

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 728 446**

51 Int. Cl.:

A61K 38/17 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/46 (2006.01)

A61P 29/00 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **21.12.2012** **PCT/US2012/071394**

87 Fecha y número de publicación internacional: **27.06.2013** **WO13096847**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **21.12.2012** **E 12858768 (0)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **06.03.2019** **EP 2793927**

54 Título: **Proteínas de fusión de P-anticuerpos de amiloide sérico**

30 Prioridad:

21.12.2011 US 201161578498 P

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

24.10.2019

73 Titular/es:

PROMEDIOR, INC. (100.0%)
81 Hartwell Avenue, Suite 100
Lexington, MA 02421, US

72 Inventor/es:

LUPHER, MARK, L., JR. y
WILLETT, W., SCOTT

74 Agente/Representante:

ILLESCAS TABOADA, Manuel

ES 2 728 446 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de P-anticuerpos de amiloide sérico

5 La llegada de la tecnología del ADN recombinante ha brindado la posibilidad de una producción a gran escala de proteínas biológicamente activas para su uso terapéutico. En consecuencia, ahora hay muchos productos proteicos producidos de forma recombinante en la clínica o en desarrollo, incluidas proteínas grandes (por ejemplo, eritropoyetina), fragmentos de péptidos pequeños y anticuerpos, así como fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

10 Sin embargo, hay muchas dificultades comúnmente asociadas con la producción y el uso de tales proteínas recombinantes en terapias humanas. Por ejemplo, muchas proteínas producidas de forma recombinante y purificadas se caracterizan por una vida media corta *in vivo* y/o una afinidad de unión débil para sus dianas *in vivo*, reduciendo así su utilidad como agentes terapéuticos.

15 En determinados casos, se ha encontrado que la estabilidad y/o la actividad biológica de una proteína o fragmento peptídico de la misma puede potenciarse fusionándola con otro dominio polipeptídico heterólogo (por ejemplo, un dominio de estabilización como los dominios Fc de inmunoglobulinas) o generando complejos multiméricos de la proteína activa. Por ejemplo, se ha encontrado que la multimerización de proteínas es, a menudo, una forma eficaz de aumentar la vida media de estos agentes, lo que les permite ejercer su actividad en una escala de tiempo más larga. Asimismo, se ha encontrado que muchas proteínas biológicamente activas son más potentes *in vivo* cuando se encuentran en forma de una estructura oligomérica. En muchos casos, este aumento de actividad se debe a factores tales como la avidez en la unión en lugar de la afinidad y/o la capacidad de entrecruzar moléculas (por ejemplo, subunidades de receptor idénticas a las del receptor de insulina que se activan mediante la dimerización).

20 Estas propiedades de mayor vida media y avidez permiten que se usen dosis más bajas de las moléculas de proteínas y péptidos, lo que potencialmente reduce el costo de la terapia, así como cualquier efecto secundario dependiente de la dosis.

30 Se han propuesto diferentes aproximaciones para hacer multímeros de proteínas recombinantes. Por ejemplo, se ha intentado la unión química de proteínas a polímeros, tal como el polietilenglicol (Katre et al., (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84, 1487). Sin embargo, esta técnica es generalmente engorrosa y requiere grandes cantidades de material purificado. En las moléculas de anticuerpos, se han intentado modificaciones en la región bisagra y otras regiones de la proteína para modular el grado en que los anticuerpos se asociarán entre sí. Sin embargo, los resultados han sido inconsistentes e impredecibles. De manera similar, el uso de fusiones de proteína A para generar anticuerpos multiméricos puede unir con éxito fragmentos de anticuerpos, pero tiene una aplicación limitada en otros campos.

40 El documento WO 2010/148234 describe variantes de amiloide P (SAP) sérico y su uso. Thie H et al (NEW BIOTECHNOLOGY 26, 314-321 (2009)) describe los dominios de multimerización para la presentación en fagos de anticuerpos y para la producción de anticuerpos.

En el presente documento se describen nuevas moléculas de armazón para suministrar entidades moleculares de manera eficaz como agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico.

45 La invención se define mediante las reivindicaciones. En consecuencia, en un aspecto, la presente invención se refiere a una proteína de fusión que comprende un pentámero de amiloide P sérico (PTX-2) que tiene al menos un protómero de PTX-2 fusionado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno se fusiona al extremo N-terminal de al menos un protómero de PTX; y en donde la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno y el al menos un protómero de PTX-2.

50 Se describe el uso de pentraxina-2 (PTX-2) como una molécula de armazón para agentes terapéuticos basados en anticuerpos y fragmentos de anticuerpos (por ejemplo, fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno). Uno o más anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden unirse a un protómero de PTX-2 para formar un protómero de PTX-2 funcionalizado, y estos protómeros de PTX-2 funcionalizados pueden combinarse para formar pentámeros de PTX-2 funcionalizados.

60 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a una composición que comprende un pentámero PTX-2 que tiene al menos uno, al menos dos, al menos tres o al menos cuatro protómeros de PTX-2 con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido. En otros aspectos, la divulgación se dirige a composiciones en donde el pentámero PTX-2 comprende cinco protómeros con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos.

En determinados aspectos, los pentámeros de PTX-2 de la divulgación comprenden uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres o cuatro) protómeros de PTX-2 no modificados.

65 En determinados aspectos, los pentámeros de PTX-2 de la divulgación comprenden uno o más (por ejemplo, uno,

dos, tres, cuatro, o cinco) protómeros de PTX-2 que se modifican para eliminar un sitio de unión a ligandos en protómeros de PTX-2 de origen natural, un sitio de unión a Ca^{+2} en protómeros de PTX-2 de origen natural o una combinación de los mismos.

5 En determinados aspectos, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se unen al extremo C-terminal o al extremo N-terminal de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o los cinco protómeros de PTX-2. En otros aspectos, el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se unen tanto al extremo C-terminal como al extremo N-terminal de al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro o los cinco protómeros de PTX-2.

10 En determinados aspectos, al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, o cinco) protómero de PTX-2 de la divulgación puede comprender un enlazador entre el anticuerpo o fragmento de anticuerpo y al menos un protómero de PTX-2.

15 En determinados aspectos, el anticuerpo o fragmento de anticuerpo se inserta dentro de al menos un (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro o cinco) protómero de PTX-2.

20 En determinados aspectos, los pentámeros de PTX-2 comprenden uno o más (por ejemplo, uno, dos, tres, cuatro, o cinco) protómeros de PTX-2 que tienen al menos un aminoácido cisteína adicional que no está presente en los protómeros de PTX-2 de origen natural. El aminoácido cisteína adicional puede participar en un enlace disulfuro dentro del anticuerpo o fragmento de anticuerpo. El aminoácido cisteína adicional puede participar en un enlace disulfuro con otra cisteína del protómero de PTX-2.

25 En determinados aspectos, el dominio de anticuerpo o fragmento de anticuerpo del protómero de PTX-2 es un agente terapéutico conocido. El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz (TIMP) o un anticuerpo o fragmento de anticuerpo anti factor de necrosis tumoral (TNF). El anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede ser un anticuerpo o fragmento de anticuerpo antiinflamatorio.

30 En determinados aspectos, el dominio del fragmento de anticuerpo del protómero de PTX-2 se selecciona de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), proteínas VHH de camélidos o anexinas.

35 En determinados aspectos, la divulgación proporciona preparaciones farmacéuticas que comprenden un protómero de PTX-2 como se describe en el presente documento y uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.

40 En determinados aspectos, la divulgación proporciona un método para preparar un pentámero PTX-2 funcionalizado que comprende i) introducir un primer plásmido incluyendo, al menos, una secuencia de nucleótidos para un primer protómero de PTX-2 funcionalizado en un sistema de expresión, en donde el primer plásmido comprende al menos una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a una secuencia de nucleótidos para el protómero de PTX-2 de origen natural y una secuencia de nucleótidos para uno o más primeros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos; ii) expresar el primer protómero de PTX-2 funcionalizado; y iii) aislar pentámeros de PTX-2 funcionalizados, purificar pentámeros de PTX-2 funcionalizados o combinaciones de los mismos a partir del sistema de expresión. En algunos casos, los métodos comprenden además i) introducir un segundo plásmido en el sistema de expresión, en donde el segundo plásmido al menos incluye una secuencia de nucleótidos para un segundo protómero de PTX-2 funcionalizado, en donde el segundo plásmido al menos comprende una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a una secuencia de nucleótidos para el protómero de PTX-2 de origen natural y una secuencia de nucleótidos para uno o más segundos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo; y ii) inducir la expresión conjunta del primer protómero de PTX-2 funcionalizado y el segundo protómero de PTX-2 funcionalizado, el protómero de PTX-2 de origen natural o combinaciones de los mismos. En algunos casos, los métodos comprenden además i) introducir un plásmido de tipo silvestre en el sistema de expresión, en donde el plásmido de tipo silvestre comprende al menos una secuencia de nucleótidos sustancialmente similar a una secuencia de nucleótidos para el protómero de PTX-2 de origen natural; y ii) inducir la expresión conjunta del primer protómero de PTX-2 funcionalizado, el segundo protómero de PTX-2 funcionalizado, el protómero de PTX-2 de origen natural o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, el primer plásmido, el segundo plásmido, el plásmido de tipo silvestre o sus combinaciones comprenden además un promotor inducible posicionado para controlar la expresión del protómero de PTX-2 funcionalizado, el protómero de PTX-2 de origen natural o cualquier combinación de los mismos. En algunos casos, la etapa de inducir la expresión comprende controlar la expresión del primer protómero de PTX-2 funcionalizado, el segundo protómero de PTX-2 funcionalizado, el protómero de PTX-2 de origen natural, o combinaciones de los mismos, de manera que el primer protómero de PTX-2 funcionalizado, el segundo protómero de PTX-2 funcionalizado, y/o el protómero de PTX-2 de origen natural no se expresan en proporciones iguales. En determinados casos, el control de la expresión se lleva a cabo por medio del control del número de copias del primer plásmido, del segundo plásmido, del plásmido de tipo silvestre o de combinaciones de los mismos en células del sistema de expresión. En determinados casos, el control de la expresión se lleva a cabo por medio de un promotor inducible en el primer plásmido, el segundo plásmido, el plásmido de tipo silvestre o combinaciones de los mismos.

