida a Fc o dalargina unida a FC5-Fc.

	ICV		IV	
molécula	Dosis (µg)	% de EMP	Dosis (mg/kg)	% de EMP
FC5-Fc-Dal	11,5	43 ± 3	6	46 ± 2
Fc Dal	9,3	55 ± 2	6	5 ± 2
FC5-Fc + FC5-Fc-Dal			2,5+ 6	32 ± 7

En el segundo experimento, se inyectó una dosis intravenosa de FC5-Fc no unido IV antes de la adición de FC5-Fc-Dal a las concentraciones indicadas.

Tabla VI. Supresión crónica del dolor en el modelo de Hargreaves por galanina unida a Fc, FC5-Fc o FC5.

	ICV		IV	
molécula	Dosis (µg)	% de EMP	(mg/kg)	% de EMP
Galanina	2	54 ± 1	1	0 ± 1
Fc-Gal	11,2	49 ± 1	6	2 ± 1
FC5-Gal	10,87	49 ± 2	6	8 ± 1
FC5-Fc-Gal	11,4	49 ± 2	6	45 ± 2

En el caso de dosis múltiples para FC5-Gal, las dosis se espaciaron con 1 h de diferencia. En el tercer experimento, se inyectó una dosis intravenosa de FC5-Fc no unido IV antes de la adición de FC5-Fc-Dal a las concentraciones indicadas.

Tabla VII. : Comparación del tiempo hasta el inicio de las convulsiones con inyección en el hipocampo (a) o inyección IV (b) en el modelo de PTZ de rata

a) Inyección en el hipocampo.				
		Tiempo en segundos hasta el inicio de la convulsión		
molécula	Dosis (µg)	Mioclónica (seg)	Clónica	Tónica generalizada
Solo PTZ	50 mg/kg	0 ± 2	0 ± 6	0 ± 0,5
Ácido valproico	11,2	100 ± 6	100 ± 9	2 ± 1
Galanina	1,82	104 ± 0	evitada	evitada
FC5-Galanina	11,9	82 ± 4	evitada	evitada
b) Inyección intravenosa.				
		Tiempo en segundos hasta el inicio de la convulsión		
molécula	Dosis (mg/kg)	Mioclónica (seg)	Clónica	Tónica generalizada
Solo PTZ	50 mg/kg	0 ± 1	0 ± 3	0 ± 0,5
Ácido valproico	11,2	100 ± 3	100 ± 3	100 ± 0
Galanina	1 x 2 iny.	0,5 ± 5	0 ± 2	2 ± 4
Fc-Gal	6	2 ± 1	18 ± 2	17 ± 2
FC5-Galanina	6 x 3 iny.	47 ± 3	evitada	evitada
FC5-Fc-Galanina	6	101 ± 28	evitada	evitada

Después de la administración IP de ratas con PTZ, el tiempo hasta el inicio para cada tipo de convulsión indicado a continuación; Se evaluaron FMJ, FCJ y TGE. Los tipos de convulsiones se han descrito con más detalle anteriormente. (a) PTZ administrado IP determina el tiempo de control para cada tipo de convulsión. La inyección hipocampal de ácido valproico, galanina o FC5-Galanina antes de la inyección IP de PTZ determina el efecto máximo que cada una de estas moléculas puede tener en el tiempo para cada tipo de convulsión. (b) Dosis IV de ácido valproico, el control positivo, galanina (dosis de inyección 1 x 3, cada dosis separada por 1 hora 45 min antes de la administración de PTZ) o FC5-galanina (1 x 3 dosis, cada dosis separada por 1 hora 45 min antes de administración de PTZ), FC5-Fc-Gal o Fc-Gal se dosificaron 2 h antes de que la inyección IP de PTZ midiera el efecto que cada una de estas moléculas puede tener tras la administración IV. Fc-Gal sirve como control negativo, ya que la molécula carece del fragmento FC5 F(ab), pero tiene una PK in vivo similar a FC5-Fc.

Seq1: La secuencia de FC5-agly (T299A)hFc. (pEAG2345)

DVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYTMGWFRQAPGKEREFVSRITW
GGDNTFYSNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTADYYCAAGSTSTATP
LRVDYWGKGTQVTVSSAEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSV
LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELT
KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD
KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

Seq2: La secuencia de agly (T299A) hFc-FC5. (pEAG2403)

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL
KPEDTADYYCAAGSTSTATPLRVDYWGKGTQVTVSS

Seq3: La secuencia de FC5-agly (T299A)hFc (pYL605) desordenada

EPKSSDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP
EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSAYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK
VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIA
VEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSDVQLQASGGGLVQAGGSLRLSCAASGFKITHYT
MGWFRQAPGKEREFVSRITWGGDNTFYSNSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSL
KPEDTADYYCAADAGSTGSYGSFDYWGKGTQVTVSS

Equivalentes

Los expertos en la técnica reconocerán, o serán capaces de determinar usando no más que una experimentación de rutina, muchos equivalentes a las realizaciones específicas de la invención descrita en el presente documento.

REIVINDICACIONES

1. Una molécula de unión que es una proteína quimérica que comprende al menos un agente farmacológicamente activo, al menos dos sitios de unión comprendidos en anticuerpos de dominio único que se unen a TMEM30A, y una región Fc que comprende un primer resto Fc y un segundo resto Fc, donde al menos dos sitios de unión que se unen a TMEM30A se fusionan cada uno i) directamente o ii) mediante una secuencia de aminoácidos intermedia al extremo N-terminal del primer resto Fc y el segundo resto Fc, respectivamente, donde la región Fc se une específicamente al receptor de FcRn.

2. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el primer resto Fc y el segundo resto Fc comprenden cada uno un dominio CH2 y un dominio CH3.

3. La molécula de unión de las reivindicaciones 1 o 2, donde el primer resto Fc y el segundo resto Fc comprenden cada uno un dominio CH2 y un dominio CH3.

4. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, donde la región Fc es de un anticuerpo IgG.

5. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde
(a) los al menos dos sitios de unión comprenden la secuencia de aminoácidos FC5, o
(b) los al menos dos sitios de unión consisten en la secuencia de aminoácidos FC5.

6. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, donde el primer y/o el segundo resto Fc está aglicosilado.

7. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones anteriores, que comprende la SEQ ID NO:1.

8. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde la molécula de unión comprende al menos tres sitios de unión comprendidos en anticuerpos de dominio único que se unen a TMEM30A, más preferentemente en los que la molécula de unión comprende al menos cuatro sitios de unión compuestos por anticuerpos de dominio único que se unen a TMEM30A.

9. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde
(a) los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados directamente al primer y segundo resto Fc, respectivamente,
(b) los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados al primer y segundo resto Fc, respectivamente, mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende un conector peptídico, o
(c) los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados al primer y segundo resto Fc, respectivamente, mediante una secuencia de aminoácidos intermedia constituida por un conector peptídico.

10. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde los al menos dos sitios de unión están fusionados con el extremo N-terminal del primer y segundo resto Fc, respectivamente, mediante una secuencia de aminoácidos que comprende un conector peptídico, y donde (a) el primer y el segundo resto Fc se derivan de diferentes inmunoglobulinas, (b) uno de los restos Fc está mutado y el otro resto Fc no está mutado o (c) ambos restos Fc están mutados pero con diferentes mutaciones.

11. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde
(a) uno de los al menos dos sitios de unión está fusionado al extremo N-terminal de una molécula scFc, o
(b) el al menos un agente farmacológicamente activo está fusionado con el extremo C-terminal de la región Fc.

12. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el al menos un agente farmacológicamente activo es una entidad química pequeña, preferentemente en la que la entidad química pequeña está fusionada con la molécula de unión en un residuo de cisteína, más preferentemente en la que el resto de cisteína es un residuo de cisteína diseñado.

13. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el al menos un agente farmacológicamente activo es un polipéptido, preferentemente en la que al menos un agente farmacológicamente activo comprende un sitio de unión a antígeno, más preferentemente en la que el sitio de unión a antígeno se deriva de un anticuerpo que no se une a TMEM30.

14. La molécula de unión de la reivindicación 13, donde el agente farmacológicamente activo se selecciona del grupo constituido por una molécula scFv, una molécula Fab y un anticuerpo de dominio único.

15. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el al menos un agente farmacológicamente activo está genéticamente fusionado a la molécula de unión, preferentemente donde los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende el dominio VH de una molécula de anticuerpo, o donde los al menos dos sitios de unión están fusionados genéticamente mediante una secuencia de aminoácidos intermedia que comprende el dominio VL de una molécula de anticuerpo, preferentemente en la que la secuencia de aminoácidos intermedia comprende además un conector peptídico.

16. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el al menos un agente farmacológicamente activo está unido covalentemente a la molécula de unión.

17. La molécula de unión de la reivindicación 15, donde
(a) los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados al extremo N-terminal de un dominio VH de una molécula de anticuerpo intacta, o
(b) los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados con el extremo N-terminal de un dominio VL de una molécula de anticuerpo intacta.

18. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde los al menos dos sitios de unión están genéticamente fusionados al extremo N-terminal de un dominio VH y un dominio VL de una molécula de anticuerpo intacta.

19. La molécula de unión de la reivindicación 1, donde el agente farmacéuticamente activo se selecciona del grupo constituido por un péptido neuroactivo, una entidad química pequeña y una región variable de un anticuerpo que se une a una diana en el sistema nervioso central.

20. La molécula de unión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 19 para el tratamiento de un trastorno neurológico.

21. La molécula de unión según la reivindicación 20, donde el trastorno neurológico es un trastorno de almacenamiento, dolor crónico, epilepsia, esclerosis múltiple, una proteinopatía o un trastorno desmielinizante.

Figura 1

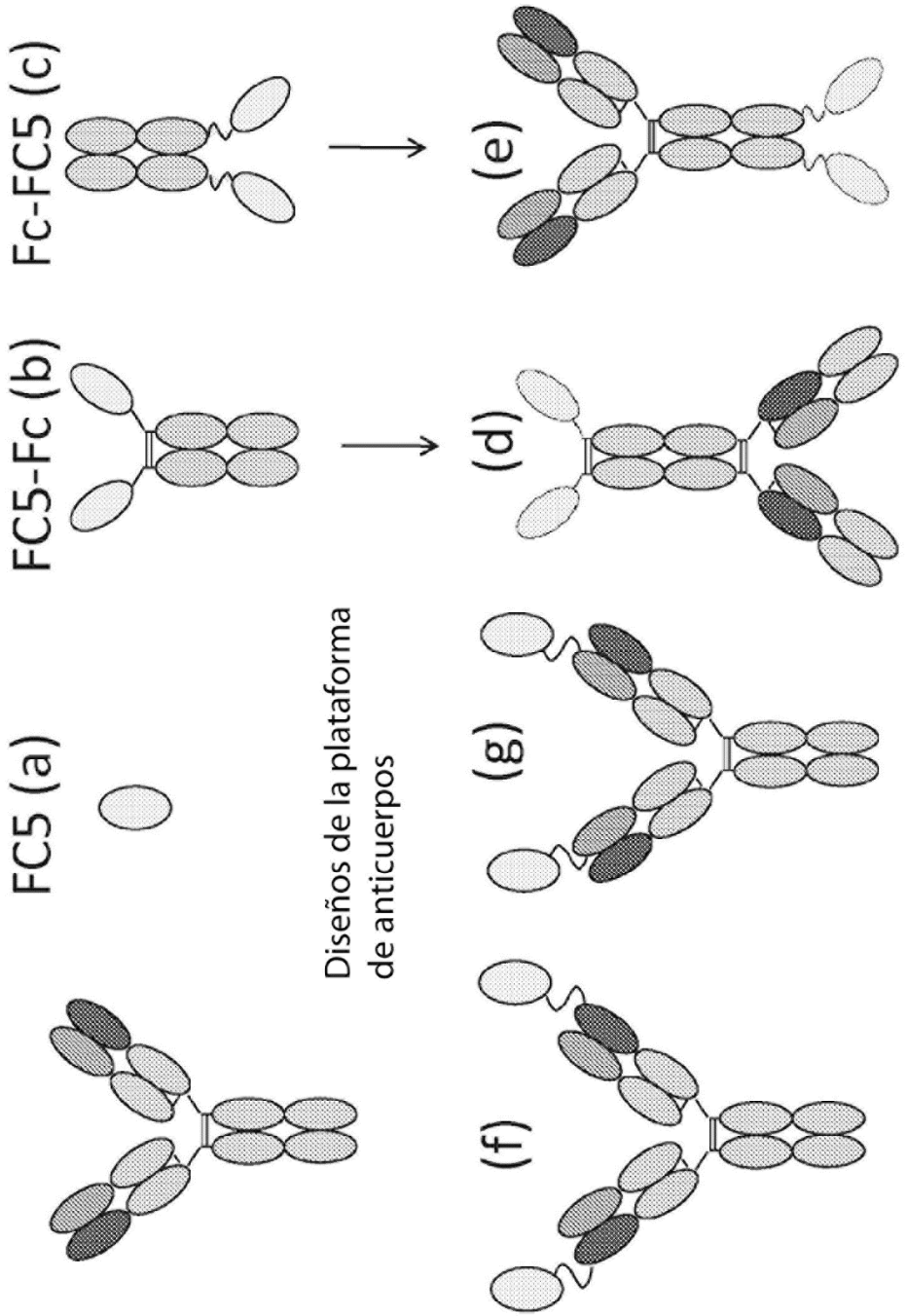

FC5 (a)
FC5-Fc (b)
Fc-FC5 (c)
Diseños de la plataforma de anticuerpos
(d)
(e)
(f)
(g)

Figura 2

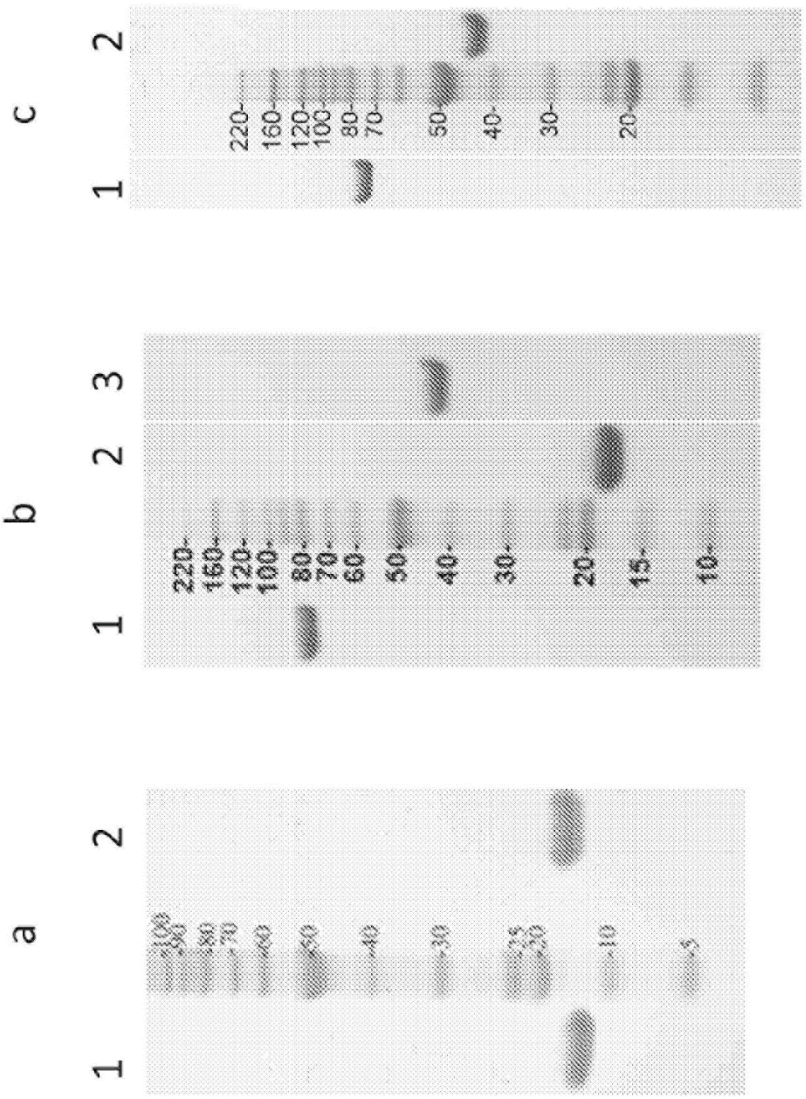

a
1
2
100
90
80
70
60
50
40
30
25
20
10
5
b
1
2
3
220
160
120
100
80
70
60
50
40
30
20
15
10
c
1
2
220
160
120
100
80
70
50
40
30
20

Figura 3

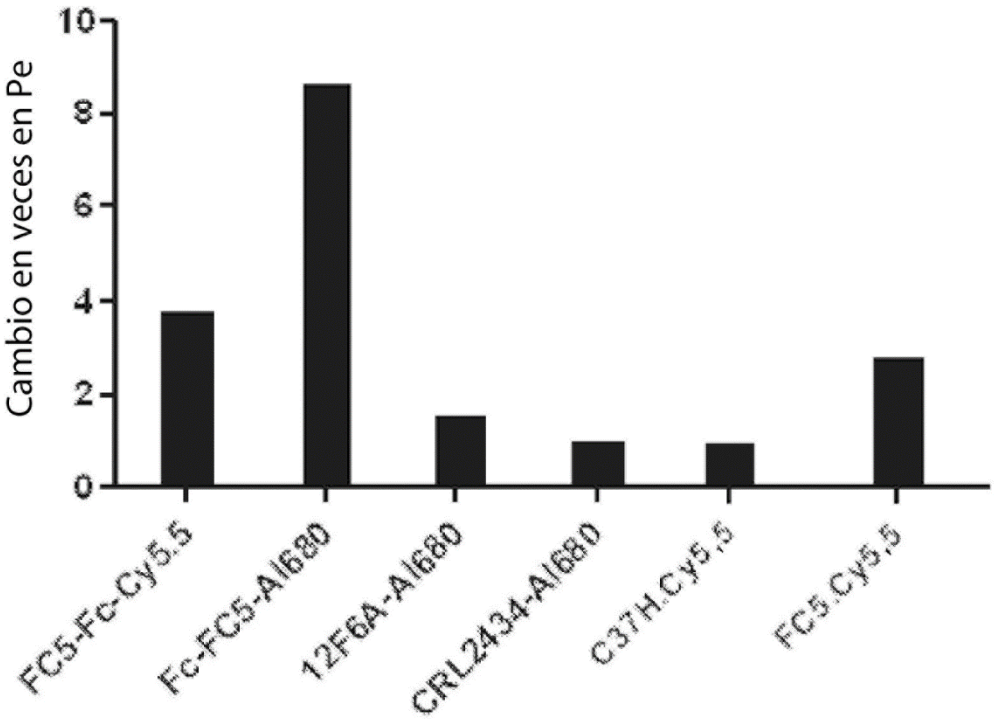

Cambio en veces en Pe
10
8
6
4
2
0
FC5-Fc-Cy5.5
Fc-FC5-AI680
12F6A-AI680
CRL2434-AI680
C37H.Cy5.5
FC5.Cy5.5