65 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a métodos para tratar a un paciente que comprende administrar

una cantidad eficaz de al menos un pentámero o protómero de PTX-2 divulgado en el presente documento a un paciente que necesita tratamiento. En algunas realizaciones, el pentámero o protómero de PTX-2 de la divulgación se administra para reducir la inflamación en un paciente.

5 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a métodos para preparar un coloide de PTX-2 que comprende i) aislar pentámeros de PTX-2, purificar pentámeros de PTX-2, o combinaciones de los mismos; y ii) añadir calcio a los pentámeros de PTX-2 aislados y/o purificados. En algunas realizaciones, el coloide se utiliza en la preparación de una formulación tópica de PTX-2.

10 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a métodos para tratar o prevenir la inflamación o un trastorno relacionado con la inflamación en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un pentámero o protómero de PTX-2 divulgado en el presente documento a un paciente que lo necesite. En algunos casos, el trastorno relacionado con la inflamación se selecciona de: psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias tales como espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, lupus eritematoso y sarcoidosis. En determinados casos, la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir la inflamación o un trastorno relacionado con la inflamación en un paciente que comprende la administración de una cantidad eficaz de protómero anti-TNF- α -PTX-2 o pentámeros del mismo. En determinados casos, el protómero anti-TNF- α -PTX-2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

20 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a métodos para tratar o prevenir un trastorno sensible a PTX-2 en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un pentámero o protómero de PTX-2 divulgado en el presente documento a un paciente que lo necesite. En algunos casos, el trastorno sensible a PTX-2 se selecciona de: fibrosis o enfermedad relacionada con la fibrosis, un trastorno de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario o mucositis. En determinados casos, la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir un trastorno sensible a PTX-2 en un paciente que comprende la administración de una cantidad eficaz de protómero anti-TNF- α -PTX-2 o pentámeros del mismo. En determinados casos, el protómero anti-TNF- α -PTX-2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

30 En determinados aspectos, la divulgación se dirige a métodos para tratar o prevenir la inflamación o un trastorno relacionado con la inflamación y un trastorno sensible a PTX-2 en un paciente que comprende administrar una cantidad eficaz de al menos un pentámero o protómero de PTX-2 divulgado en el presente documento a un paciente que lo necesite. En algunos casos, el trastorno relacionado con la inflamación se selecciona de psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias tales como espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, lupus eritematoso y sarcoidosis y el trastorno sensible a PTX-2 se selecciona de: fibrosis o enfermedad relacionada con la fibrosis, un trastorno de hipersensibilidad, un trastorno autoinmunitario o mucositis. En realizaciones preferidas, la divulgación proporciona métodos para tratar o prevenir la inflamación o un trastorno relacionado con la inflamación en un paciente y un trastorno sensible a PTX-2 que comprende la administración de una cantidad eficaz de protómero anti-TNF- α -PTX-2 o pentámeros del mismo. En determinados casos, el protómero anti-TNF- α -PTX-2 comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2.

45 La **Figura 1** muestra la estructura cristalina de rayos X del pentámero pentraxina-2 (PTX-2). Los extremos N-terminal y C-terminal son los indicados y las esferas representan Ca^{+2} unido.

La **Figura 2** muestra diagramas de PTX-2 (pentraxina corta) en comparación con PTX-3 (pentraxina larga).

Las **Figuras 3A y 3B** muestran varias configuraciones como ejemplo de pentámeros de PTX-2 funcionalizados.

La **Figura 4** es un esquema de un método como ejemplo para preparar pentámeros de PTX-2 funcionalizados.

50 Se pueden combinar hasta 5 fusiones de anticuerpo/proteína SAP para crear complejos pentaméricos con combinaciones de actividades catalíticas, de unión y/o terapéuticas.

La **Figura 5** muestra una gráfica del % de PTX-2 restante en solución después de la adición de calcio.

La **Figura 6** es un gráfico de cromatografía líquida de alta presión de exclusión por tamaño (SE-HPLC) como ejemplo de una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α purificada que muestra no degradación después de 5 ciclos de congelación/descongelación.

55 La **Figura 7** es una fotografía de un gel de electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) como ejemplo de una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α purificada que muestra que no existe degradación después de 5 ciclos de congelación/descongelación.

La **Figura 8** es un gráfico de cromatografía líquida-espectrometría de masas (LCMS) como ejemplo que muestra la especie de proteínas de fusión PTX-2 anti-TNF α después de la purificación.

60 La **Figura 9** es un gráfico como ejemplo que muestra la inhibición de la producción de quimiocinas derivadas de macrófagos (MDC) en células mononucleares de sangre periférica (PBMC) como resultado de la exposición a PTX-2 natural (●) o a una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α (▼).

La **Figura 10** es un gráfico como ejemplo que muestra la inhibición de la producción de IL-8 en macrófagos como resultado de la exposición a PTX-2 natural (●) o a una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α (▼).

65 La **Figura 11** es un gráfico como ejemplo que muestra la inhibición de la actividad de TNF α en células L929 como resultado de la exposición a PTX-2 natural (●), a una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α (▼), o a un

anticuerpo anti-TNF α , Remicade (■).

La **Figura 12** es un gráfico como ejemplo que muestra el aclaramiento de PTX-2 natural (●) o de una proteína de fusión PTX-2 anti-TNF α (▼) a partir de la sangre de ratas durante un período de 24 horas.

La **Figura 13** muestra la secuencia de aminoácidos del protómero anti-TNF- α -VHH3-PTX-2 (SEQ ID NO: 2). El dominio anti-TNF- α -VHH3 está subrayado, la región del enlazador se indica con una fuente en negrita y el dominio PTX-2 está subrayado dos veces.

Antes de describir las presentes composiciones y métodos, debe entenderse que esta divulgación no se limita a los procesos, composiciones o metodologías concretos descritos, ya que estas pueden variar. También debe entenderse que la terminología usada en la descripción tiene el fin de describir versiones o realizaciones particulares únicamente, y no se pretende que limite el alcance de la presente divulgación que estará limitada únicamente por las reivindicaciones adjuntas. Salvo que se defina de otro modo, todos los términos técnicos y científicos que se utilizan en el presente documento tienen el mismo significado que el normalmente entendido por alguien con una habilidad habitual en la técnica. También cabe destacar que tal como se usa en el presente documento y en las reivindicaciones adjuntas, las formas en singular "un", "una" y "el/la" incluyen las referencias plurales salvo que el contexto indique claramente otra cosa. Por lo tanto, por ejemplo, la referencia a una "célula" es una referencia a una o más células y equivalentes de las mismas conocidas por los expertos en la materia, y así sucesivamente.

Tal como se usa en el presente documento, el término "aproximadamente" significa más o menos el 10% del valor numérico del número que se está utilizando. Por lo tanto, aproximadamente el 50% significa en el intervalo de 45% - 55%.

Tal como se usa en el presente documento, el término "sustancialmente" significa ser en gran parte, pero no totalmente, lo que se especifica. Por ejemplo, la expresión "sustancialmente similar" con respecto a una secuencia de nucleótidos indica que la secuencia es en gran medida idéntica a otra secuencia indicada para la misma proteína o péptido; sin embargo, la secuencia de nucleótidos puede incluir cualquier número de variaciones o mutaciones que no afecten a la estructura o función de la proteína resultante.