Figura 4a

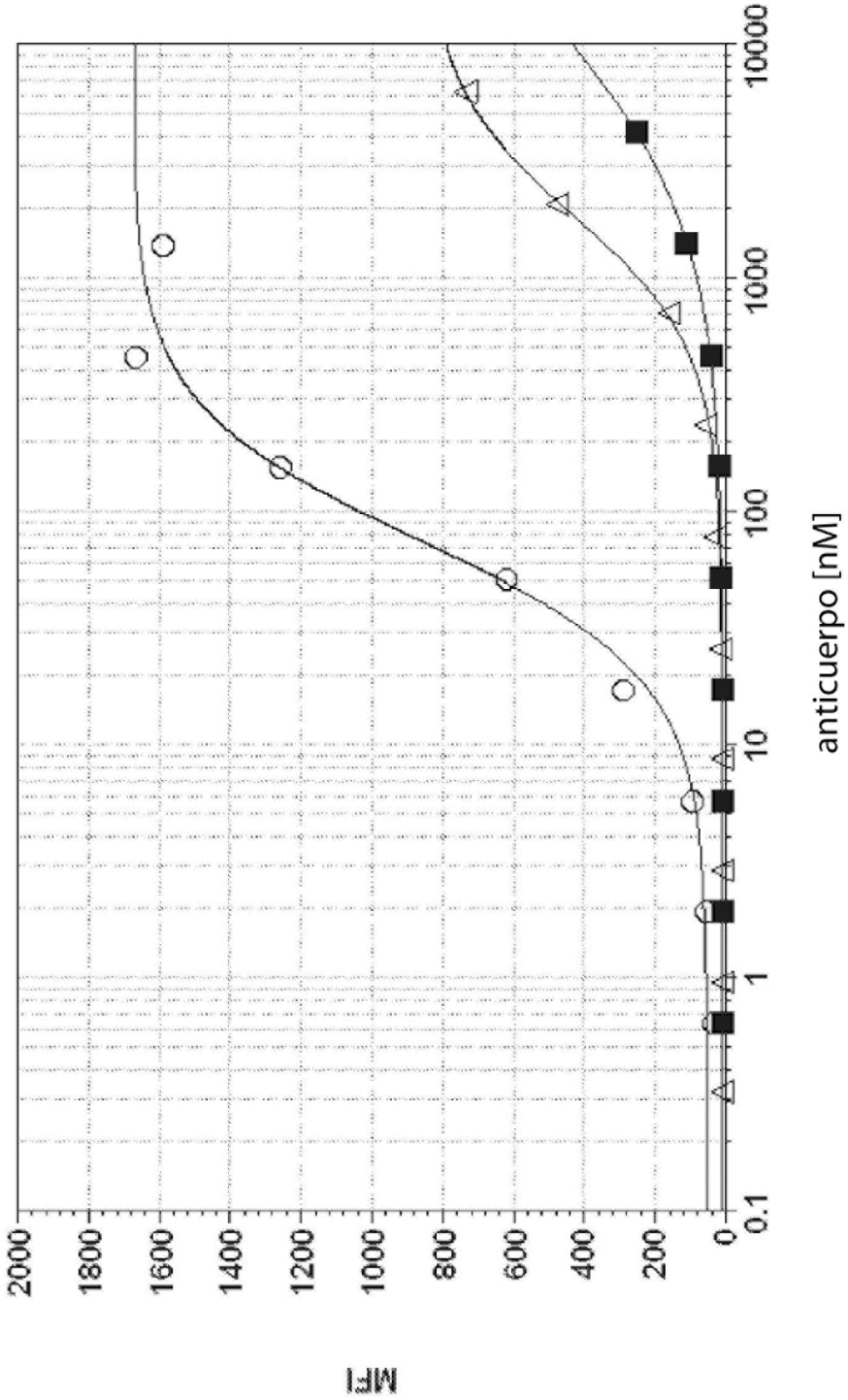

MFI
2000
1800
1600
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0.1
1
10
100
1000
10000
anticuerpo [nM]

Figura 4b

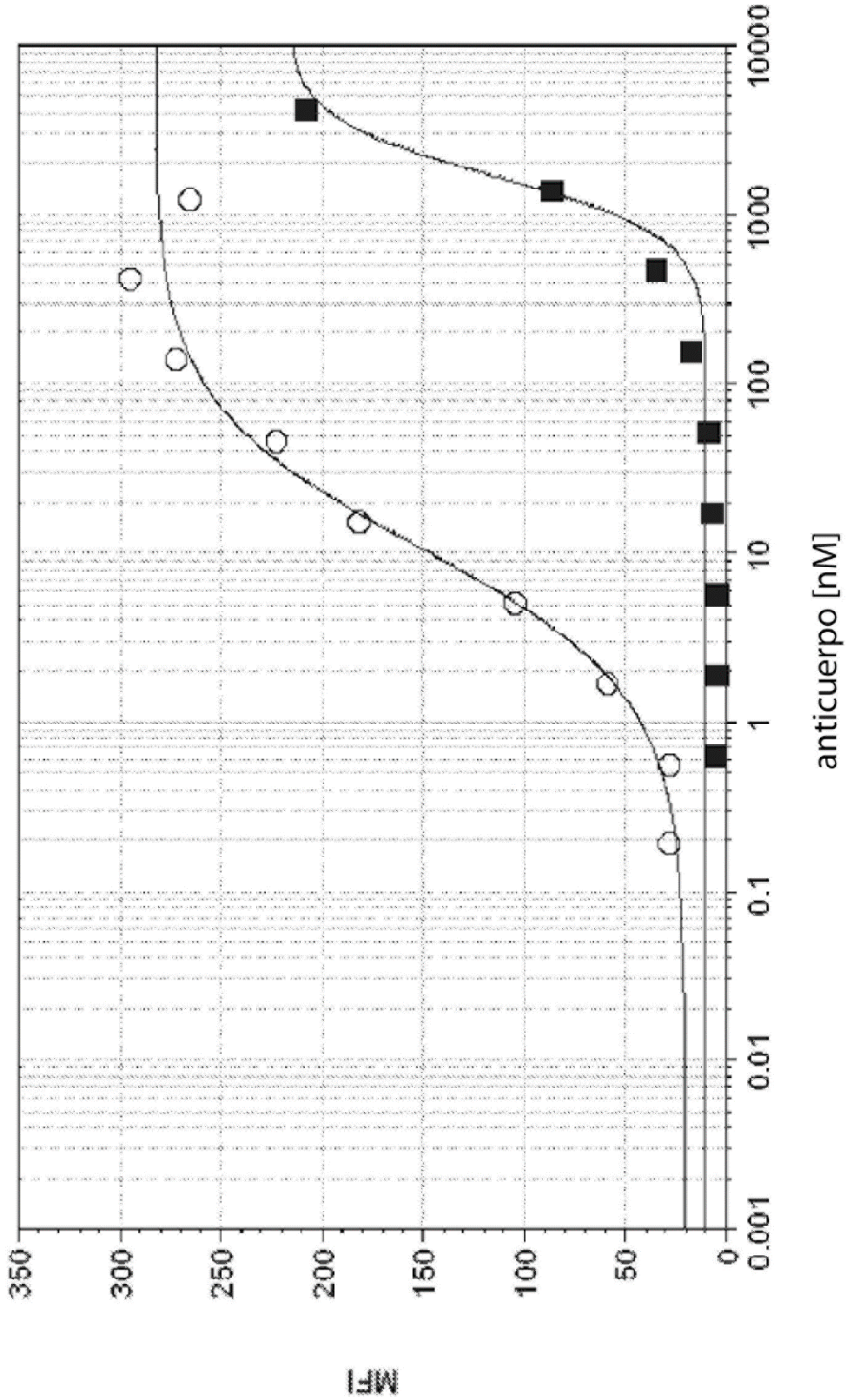

MFI
350
300
250
200
150
100
50
0
0.001
0.01
0.1
1
10
100
1000
10000
anticuerpo [nM]

Figura 4c

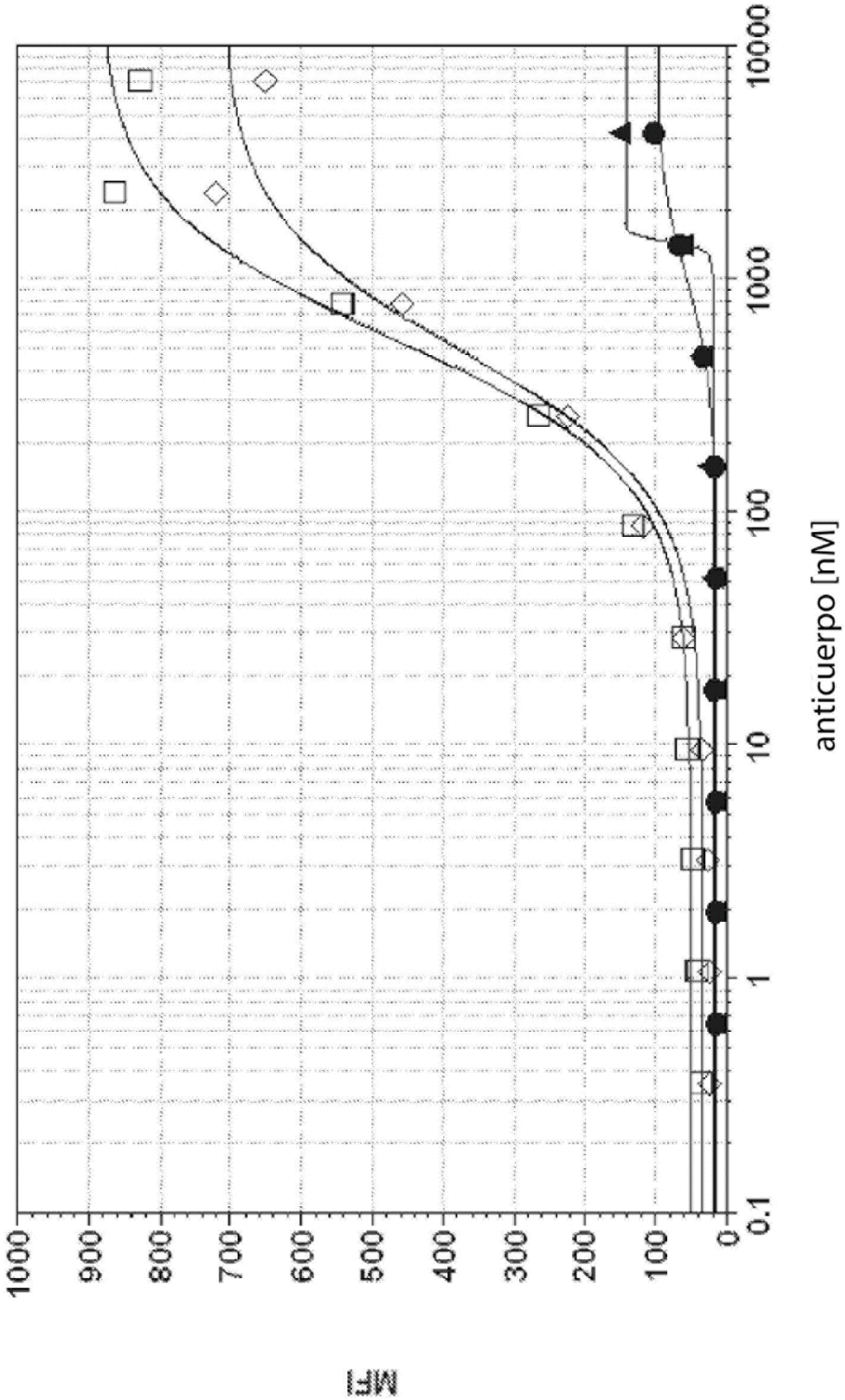

MFI
1000
900
800
700
600
500
400
300
200
100
0
0.1
1
10
100
1000
10000
anticuerpo [nM]