"Administrar" cuando se utiliza junto con un agente terapéutico significa administrar un agente terapéutico directamente en o sobre un tejido diana o administrar un agente terapéutico a un paciente, por lo que el agente terapéutico impacta positivamente en el tejido al que se dirige. Por lo tanto, tal como se usa en el presente documento, el término "administrar", cuando se utiliza junto con un armazón de PTX-2 puede incluir, pero sin limitación, proporcionar un armazón de PTX-2 a un sujeto de manera sistemática mediante, por ejemplo, inyección intravenosa, por lo que el agente terapéutico alcanza el tejido diana. "Administrar" una composición se puede lograr mediante, por ejemplo, inyección, administración oral, administración tópica o por estos métodos en combinación con otras técnicas conocidas. Tales técnicas de combinación incluyen calentamiento, radiación, ultrasonido y el uso de agentes de liberación.

"Proporcionar", cuando se usa junto con un agente terapéutico, significa administrar un agente terapéutico directamente a o sobre un tejido diana o para administrar un agente terapéutico a un paciente por lo que el agente terapéutico impacta positivamente en el tejido al que se dirige.

El término "animal" como se usa en el presente documento incluye, pero sin limitación, vertebrados humanos y no humanos tales como animales salvajes, domésticos y de granja.

El término "mejora" se utiliza para transmitir que la presente divulgación cambia las características y/o los atributos físicos del tejido al que se proporciona, aplica o administra. El término "mejora" también se puede utilizar junto con un estado de enfermedad, de manera que cuando un estado de enfermedad "se mejora", los síntomas o las características físicas asociadas con el estado de enfermedad disminuyen, se reducen o se eliminan.

El término "inhibir" generalmente se refiere a la prevención de la aparición de los síntomas, aliviando los síntomas o eliminando la enfermedad, afección o trastorno.

"Opcional" u "opcionalmente" significa que el evento o circunstancia descrito posteriormente puede ocurrir o no, y que la descripción incluye casos en los que el evento ocurre y casos en los que no.

A lo largo de la memoria descriptiva de la presente solicitud, se usan varios términos tales como "primario" "secundario", "primero", "segundo", y similares. Estos términos son palabras de conveniencia para distinguir entre diferentes elementos, y dichos términos no pretenden ser limitantes en cuanto a cómo se pueden utilizar los diferentes elementos.

Tal como se usa en el presente documento, "aislado" significa alterado o eliminado del estado natural a través de la intervención humana. Por ejemplo, una proteasa romboidal presente de forma natural en un animal vivo no está "aislada", pero una proteasa romboidal sintética, o una proteasa romboidal separada parcial o completamente de los materiales coexistentes de su estado natural está "aislada". Una proteasa romboidal aislada puede existir en forma sustancialmente purificada, o puede existir en un entorno no natural tal como, por ejemplo, una célula en la que se

ha administrado la proteasa romboidal.

Las expresiones "mimético", "péptido mimético" y "peptidomimético" se usan indistintamente en el presente documentos para referirse a un péptido, molécula peptídica parcial o no peptídica que imita la estructura de unión terciaria o la actividad de un dominio funcional de péptido o proteína natural seleccionado (por ejemplo, motivo de unión o sitio activo). Estos péptidos miméticos incluyen péptidos modificados de manera recombinante o química, así como agentes no peptídicos tales como miméticos de fármacos de moléculas pequeñas, como se describe más detalladamente a continuación.

Por "farmacéuticamente aceptable", "fisiológicamente tolerable", y las variaciones gramaticales de los mismos, como se refieren a composiciones, portadores, diluyentes y reactivos u otros ingredientes de la formulación, pueden usarse indistintamente y representan que los materiales son capaces de administrarse sin la producción de efectos fisiológicos indeseables, tales como náuseas, mareos, erupción, trastornos gástricos u otros efectos perjudiciales para el receptor del mismo.

Tal como se usa en el presente documento, el término "terapéutico" significa un agente utilizado para tratar, combatir, aliviar, prevenir o mejorar una afección o enfermedad no deseada de un paciente. En parte, las realizaciones de la presente divulgación se dirigen al tratamiento de la inflamación, enfermedades relacionadas con la obesidad, enfermedades metabólicas, enfermedades cardiovasculares, enfermedades cerebrovasculares y neurodegenerativas, cáncer o la proliferación aberrante de células.

Las expresiones "terapéuticamente eficaz" o "eficaz", tal como se usa en el presente documento, se pueden usar indistintamente y se refieren a una cantidad de una composición terapéutica de realizaciones de la presente divulgación (por ejemplo, uno o más de los péptidos o miméticos de los mismos). Por ejemplo, una cantidad terapéuticamente eficaz de una composición es una cantidad predeterminada calculada para lograr el efecto deseado.

Una "cantidad terapéuticamente eficaz" o "cantidad eficaz" de una composición es una cantidad predeterminada calculada para lograr el resultado deseado. La actividad contemplada por los presentes métodos incluye tanto tratamiento médico terapéutico y/o profiláctico, según sea apropiado. La dosis específica de un compuesto administrado de acuerdo con esta divulgación para obtener efectos terapéuticos y/o profilácticos, se determinará, por supuesto, por las circunstancias particulares que rodean el caso, por supuesto, incluyendo, por ejemplo, el compuesto administrado, la vía de administración y la afección a tratar. Sin embargo, el médico puede determinar la cantidad eficaz administrada a la luz de las circunstancias relevantes que incluyen la afección a tratar, la elección del compuesto a administrar y la vía de administración elegida, y por lo tanto, los intervalos de dosificación anteriores no pretenden limitar el alcance de la divulgación de ninguna manera. Una cantidad terapéuticamente eficaz de compuesto de la presente divulgación es generalmente una cantidad tal que, cuando se administra en una composición de excipiente fisiológicamente tolerable, es suficiente para lograr una concentración sistémica eficaz o una concentración local en el tejido.

Los términos "tratar", "tratado", o "que trata", como se usan en el presente documento, se refieren tanto a tratamiento terapéutico como profiláctico o a medidas preventivas, en donde el objeto es prevenir o ralentizar (disminuir) una afección, trastorno o enfermedad fisiológica u obtener resultados clínicos beneficiosos o deseados. Para los fines de esta divulgación, los resultados clínicos beneficiosos o deseados incluyen, pero sin limitación: alivio de los síntomas; disminución de la extensión de la afección, trastorno o enfermedad; estabilización (es decir, no empeoramiento) del estado de la afección, trastorno o enfermedad; retraso en el inicio o ralentización de la progresión de la afección, trastorno o enfermedad; alivio de la afección, trastorno o estado de enfermedad y remisión (ya sea parcial o total), ya sea detectable o no detectable, o potenciación o mejora de la afección, trastorno o enfermedad. El tratamiento incluye provocar una respuesta clínicamente significativa sin niveles excesivos de efectos secundarios. El tratamiento también incluye prolongar la supervivencia en comparación con la supervivencia esperada si no se recibe tratamiento.

Hablando en general, el término "tejido" se refiere a cualquier agregación de células especializadas de forma similar que se unen en el desempeño de una función particular.

Tal como se usa en el presente documento, los términos "anticuerpo", "anticuerpos", "fragmento de anticuerpo" o "fragmentos de anticuerpo" así como los términos asociados con anticuerpos tales como un fragmento variable de cadena sencilla ("scFv") se extenderán a todos los anticuerpos, fragmentos de anticuerpos y proteínas de unión de tipo anticuerpo que incluyen, pero sin limitación: proteínas VHH de camélidos o anexas.

La pentraxina-2 humana (hPTX-2), también llamada amiloide P sérico (hSAP) se expresa de manera constitutiva en el hígado y circula a aproximadamente 20-40 µg/ml en plasma como el homopentámero de 5 protómeros unidos no covalentemente. La PTX-2 humana funciona en la resistencia innata a los microbios y en la eliminación y fagocitosis de los desechos celulares y parece desempeñar un papel en la regulación de la cicatrización de heridas y la fibrosis. Estas funciones pueden involucrar (i) la unión a ligandos asociados con microbios y desechos celulares, como se especifica anteriormente, y varias proteínas de la matriz extracelular de manera dependiente de Ca^{2+} , (ii) la unión a

C1q para la activación del complemento promoviendo la opsonización por C3b y iC3b, (iii) la unión a los receptores Fcγ para iniciar la opsonización directa y la posterior fagocitosis o endocitosis, y (iv) la regulación posterior de la función de los monocitos. Como tales, las moléculas de hPTX-2 se localizan en sitios de lesión y reparación y pueden dirigirse y/o concentrarse en estas ubicaciones mediante la unión de estas moléculas.

La estructura 3D de hPTX-2 se ha determinado mediante cristalografía de rayos X (Figura 1) y también se han indicado varias estructuras cristalinas de complejos de hPTX-2 con diferentes ligandos. La estructura pentamérica de hPTX-2 tiene una simetría rotacional de orden 5, es bastante rígida y tiene un poro. El diámetro del pentámero hPTX-2 es de aproximadamente 100 Å, y el poro central tiene un diámetro de 20 Å y una profundidad de 35 Å. Cada protómero está constituido por cadenas β antiparalelas dispuestas en dos láminas, con un núcleo hidrófobo con una topología de rollo de gelatina. El pentámero hPTX-2 tiene 2 caras, una cara A, que posee cinco hélices α, una en cada protómero, y una cara B con 5 conjuntos de sitios de doble unión a calcio. Se piensa que la cara B proporciona una cara de unión a ligando dependiente de calcio, y se han identificado varios ligandos dependientes de calcio que se unen a la cara B, que incluyen fosforiletanolamina, ADN, heparán sulfato, dermatán sulfato y sulfato de dextrano, laminina y colágeno IV. La cara A de hPTX-2 también parece unirse a moléculas tales como C1q y puede mediar la fagocitosis a través de la unión a los receptores de Fcγ. Cada protómero puede estar glicosilado en Asn32, un sitio único.

Los extremos N-terminal y C-terminal son accesibles al disolvente y están ubicados en el borde interno de cada molécula de protómero como se indica en la FIG. 1. El extremo N-terminal está ubicado en el borde exterior de cada protómero y en el perímetro del anillo formado por los 5 protómeros. El extremo C-terminal está ubicado más hacia el perímetro interno y el poro del anillo de pentámero, pero se dirige hacia el exterior hacia la cara A. Los extremos N-terminal y C-terminal dentro de un protómero están separados aproximadamente 25 Å. Los extremos no parecen estar involucrados en las interacciones de las subunidades y están alejados de la cadena de glucano unida en Asn32. Las subunidades de hPTX-2 se mantienen juntas de forma no covalente con aproximadamente el 15% de la superficie de cada subunidad involucrada en estas interacciones. Estas extensas interacciones explican la considerable estabilidad del pentámero hPTX-2.

La Pentraxina-2 es un miembro de la familia de proteínas pentraxinas que está relacionada con otras pentraxinas cortas, tal como la pentraxina-1 (PTX-1, también llamada proteína C reactiva, CRP), y pentraxinas largas, tal como PTX-3. Tal como se ilustra en la FIG. 2, todas las pentraxinas comparten un dominio de pentraxinas básico (círculos), y en las pentraxinas cortas, este dominio de pentraxinas básico define la proteína completa. Por el contrario, las pentraxinas largas incluyen el dominio básico de pentraxina (círculos), así como un dominio N-terminal no relacionado estructural y funcionalmente que puede ser aproximadamente igual en longitud al dominio de pentraxina (extensiones dilatadas). Se ha predicho que el dominio N-terminal de PTX-3 es una hélice superenrollada α-helicoidal que se ha demostrado que se une al factor de crecimiento de fibroblastos 2. El dominio de pentraxina C-terminal de PTX-3 es capaz de unirse a C1q como las pentraxinas cortas PTX-2 y CRP, y aunque no se han obtenido estructuras cristalinas de las pentraxinas largas, la estructura proyectada del dominio de pentraxina PTX-3 tiene una fuerte similitud tanto con PTX-1 como con PTX-2. Las pentraxinas largas, por lo tanto, parecen tener dos dominios funcionales separados que crean la posibilidad de que dominios de proteínas adicionales, moléculas de péptidos u otras moléculas no proteicas con diferentes propiedades funcionales respecto a la PTX-2 puedan unirse al extremo N-terminal o C-terminal de la PTX-2 al tiempo que conservan el dominio de pentraxina y la estructura pentamérica general y la función de la PTX-2.

Adicionalmente, la naturaleza pentamérica de las moléculas de hPTX-2 da como resultado una avidez incrementada de las interacciones con otras moléculas. Esto puede ser ventajoso sobre interacciones moleculares de naturaleza más simple que involucran la disponibilidad cercana de solo un sitio de unión de cada molécula y puede conducir a una afinidad incrementada por la molécula y una respuesta más eficaz a concentraciones más bajas de moléculas liberadas. La naturaleza pentamérica de hPTX-2 también conduce a la posibilidad de entrecruzamiento de, por ejemplo, los receptores de Fcγ en la superficie celular, que pueden afectar las respuestas celulares. Estas propiedades, junto con las propiedades de hPTX-2 que lo localizan en los sitios de lesión y reparación, establecen el potencial de hPTX-2 para utilizarse como una molécula de "armazón" para suministrar otras entidades moleculares de manera eficaz, tales como agentes terapéuticos, profilácticos o de diagnóstico. Otras entidades moleculares añadidas a hPTX-2 también pueden añadir nuevas propiedades funcionales y/o de administración a dicha molécula de proteína de fusión.

Se describe el uso de pentraxina-2 (PTX-2) como una molécula de armazón para el anticuerpo y fragmento de anticuerpos basado en agentes terapéuticos. En dichos casos, uno o más anticuerpos y fragmentos de anticuerpos pueden unirse a un protómero de PTX-2 para formar un "protómero de PTX-2 funcionalizado", y estos protómeros de PTX-2 funcionalizados pueden combinarse para formar pentámeros de PTX-2 funcionalizados. Por lo tanto, algunos casos se dirigen a protómeros de PTX-2 funcionalizados, y otros casos se dirigen a pentámeros de PTX-2 funcionalizados. Otros casos más se dirigen a composiciones farmacéuticas que incluyen protómeros de PTX-2 funcionalizados y pentámeros de PTX-2 funcionalizados, y métodos para usar protómeros de PTX-2 funcionalizados y pentámeros de PTX-2 funcionalizados para el tratamiento de diversos trastornos y enfermedades.

Aún otros casos más se dirigen a métodos para fabricar protómeros de PTX-2 funcionalizados y pentámeros de

PTX-2 funcionalizados que tienen la estructura descrita en el presente documento.

Una "proteína de fusión PTX-2" como se usa en el presente documento se define como una molécula que presenta una combinación de propiedades estructurales y funcionales de PTX-2 con propiedades estructurales y funcionales adicionales proporcionadas por entidades moleculares adicionales unidas o unidas a PTX-2. Una función de "armazón" para PTX-2 puede hacer uso de la estructura pentamérica rígida de PTX-2, la simetría rotacional y las dimensiones del pentámero, la disponibilidad de los extremos tanto N-terminal como C-terminal en cada protómero, así como otras características específicas de su estructura, incluidos sus sitios de unión a Ca^{2+} y sus sitios de unión a ligandos dependientes de Ca^{2+} , los sitios de unión C1q y FcγR, el poro central y el sitio de glicosilación.

Los protómeros de PTX-2 funcionalizados pueden disponerse de numerosas formas para llevar a cabo la función de armazón. Por ejemplo, en algunos casos, uno o más anticuerpos, uno o más fragmentos de anticuerpos, o combinaciones de los mismos, pueden unirse al extremo N-terminal o al extremo C-terminal o tanto al extremo N-terminal como al extremo C-terminal de un protómero de PTX-2. Debido a que tanto el extremo N-terminal como el C-terminal de los protómeros de PTX-2 son accesibles al disolvente y están ubicados en el perímetro de los protómeros donde no están involucrados en las interacciones de las subunidades, la proteína de fusión PTX-2 resultante puede conservar su función y estructura general en tales realizaciones mientras se proporciona un vehículo de liberación para los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

En aún otros casos, uno o más anticuerpos, uno o más fragmentos de anticuerpos, o una combinación de los mismos, se pueden diseñar en una secuencia interna de PTX-2, que se diseña para ubicarse en una superficie exterior del protómero de PTX-2 basándose en el modelado de estructuras cristalinas por rayos X conocidas de PTX-2. Dichas secuencias no-PTX-2 pueden proporcionarse además de la secuencia completa de PTX-2, o dichas secuencias no-PTX-2 pueden sustituirse por secuencias de PTX-2. La PTX-2 generalmente puede conservar el dominio de pentraxina, la estructura pentamérica global y la función general de PTX-2, mientras que las secuencias no de PTX-2 pueden conferir propiedades funcionales adicionales a PTX-2.

En otros casos adicionales, los anticuerpos y los fragmentos de anticuerpos pueden unirse a los protómeros de PTX-2 individuales o a PTX-2 pentamérica a través de medios químicos tales como, por ejemplo, enlaces químicos o una unión muy estrecha con aminoácidos o carbohidratos en la superficie de los protómeros de PTX-2 o PTX-2 pentamérica mediante quelación con los sitios de unión a Ca^{2+} en cada protómero de PTX-2. En realizaciones adicionales, se pueden sustituir uno o más sitios de unión a otros metales por los sitios de unión a Ca^{2+} o, de otro modo, diseñarse en los protómeros de PTX-2 en otra parte de la molécula para producir protómeros de PTX-2 o PTX-2 pentamérica que se unen a clases específicas de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos.

El PTX-2 descrito en el presente documento incluye PTX-2 de cualquier procedencia tal como, por ejemplo, PTX-2 humano o isómeros o análogos de otras fuentes de vertebrados o mamíferos. PTX-2 abarca además moléculas de PTX-2 que tienen modificaciones de la secuencia de aminoácidos de PTX-2 natural introducida mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio. Dicha modificación puede alterar aminoácidos específicos y/u otras características de la molécula, mientras conserva la naturaleza de pentraxina pentamérica de la molécula. La "PTX-2" se puede usar para abarcar tanto los pentámeros de PTX-2 como los protómeros de PTX-2. "Pentámero de PTX-2" o "PTX-2 pentamérica" se refiere a un complejo de proteínas que incluye al menos cinco protómeros de PTX-2, y "protómero de PTX-2" se refiere a una unidad de proteína individual del pentámero de PTX-2.