Figura 5

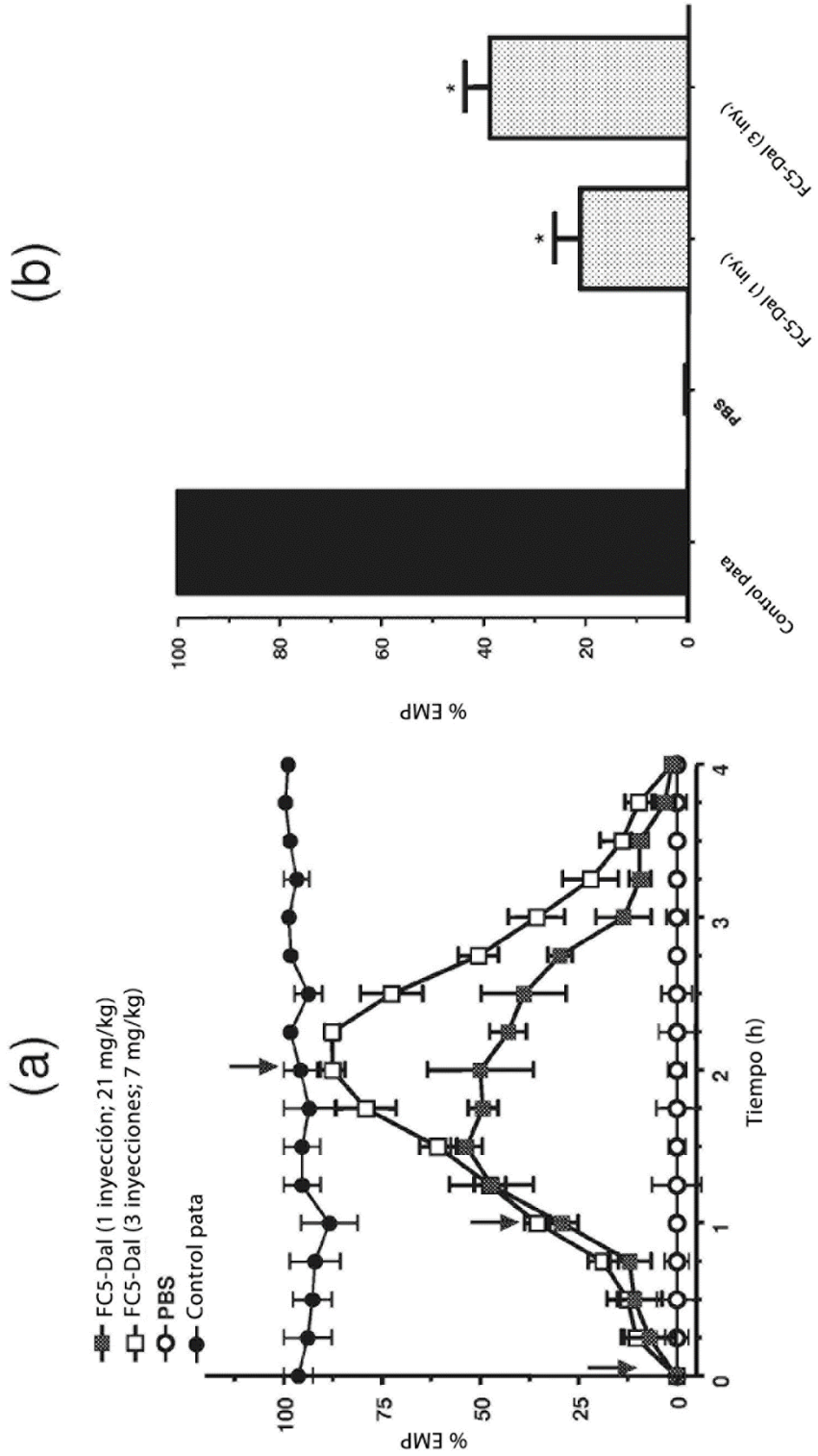

(a)
FC5-Dal (1 inyección; 21 mg/kg)
FC5-Dal (3 inyecciones; 7 mg/kg)
PBS
Control pata
% EMP
100
75
50
25
0
0
1
2
3
4
Tiempo (h)
(b)
% EMP
100
80
60
40
20
0
Control pata
PBS
FC5-Dal (1 iny.)
FC5-Dal (3 iny.)
*
*