La secuencia del protómero de PTX-2 humano maduro se describe a continuación, que corresponde a los aminoácidos 20-223 del N° de acceso de Gene Bank NP_001630 (secuencia de señal no representada).

HTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTIPLEKPLQNFTLCFRAYSDDL
 SRAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTISKVIE
 KFPAPVHICVSWESSSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP
 KIVLGQEQDSYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSA
 YQGTPLPANILDWQALNYEIRGYVIKPLVWV (SEQ ID NO: 1)

En algunos casos, el protómero de PTX-2 puede ser 100% idéntico a la secuencia de aminoácidos natural de la PTX-2 de origen según se determina usando FASTDB (SEQ ID NO: 1), y en otros casos, el protómero de PTX-2 puede tener una secuencia de aminoácidos que es al menos el 60%, al menos el 70 %, al menos el 80 %, al menos el 85 %, al menos el 90 %, al menos el 95 %, al menos el 97 %, al menos el 98 %, al menos un 99 % idéntica a la SEQ ID NO: 1. En casos particulares, los aminoácidos no evolutivamente conservados pueden incluirse en los aminoácidos no idénticos. Los "aminoácidos no evolutivamente conservados" como se usan en el presente documento pueden referirse a aminoácidos que son variables cuando se comparan las secuencias de aminoácidos primarias de especies ortólogas evolutivamente relacionadas, por ejemplo, aquellas en el mismo orden. En los

diversos casos expuestos a continuación, los aminoácidos de PTX-2 que pueden mutarse o modificarse pueden ser generalmente aquellos aminoácidos que no están conservados evolutivamente. Por ejemplo, un protómero de PTX-2 que tiene una secuencia de aminoácidos que es al menos el 95% idéntica a la PTX-2 humana (SEQ ID NO: 1) puede tener restos no idénticos en posiciones donde difieren la PTX-2 humana y otras PTX-2 de vertebrados.

En determinados casos, los aminoácidos no idénticos pueden tener propiedades químicas similares al aminoácido natural para efectuar una "sustitución conservativa". En particular, los aminoácidos que se sabe que tienen propiedades similares incluyen: E, D, N, Q; H, K, R; Y, F y W; I, L, V, M, C, A; y S, T, C, P, A y las sustituciones conservativas son los reemplazos, uno por otro, de los aminoácidos alifáticos Ala, Val, Leu e Ile, los aminoácidos básicos Lys y Arg, los aminoácidos ácidos Asp y Glu, los aminoácidos que contienen hidroxilo Ser y Thr, los aminoácidos que contienen amida Asn y Gln, y los aminoácidos aromáticos Phe y Tyr. Se puede encontrar orientación adicional sobre qué cambios de aminoácidos pueden ser fenotípicamente silenciosos en Bowie et al., Science 247:1306-1310 (1990). Los polipéptidos que comparten al menos un 95% de identidad con la SEQ ID NO: 1 pueden incluir polipéptidos que tienen sustituciones conservativas en estas áreas de divergencia.

En algunos casos, las características estructurales de los protómeros de PTX-2 que confieren funciones específicas tales como, por ejemplo, la unión a FcγR o la unión a ligandos dependiente de Ca^{2+} , pueden mutarse para eliminar estas características. En dichos casos, la eliminación de las características estructurales que no son necesarias para la función prevista puede eliminar la posible interferencia con la función o el direccionamiento de la proteína de fusión de PTX-2. En otros casos, otros cambios en el protómero de PTX-2, tales como los cambios en la secuencia de aminoácidos en el extremo N-terminal o C-terminal o una secuencia interna que forma parte de un bucle expuesto en la superficie, pueden introducirse mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio y pueden proporcionar características adicionales a la proteína de fusión de PTX-2 tales como, por ejemplo, mejorar la solubilidad o añadir un aminoácido o aminoácido modificado que se puede usar para unir agentes activos. En casos particulares, las características estructurales de PTX-2 tales como, por ejemplo, la unión a FcγR o la unión a ligandos dependiente de Ca^{2+} pueden eliminarse mediante la mutación selectiva de los aminoácidos involucrados en estas funciones. En algunos casos, tales protómeros de PTX-2 modificados o PTX-2 pentamérica pueden usarse cuando se desea el direccionamiento de otro resto como se confiere por un agente activo unido. Adicionalmente, la eliminación o reducción selectiva de la unión de FcγR o la unión a ligandos dependiente de Ca^{2+} puede reducir la capacidad de PTX-2 para acumularse en áreas de inflamación permitiendo una mayor retención de la proteína de fusión de PTX-2 en circulación. Por lo tanto, los protómeros de PTX-2 modificados pueden ser útiles cuando se desea una mayor retención en el entorno circulatorio, o cuando la competencia con la unión de PTX-2 endógena no fuera deseable.

En dichos casos, la adición de secuencias de proteínas secundarias, incluidas las secuencias de anticuerpos y fragmentos de anticuerpos utilizadas para proporcionar una actividad terapéutica para la PTX-2 y cualquier mutagénesis dirigida al sitio o delección del protómero de PTX-2, puede ubicarse de manera tal que se mantenga sustancialmente la estructura pentamérica de PTX-2. El diseño de dichas proteínas de fusión puede guiarse en función de las estructuras cristalinas por rayos X de PTX-2 disponibles, junto con el conocimiento de los restos clave implicados en las interacciones de unión intraprotoméricas y extramoleculares. Por lo tanto, se pueden identificar secuencias y restos de aminoácidos individuales que se sabe que están involucrados en la interacción entre los protómeros, y generalmente aquellos necesarios para la formación de la estructura de pentraxina en rollo de gelatina aplanada y se pueden añadir secuencias de proteínas secundarias fuera de dichas regiones para que la proteína de fusión de protómero de PTX-2 pueda asociarse en pentámeros. Por ejemplo, la mutagénesis dirigida al sitio puede llevarse a cabo en los aminoácidos dentro de los dominios de unión a Ca^{2+} , o a receptor o a ligandos del protómero de PTX-2 para producir una proteína de fusión de PTX-2 con las características deseadas, y en otras realizaciones, los dominios de unión a Ca^{2+} , o a receptor o a ligandos pueden eliminarse completa o sustancialmente.

En aún otros casos, El "protómero de PTX-2" puede abarcar fragmentos funcionales y proteínas de fusión que incluyen cualquiera de las porciones de un protómero de PTX-2. Un "fragmento funcional" de PTX-2 puede incluir una o más porciones del protómero o dominios de PTX-2 que retienen la capacidad de llevar a cabo una o más funciones asociadas con el protómero de PTX-2 como un todo. Por ejemplo, un fragmento funcional puede incluir solo las porciones del protómero de PTX-2 necesarias para el ensamblaje del pentámero, y en otros casos, un fragmento funcional puede incluir las porciones del protómero de PTX-2 necesarias para el ensamblaje del pentámero y una porción del protómero de PTX-2 necesaria para la unión del ligando o la unión de Ca^{2+} . En determinados casos, dichos fragmentos funcionales pueden modificarse adicionalmente para incluir un agente activo, creando así un fragmento funcional de protómero de PTX-2 funcionalizado.

Aún otros casos se relacionan con las variantes de PTX-2. "Variante de PTX-2" pretende referirse a una proteína que tiene una secuencia de aminoácidos primaria significativamente similar y/o similitud estructural con el protómero de PTX-2 o de dos a cinco protómeros de PTX-2 ensamblados que demuestran una o más características mejoradas en comparación con el pentámero de PTX-2 humano incluyendo, pero sin limitación: solubilidad en agua incrementada, vida media en plasma incrementada, estabilidad *in vitro* incrementada, estabilidad *in vivo* incrementada y potencia incrementada.

En general, un protómero de PTX-2 o fragmento funcional de un protómero de PTX-2 útil en realizaciones puede ser soluble en soluciones acuosas a niveles biológicamente relevantes de temperatura, pH y osmolaridad. Los

protómeros que se asocian de manera no covalente para formar PTX-2 pueden tener secuencias de aminoácidos idénticas y/o modificaciones postraduccionales o, de manera alternativa, los protómeros individuales pueden tener diferentes secuencias y/o modificaciones.

- 5 En algunos casos, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a los protómeros de PTX-2 utilizando tecnología recombinante para añadir o sustituir secuencias en el extremo N-terminal y/o en el extremo C-terminal del protómero de PTX-2 para crear proteínas de fusión. En dichos casos, pueden introducirse uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en el extremo N-terminal o C-terminal del protómero de PTX-2, y en algunos casos, pueden introducirse consecutivamente dos o más anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, de modo que cada anticuerpo o fragmento de anticuerpo sea colindante a al menos otro anticuerpo o fragmentos de anticuerpo como perlas en una cadena. En otros casos, uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden codificarse en cada uno de los extremos N-terminal y C-terminal del protómero de PTX-2. Por ejemplo, en realizaciones particulares, puede introducirse una primera secuencia de aminoácidos de anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el extremo C-terminal del protómero de PTX-2 y puede introducirse una segunda secuencia de aminoácidos de anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el extremo N-terminal del mismo protómero de PTX-2.

- En otros casos, la secuencia de aminoácidos del anticuerpo o fragmento de anticuerpo agregada a un protómero de PTX-2 puede incluir enlazadores que separan las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo añadido de las unidades estructurales necesarias del protómero de PTX-2. Dicho enlazador puede adicionalmente separar o acercar más a los restos que no son PTX-2, y/o estimular el plegamiento de la proteína del anticuerpo, fragmento de anticuerpo o protómero de PTX-2. Se puede usar, en realizaciones, cualquiera de las numerosas secuencias enlazadoras conocidas en la técnica. Dichos enlazadores pueden ser enlazadores flexibles y pueden incluir unidades de repetición de la secuencia de aminoácidos GGGGS, (GGGGS)_n en donde n puede ser de 1 a 5. El enlazador puede ser GGGSGGGSGGGGS, que se usa comúnmente para separar las cadenas ligeras y pesadas en scFv. Se pueden usar versiones más cortas de tales enlazadores que tienen, por ejemplo, una n que es menor de 3. En otras realizaciones más, el enlazador puede ser un enlazador rígido, que puede basarse en secuencias formadoras de hélices alfa como, por ejemplo, (PAPAP)_n en donde n puede ser de 1 a 5. La longitud de los enlazadores flexibles o rígidos se puede ajustar para proporcionar la proximidad deseada entre, por ejemplo, el protómero de PTX-2 y las secuencias de aminoácidos del anticuerpo o del fragmento de anticuerpo en protómeros colindantes, o para asegurar que se mantienen las propiedades funcionales y/o físicas de PTX-2.

- Se pueden incorporar pares de cisteína para formar disulfuros intracatenarios o intercatenarios para estabilizar bucles o dominios y para ayudar en la presentación del anticuerpo o fragmento de anticuerpo en el protómero de PTX-2. Por ejemplo, una cisteína puede incorporarse en el protómero de PTX-2 mediante, por ejemplo, mutagénesis dirigida al sitio, que forma un enlace disulfuro con una cisteína en el aminoácido del anticuerpo o fragmento de anticuerpo que está unido a los protómeros de PTX-2. La mutagénesis dirigida al sitio puede usarse para añadir un enlace disulfuro para estabilizar porciones del protómero de PTX-2 que pueden haber formado interacciones que se pierden como resultado de delecciones o sustituciones en porciones de PTX-2 donde se produce la unión a FcγR o la unión al ligando dependiente de Ca²⁺ cuando se eliminan estas funciones.

- Las proteínas de fusión del pentámero de PTX-2 pueden estar compuestas por protómeros de PTX-2 funcionalizados, cada uno con los mismos anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos, y en otros casos, las proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas pueden incluir protómeros de PTX-2 funcionalizados que tienen diferentes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos. Las proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas pueden incluir una combinación de protómeros de PTX-2 funcionalizados y no funcionalizados, y los protómeros de PTX-2 funcionalizados de tales proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas pueden tener los mismos o diferentes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos. Los protómeros de PTX-2 funcionalizados que tienen diferentes anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos pueden combinarse en pentámeros de PTX-2. Como entenderán los expertos en la materia, pueden crearse pentámeros de PTX-2 pentaméricos que tienen cualquier combinación de protómeros de PTX-2 funcionalizados y protómeros de PTX-2 no funcionalizados, y la disponibilidad de un anticuerpo y fragmento de anticuerpo específicos puede efectuarse modificando las proporciones del protómero funcionalizado en la mezcla de protómeros funcionalizados y protómeros no funcionalizados utilizados para preparar PTX-2 pentamérica funcionalizada. Por ejemplo, una mezcla de protómeros funcionalizados y protómeros no funcionalizados preparados en una proporción de 1 protómero de PTX-2 funcionalizado a 4 protómeros de PTX-2 no funcionalizado creará pentámeros de PTX-2 que tienen en promedio 1 protómero de PTX-2 funcionalizado y 4 protómeros de PTX-2 no funcionalizados.

- Los ejemplos de pentámeros de PTX-2 funcionalizados incluyen pentámeros de PTX-2 con posibles implicaciones terapéuticas que se han diseñado para satisfacer las necesidades médicas actuales. Por ejemplo, como se muestra en la FIG. 3, cada protómero del pentámero de PTX-2 puede estar funcionalizado y puede incluir el anticuerpo y el fragmento de anticuerpo introducidos en el extremo N-terminal o C-terminal. En particular, la FIG. 3A muestra protómeros de PTX-2 que incluyen un fragmento scFv dibujado aproximadamente a escala, tales como, un scFv anti-TNF-α, que se puede usar como agente antiinflamatorio, y los pentámeros de PTX-2 pueden incluir tanto protómeros funcionalizados como protómeros no funcionalizados como se muestra en la FIG. 3B. El fragmento de anticuerpo mostrado en la FIG. 3 está dibujado a escala y tiene aproximadamente el mismo tamaño molecular que la extensión N-terminal en PTX-2.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona protómeros de PTX-2 funcionalizados, así como pentámeros que comprenden los mismos, que se unen a TNF- α . En ciertos casos, un protómero de PTX-2 funcionalizado que se une a TNF- α comprende un anticuerpo anti-TNF- α o un fragmento de unión a antígeno del mismo. Por ejemplo, los protómeros anti-TNF- α -PTX-2 de esta divulgación pueden comprender el anticuerpo de TNF- α infliximab o una porción de unión a antígeno del mismo. Un protómero anti-TNF- α -PTX-2 funcionalizado de esta divulgación, así como pentámeros que comprenden el mismo, puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Opcionalmente, un protómero anti-TNF- α -PTX-2 funcionalizado de esta divulgación, así como pentámeros que comprenden el mismo, incluye uno o más restos de aminoácidos modificados seleccionados de: un aminoácido glicosilado, un aminoácido PEGilado, un aminoácido farnesilado, un aminoácido acetilado, un aminoácido biotinilado, un aminoácido conjugado con un resto lipídico, y un aminoácido conjugado con un agente de derivatización orgánico.

Un protómero de PTX-2 funcionalizado que se une a TNF- α , así como pentámeros que comprenden el mismo, puede formularse como preparaciones farmacéuticas que comprenden el protómero de PTX-2 funcionalizado que se une a TNF- α y un portador farmacéuticamente aceptable. Dichas preparaciones farmacéuticas también pueden incluir uno o más compuestos adicionales, tales como un compuesto que se usa para tratar un trastorno relacionado con TNF- α y/o inflamación en el paciente. En general, se prefiere que un protómero anti-TNF- α -PTX-2 funcionalizado, así como pentámeros que comprenden los mismos, se exprese en una línea celular de mamíferos que media adecuadamente la glicosilación natural del protómero anti-TNF- α -PTX-2 para disminuir la probabilidad de una respuesta inmunitaria desfavorable en un paciente. Se pueden usar líneas celulares humanas y CHO, y se espera que sean útiles otros sistemas comunes de expresión de mamíferos.

También se describen métodos para preparar protómeros de PTX-2 funcionalizados. La secuencia de ADN del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se puede introducir en la secuencia de ADN del protómero de PTX-2 para crear una secuencia de ADN recombinante que produce un protómero de PTX-2 funcionalizado cuando se expresa. Se pueden usar técnicas de biología molecular convencionales para crear vectores de expresión o plásmidos que tienen una secuencia de ADN apropiada en un marco de lectura abierto que conducirá a la expresión del protómero de PTX-2 funcionalizado cuando el vector de expresión se introduce en un sistema de expresión apropiado. Como se indicó anteriormente, la secuencia del anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede fusionarse al extremo N-terminal o al extremo C-terminal del protómero de PTX-2 y disponerse de tal manera que la secuencia esté en la orientación correcta. Una secuencia de ADN para un enlazador, tal como las descritas anteriormente, puede colocarse entre el extremo N-terminal o el extremo C-terminal y la secuencia de anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En determinadas realizaciones, dos o más secuencias para el mismo o diferente anticuerpo o fragmento de anticuerpo pueden introducirse consecutivamente en las secuencias de ADN del extremo N-terminal o del extremo C-terminal, y las secuencias para los enlazadores pueden colocarse entre cada secuencia de anticuerpo o de fragmento de anticuerpo. Se pueden introducir una o más secuencias de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en las secuencias de ADN tanto del extremo N-terminal como del extremo C-terminal.

Los vectores de expresión de diversas realizaciones pueden incluir cualquier número de secuencias adicionales necesarias para la replicación, selección y similares, y se puede usar cualquiera de las numerosas secuencias de este tipo conocidas en la técnica y cualquier tipo de promotor para promover la expresión del protómero de PTX-2 funcionalizado. Por ejemplo, un promotor constitutivo puede controlar la expresión del protómero de PTX-2 funcionalizado y en otras realizaciones, los vectores de expresión pueden incluir además promotores inducibles dispuestos para controlar la expresión del protómero de PTX-2 funcionalizado.