Figura 5c

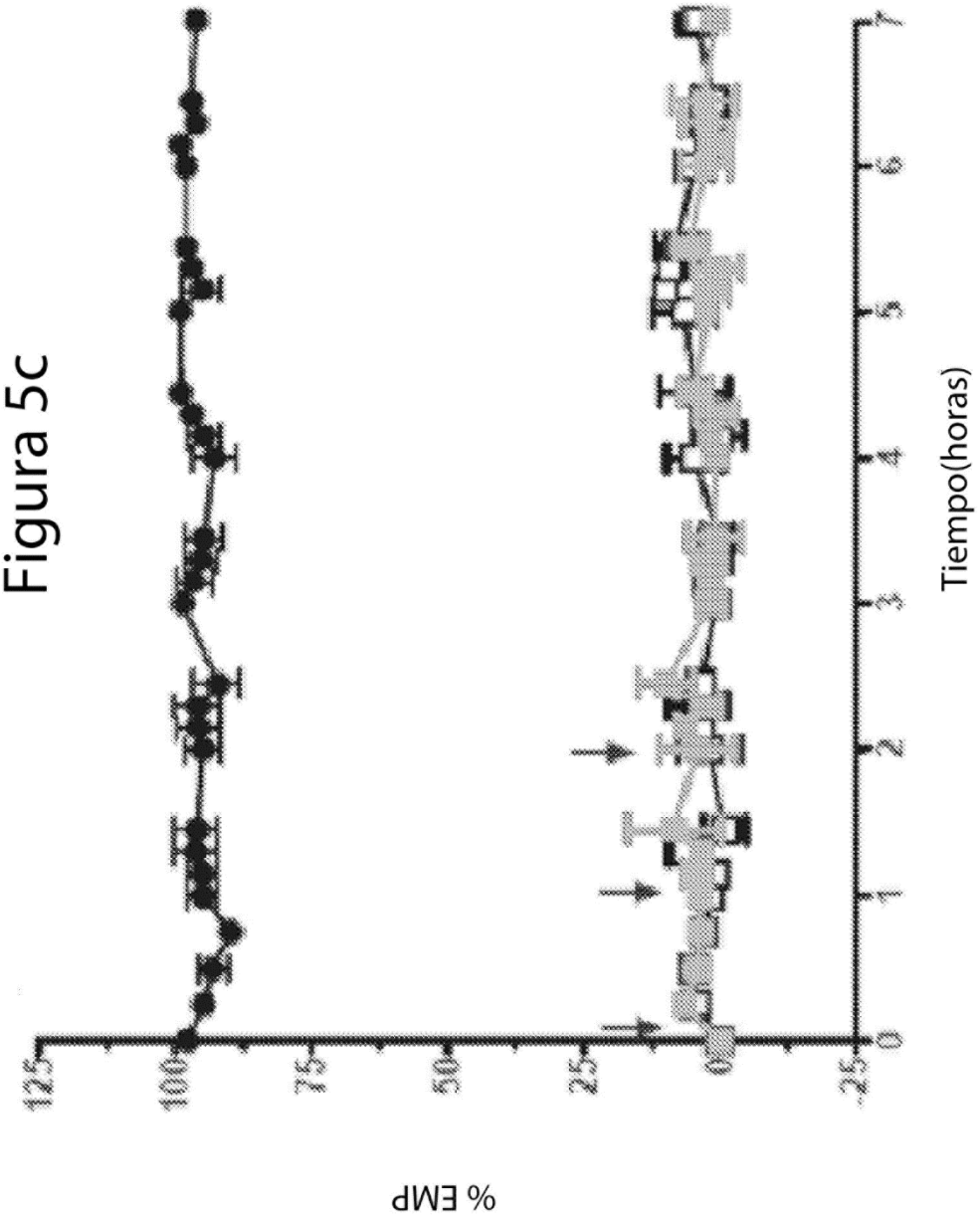


Figura 6

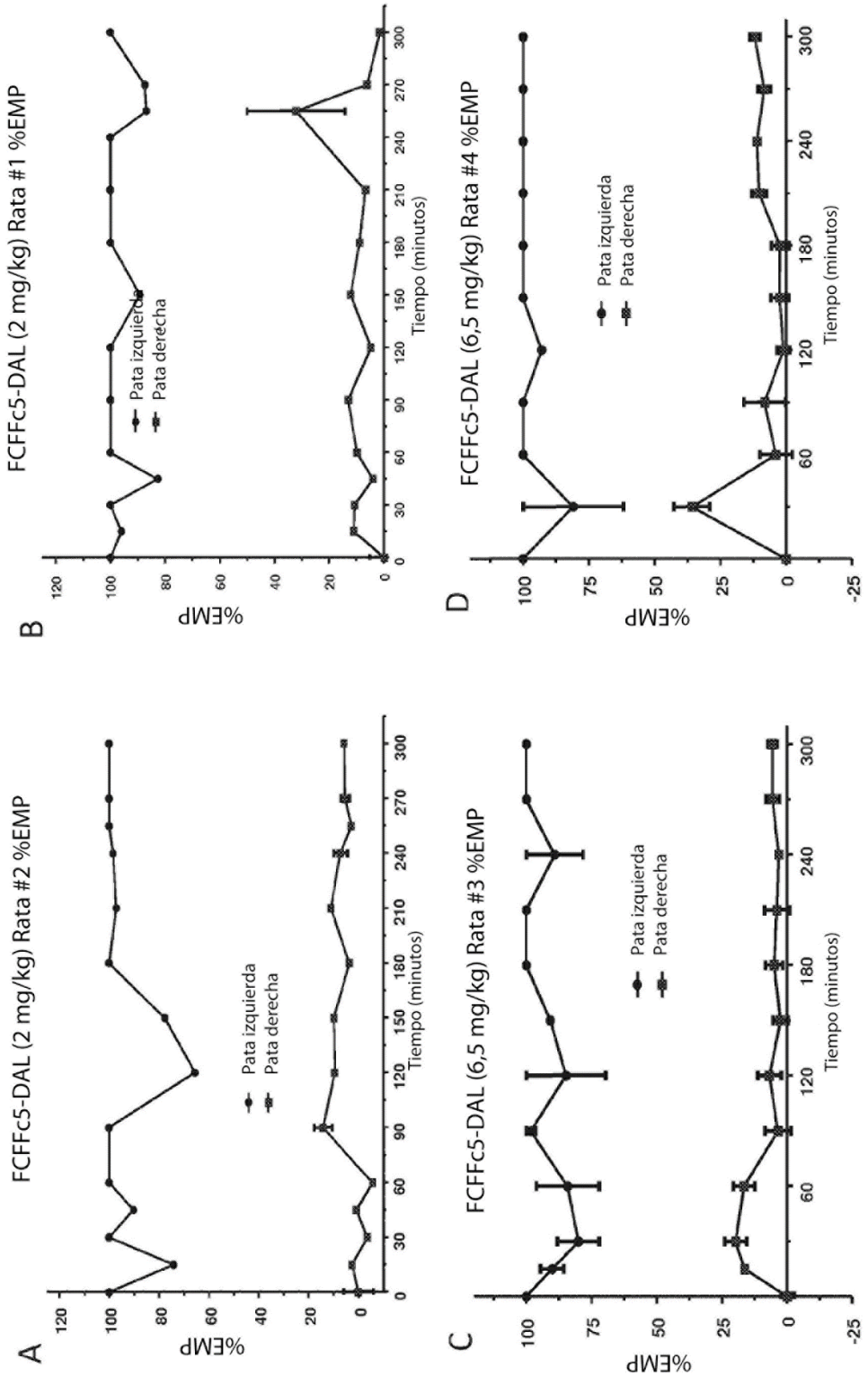

A
FCFFc5-DAL (2 mg/kg) Rata #2 %EMP
%EMP
Tiempo (minutos)
Pata izquierda
Pata derecha
B
FCFFc5-DAL (2 mg/kg) Rata #1 %EMP
%EMP
Tiempo (minutos)
Pata izquierda
Pata derecha
C
FCFFc5-DAL (6,5 mg/kg) Rata #3 %EMP
%EMP
Tiempo (minutos)
Pata izquierda
Pata derecha
D
FCFFc5-DAL (6,5 mg/kg) Rata #4 %EMP
%EMP
Tiempo (minutos)
Pata izquierda
Pata derecha

Figura 7

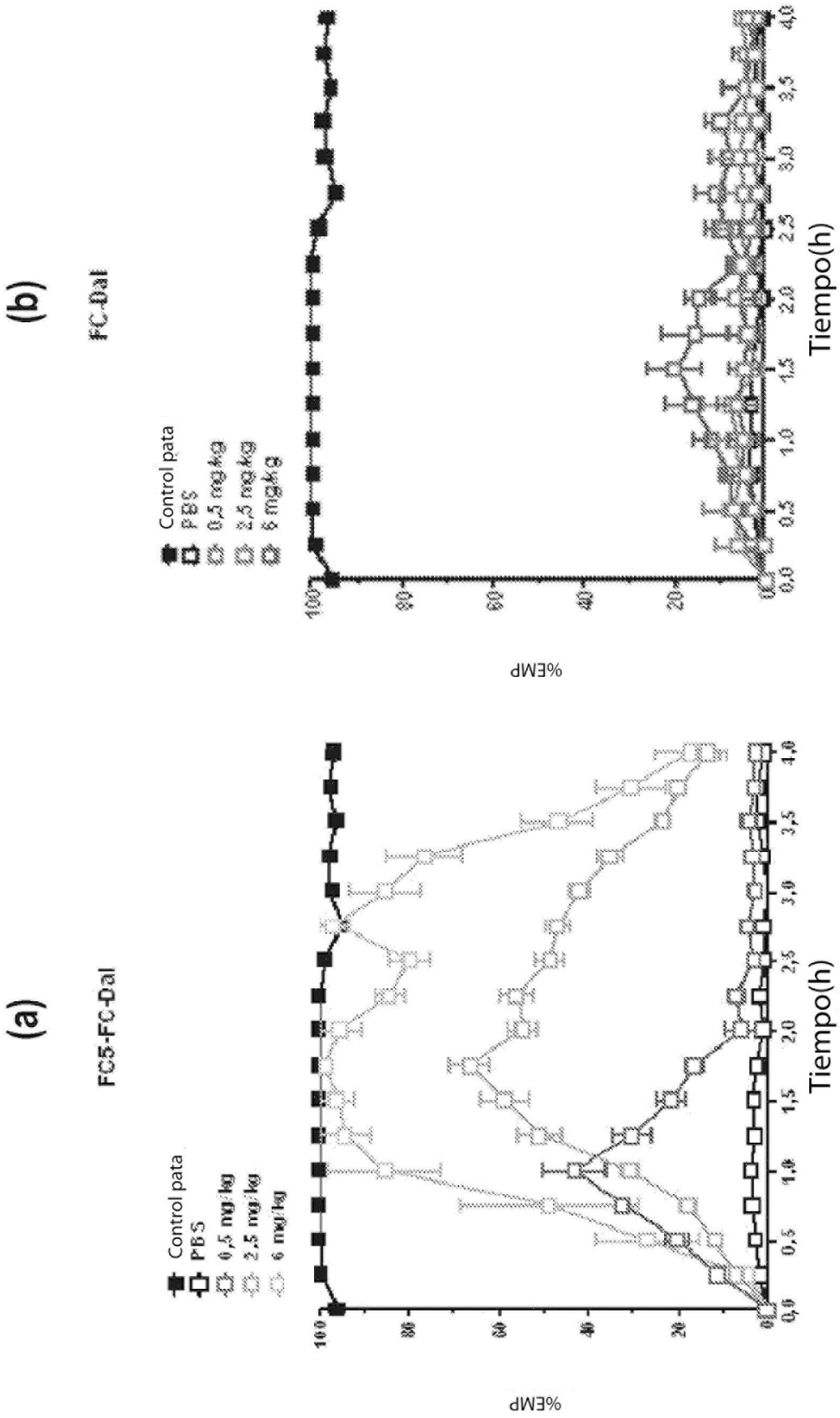
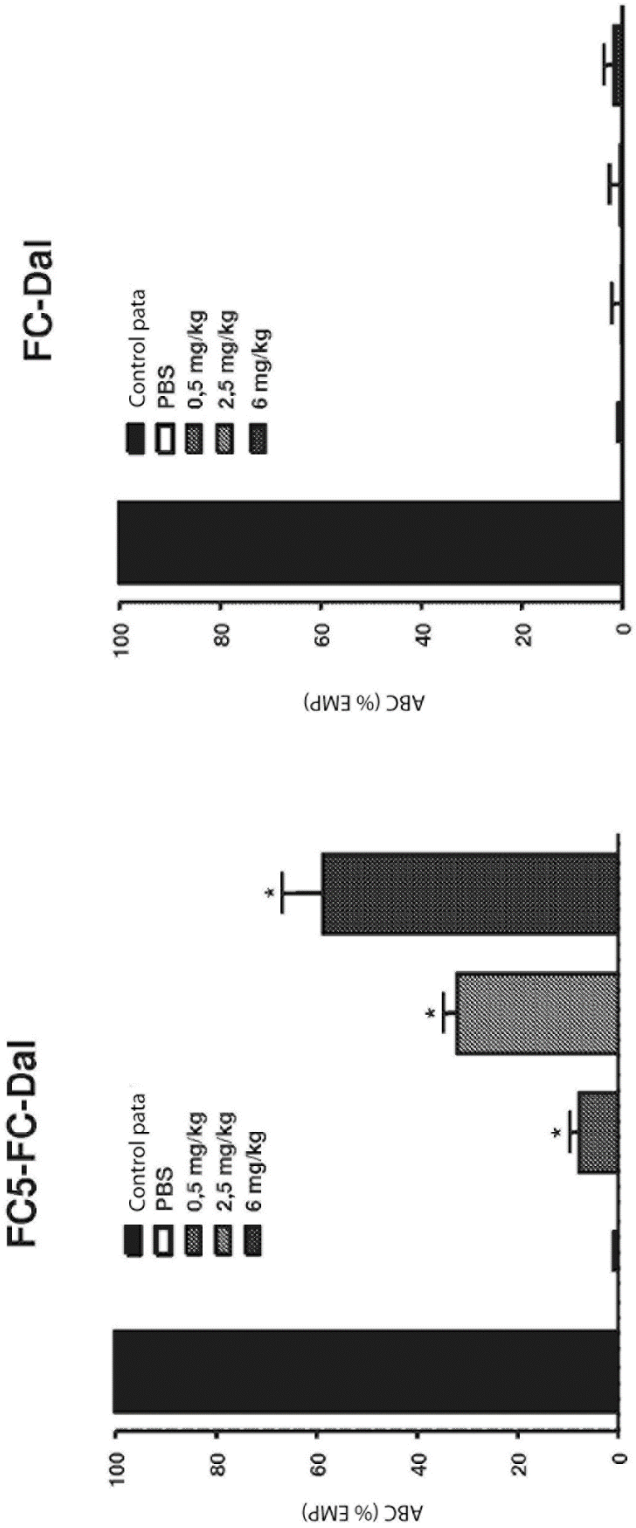

(a)
FC5-FC-Dal
Control pata
PBS
0,5 mg/kg
2,5 mg/kg
6 mg/kg
%EMP
Tiempo(h)
(b)
FC-Dal
Control pata
PBS
0,5 mg/kg
2,5 mg/kg
6 mg/kg
%EMP
Tiempo(h)

Figura 7


(c)
FC5-FC-Dal
Control pata
PBS
0,5 mg/kg
2,5 mg/kg
6 mg/kg
ABC (% EMP)
100
80
60
40
20
0
*
*
*
(d)
FC-Dal
Control pata
PBS
0,5 mg/kg
2,5 mg/kg
6 mg/kg
ABC (% EMP)
100
80
60
40
20
0