El sistema de expresión puede variar y puede incluir cultivos bacterianos o varios cultivos celulares, y en realizaciones particulares, los protómeros de PTX-2 recombinantes pueden expresarse en sistemas de cultivo de células de mamíferos o insectos para que se agregue la estructura inicial de glicano adecuada en Asn 32 del protómero de PTX-2. Se puede introducir en el sistema de expresión cualquier número de plásmidos para la expresión de protómeros de PTX-2 funcionalizados y protómero de PTX-2 de origen natural o de tipo silvestre, de manera que la expresión conjunta de estos protómeros de PTX-2 funcionalizados y no funcionalizados de como resultado pentámeros de PTX-2 que presentan diferentes agentes activos o diferentes números de agentes activos en cada pentámero. La expresión de los protómeros de PTX-2 funcionalizados y no funcionalizados puede controlarse de tal manera que puede controlarse la proporción de cada protómero de PTX-2 funcionalizado y/o protómero de PTX-2 de tipo silvestre. El control de la expresión puede llevarse a cabo por cualquier medio. Por ejemplo, la proporción de cada protómero en un pentámero de PTX-2 resultante puede controlarse mediante el número de copias de plásmidos a partir de los cuales se expresan los protómeros de PTX-2 funcionalizados o no funcionalizados, y la expresión puede controlarse mediante un promotor constitutivo. La expresión se puede controlar por un promotor inducible.

Después de la expresión, los protómeros de PTX-2 y/o PTX-2 pentamérica pueden aislarse y purificarse utilizando técnicas conocidas tales como, por ejemplo, centrifugación, ultra centrifugación, extracción por saturación de sal, diálisis, filtración, cromatografía en columna y similares y diferentes combinaciones de las mismas. El protómero de PTX-2 funcionalizado o no funcionalizado recombinante puede incluir además una etiqueta tal como, por ejemplo, una cola de histidina, para ayudar en la purificación.

Cuando se utiliza más de un tipo de protómero de PTX-2 funcionalizado para crear el pentámero de PTX-2, se pueden introducir vectores de expresión para uno o más protómeros de PTX-2 funcionalizados y/o no funcionalizados en un sistema de expresión apropiado de modo que la combinación deseada de protómeros se expresa simultáneamente, es decir, se expresan de manera conjunta. A continuación, se puede usar una tecnología de purificación apropiada para separar aquellos pentámeros de PTX-2 que tienen la combinación deseada de restos de aquellos que no, por ejemplo, mediante la inclusión de etiquetas de purificación introducidas de forma recombinante y/o mediante el uso secuencial de separaciones cromatográficas que hacen uso de propiedades exclusivas de cada uno de los restos. Las características de diseño, tales como ciertos aminoácidos en las áreas de interacción de protómeros de PTX-2, pueden introducirse en protómeros específicos de tal manera que se promueva la asociación de protómeros de PTX-2 que llevan restos no similares durante el ensamblaje.

Los pentámeros de PTX-2 funcionalizados se pueden aislar y/o purificar directamente después de la preparación, ya que, en general, se formarán pentámeros de PTX-2 en presencia de suficiente protómero de PTX-2 y/o protómeros de PTX-2 funcionalizados, y estos pentámeros de PTX-2 aislados y/o purificados funcionalizados se pueden incorporar directamente a, por ejemplo, una composición farmacéutica. Los métodos para preparar pentámeros de PTX-2 funcionalizados pueden incluir aislar y/o purificar pentámeros de PTX-2 funcionalizados, y disociar, a continuación, los pentámeros de PTX-2 funcionalizados en protómeros de PTX-2 funcionalizados. Los protómeros de PTX-2 funcionalizados separados pueden combinarse, a continuación, con otros protómeros de PTX-2 funcionalizados o no funcionalizados, seguido de reformación de los pentámeros de PTX-2 a partir de la combinación de los protómeros de PTX-2. Se proporciona un esquema como ejemplo en la FIG. 4. Como se ilustra, se pueden combinar hasta cinco protómeros de PTX-2 diferentes, dando como resultado un pentámero de PTX-2 con hasta cinco agentes activos unidos diferentes. Los protómeros de PTX-2 combinados pueden incluir de 1 a 5 protómeros de PTX-2 funcionalizados y darán lugar a pentámeros de PTX-2 que tienen menos de cinco agentes activos diferentes. Los protómeros de PTX-2 no funcionalizados pueden combinarse con los protómeros de PTX-2 que tienen de 1 a 5 agentes activos unidos para reducir el número de agentes activos asociados con el pentámero de PTX-2.

En determinados aspectos, la divulgación proporciona un ácido nucleico que codifica un protómero anti-TNF- α -PTX-2 funcionalizado, fragmentos y variantes funcionales del mismo. Los ácidos nucleicos en cuestión pueden ser monocatenarios o bicatenarios. Tales ácidos nucleicos puede ser ADN o ARN. Se describen ácidos nucleicos recombinantes o aislados secuenciados que codifican un protómero anti-TNF- α -PTX-2 que es al menos un 80%, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 %, o un 100 % idéntico a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2. Un experto en la materia apreciará que la secuencia de ácido nucleico que es complementaria a la SEQ ID NO: 2 también está dentro del alcance de esta divulgación. Los ácidos nucleicos de protómeros anti-TNF- α -PTX-2 divulgados en el presente documento pueden unirse operativamente a un promotor para la expresión, y la divulgación proporciona células transformadas con tales polinucleótidos recombinantes. Preferentemente la célula es una célula CHO.

La proteína de fusión de PTX-2 puede tener uso terapéutico, profiláctico o diagnóstico en, por ejemplo:

Avidez: La avides representa la fuerza combinada de las múltiples afinidades de enlace, y la avides potenciada puede mejorar la potencia de un agente suministrado al potenciar la especificidad a través de propiedades de unión mejoradas, lo que aumenta el índice terapéutico para el agente suministrado. Muchos agentes activos para su uso terapéutico o profiláctico tienen una eficacia limitada debido a la avides relativamente baja de las moléculas a las que se unen, dando como resultado una efectividad deficiente, efectos inespecíficos y un índice terapéutico bajo y posiblemente inadecuado. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, se puede lograr una avides incrementada por un agente suministrado presentando la molécula en un almacén que sea multimérico tal como la PTX-2 pentamérica, aumentando así la concentración local del agente a través del aumento de la fuerza de las múltiples afinidades de enlace. Esta ventaja se puede utilizar para impulsar un efecto local que evite un efecto sistémico más amplio, y esto puede dar como resultado una mayor especificidad y posiblemente efectos sistémicos menos tóxicos. Por lo tanto, en algunas realizaciones, las proteínas de fusión de PTX-2 pueden usarse para aumentar la avides de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo terapéutico o profiláctico.

Por ejemplo, puede ser deseable una reducción en la señalización del receptor, por ejemplo, cuando hay una sobreproducción del ligando afín asociado con un estado de enfermedad. Se puede usar una PTX-2 funcionalizada para bloquear la acción del ligando afín para tratar la enfermedad. Por ejemplo, la artritis reumatoide puede estar causada por la sobreproducción de una citoquina inflamatoria como TNF α y puede causar daño tisular. Una PTX-2 funcionalizada puede unirse directamente al ligando afín para inhibir su unión al receptor al proporcionar un anticuerpo o fragmento de anticuerpo a la PTX-2 funcionalizada. La PTX-2 funcionalizada puede unirse directamente al ligando reduciendo la concentración circulante del ligando y reduciendo la inflamación.

Direccionamiento: Las proteínas de fusión de PTX-2 también pueden diseñarse para dirigirse específicamente a otras ciertas moléculas o células específicas o sitios *in vivo* para su uso en aplicaciones terapéuticas y profilácticas. Por ejemplo:

Direccionamiento dirigido a PTX-2: PTX-2 se une a una variedad de ligandos que se concentran en los sitios de

infección, herida, reparación y fibrosis, así como el componente C1q de la vía del complemento y FcγR, que se expresan en la superficie de una variedad de células inmunitarias, incluidos los monocitos. PTX-2 puede proporcionar un medio para dirigir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a sitios de infección, herida, reparación y fibrosis, y a la superficie de varias células inmunitarias, y en ciertas realizaciones, PTX-2 puede permitir que los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos entren en estas células a través de la internalización de FcγR por endocitosis o fagocitosis. PTX-2 también se une a los restos celulares apoptóticos y puede disminuir indirectamente la activación de los miofibroblastos responsables del exceso de formación de matriz extracelular, una evidencia de fibrosis.

Direccionamiento a través de otros restos: Pueden incluirse uno o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos como parte del armazón de PTX-2 y pueden utilizarse para dirigir la proteína de fusión de PTX-2 resultante a un tipo de célula o tejido particular. Por ejemplo, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo puede unirse a un receptor, una molécula de la superficie celular, o a otro sitio específico, tal como un sitio de fijación del complemento o matriz extracelular, y dirigir la proteína de fusión de PTX-2 a ese tipo de célula o tejido específico. Una proteína de fusión de PTX-2 que tiene anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos dirigidos a un receptor de superficie de APC (por sus siglas en inglés) que puede inducir endocitosis. Al entrar en contacto con una APC, la proteína de fusión de PTX-2 pentamérica puede permitir la internalización. Una proteína de fusión de PTX-2 pentamérica puede incluir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a CD40 u otro marcador de la superficie celular involucrado en desencadenar la maduración de CD. La unión a un CD40 u otro marcador de la superficie celular involucrado en desencadenar la maduración de CD puede conducir a la maduración de CD que puede dar como resultado una inmunidad antitumoral eficaz potenciada.

Direccionamiento para acercar diferentes tipos celulares: Las proteínas de fusión de PTX-2 pueden incluir anticuerpos o fragmentos de anticuerpos que pueden actuar para acercar células del mismo tipo o diferentes, lo que puede afectar la activación o inactivación celular o la activación o inactivación de la ruta y, en algunas realizaciones, destruir las células en contacto. Se pueden proporcionar múltiples anticuerpos o fragmentos de anticuerpos en la proteína de fusión de PTX-2, y cada resto individual dirigido a la célula puede afectar a la señalización intracelular. Por ejemplo, se sabe que las células inmunitarias tales como linfocitos T, linfocitos B, linfocitos NK, células dendríticas, neutrófilos, monocitos, macrófagos y similares interaccionan entre sí, tanto a través de contactos físicos a través de ligandos de la superficie celular y receptores de la superficie celular, como de interacciones de ligandos solubles con los receptores de la superficie celular. Al presentar una combinación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpos capaces de unirse a estos tipos de células usando una proteína de fusión de PTX-2, las interacciones entre las células enumeradas anteriormente y potencialmente aquellas que involucran otros tipos de células pueden potenciarse al mejorar la proximidad de las células entre sí.

Neutralización de la actividad: Las proteínas de fusión de PTX-2 funcionalizadas pueden ser utilizadas para unirse a moléculas no deseadas que circulan *in vivo* y neutralizar su actividad. Las moléculas no deseadas pueden incluir, pero sin limitación, moléculas producidas por agentes exógenos tales como, por ejemplo, toxinas bacterianas o virus o moléculas endógenas presentes en niveles indeseables a través de procesos patológicos tales como, por ejemplo, las citocinas proinflamatorias. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos multivalentes en una proteína de armazón de PTX-2 pueden mejorar la avidéz, lo que puede conducir a una unión más fuerte y un secuestro y neutralización más rápidos y eficaces de las moléculas no deseadas.

Neutralización de moléculas endógenas: Niveles elevados de ciertas moléculas biológicas tales como, por ejemplo, hormonas, citocinas, factores de crecimiento y similares pueden contribuir a la enfermedad. Por ejemplo, los niveles de HB-EGF pueden aumentar en varios tipos de cáncer y los niveles de TNF pueden aumentar en enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario. La neutralización o la reducción del nivel de dichas moléculas biológicas puede tener un valor terapéutico, y actualmente hay disponibles varios agentes terapéuticos que actúan para secuestrar las citocinas circulantes para reducir la inflamación como etanercept (Enbrel®), un receptor de TNF recombinante soluble fusionado a la porción Fc de un anticuerpo, e infliximab (Remicade®), un anticuerpo anti-TNF, que reduce el nivel de la citocina TNF inflamatoria en la artritis reumatoide y otras enfermedades.

Las proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas creadas a partir del armazón de PTX-2 pueden tener ventajas para la neutralización de moléculas endógenas sobre dichos agentes terapéuticos. Por ejemplo, los pentámeros de PTX-2 preparados a partir de protómeros de PTX-2 funcionalizados que presentan, por ejemplo, scFv u otros derivados de anticuerpos capaces de unirse al receptor de TNF pueden tener una avidéz mejorada y eficacia aumentada sobre una proteína de fusión Fc bivalente porque el receptor de TNF es un trímero y cada sitio de unión del receptor podría estar unido por una sola proteína de fusión de PTX-2 pentamérica, pero requeriría dos moléculas de Enbrel o Remicade. Los protómeros de PTX-2 pueden incluir scFv u otros restos derivados de anticuerpos unidos, para producir proteínas de fusión anti-TNFα-PTX-2, y estas proteínas de fusión también pueden usarse para tratar la inflamación. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, ambos de estos tipos de proteínas de fusión pueden neutralizar más eficazmente el TNFα trimérico soluble que el bivalente Enbrel® y ser más eficaces en la señalización inversa antiinflamatoria a través del TNFα trimérico unido a la membrana que Remicade®.

En consecuencia, los protómeros de PTX-2 funcionalizados de esta divulgación (por ejemplo, protómeros anti-TNFα-PTX-2), así como los pentámeros de los mismos, pueden usarse para tratar o prevenir la inflamación y/o

trastornos relacionados con la inflamación en un paciente. En determinados aspectos, la divulgación proporciona métodos para tratar trastornos relacionados con TNF α en un paciente que incluyen, por ejemplo: psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias tales como espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, lupus eritematoso y sarcoidosis. En determinados aspectos, los protómeros de PTX-2 funcionalizados de la divulgación (por ejemplo, protómeros anti-TNF- α -PTX-2) se pueden usar para inhibir o reducir la producción de IL-8 *in vitro* e *in vivo* (es decir, en un paciente que lo necesite).

Neutralización de agentes de infección exógenos: En la profilaxis y el tratamiento de la enfermedad vírica, las moléculas basadas en anticuerpos neutralizantes humanos pueden ser útiles cuando las vacunas han sido difíciles de desarrollar o pueden plantear problemas de seguridad inherentes, tal como en bebés o en individuos inmunocomprometidos. Recientemente, la selección de secuencias de fragmentos de anticuerpos de las bibliotecas de presentación en fagos ha conducido al desarrollo de agentes neutralizantes basados en anticuerpos que han demostrado ser eficaces *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, se ha demostrado que los fragmentos de anticuerpos recombinantes humanos neutralizan eficazmente el metaneumovirus y el RSV *in vivo* y se ha demostrado que un anticuerpo recombinante humano de tipo común contra el virus del herpes simple proporciona protección contra el herpes simple *in vivo*. Una proteína de fusión de PTX-2 pentamérica que presenta protómeros de PTX-2 que tienen fragmentos de anticuerpos recombinantes unidos tales como, por ejemplo, scFv o restos Fab y otras proteínas pequeñas que tienen actividades de unión de tipo anticuerpo que incluyen, por ejemplo, proteínas VHH de camélidos y anexinas, puede tener mayor avidez en la unión basada en su mayor valencia dando como resultado una constante de disociación más lenta. Por lo tanto, dichas proteínas de fusión de PTX-2 pueden permanecer unidas a la proteína viral siempre y cuando al menos uno de los sitios de unión permanezca unido y pueden ser más eficaces para neutralizar varios virus.

Las proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas también pueden inducir el entrecruzamiento de partículas virales en agregados, reduciendo así el número de unidades infecciosas. Por lo tanto, las proteínas de fusión de PTX-2 pentaméricas que presentan múltiples fragmentos derivados de anticuerpos pueden tanto agregar partículas de virus mediante entrecruzamiento como neutralizar las partículas mediante la unión de alta avidez a las proteínas virales. Además, la distancia entre las secuencias de anticuerpos del protómero puede proporcionar una mayor flexibilidad para cumplir con los requisitos de distancia para unirse a al menos dos proteínas virales debido a que dichas secuencias de anticuerpos pueden estar en cualquier lugar desde aproximadamente la distancia entre la de los protómeros colindantes hasta a lo largo de la totalidad de la molécula de PTX-2 o mayor.

Trastornos sensibles a PTX-2

Los protómeros de PTX-2 de esta divulgación, que incluyen protómeros de PTX-2 funcionalizados, así como los pentámeros de los mismos, pueden conservar una o más actividades de PTX-2 natural incluyendo, por ejemplo, la capacidad de inhibir la diferenciación de los monocitos en fibroцитos. En consecuencia, la divulgación proporciona métodos para tratar un trastorno sensible a PTX-2 en un paciente mediante la administración de una cantidad terapéuticamente eficaz de protómero de PTX-2, incluyendo protómeros de PTX-2 funcionalizados de la divulgación, a un paciente que lo necesite.

El trastorno sensible a PTX-2 puede ser fibrosis. El uso de PTX-2 como tratamiento terapéutico para la fibrosis se describe en la solicitud de patente de Estados Unidos número 2007/0243163. La fibrosis y los trastornos relacionados con la fibrosis que pueden ser susceptibles de tratamiento con el método en cuestión incluyen, pero sin limitación: enfermedad del colágeno, enfermedad pulmonar intersticial, enfermedad pulmonar fibrótica humana (por ejemplo, bronquiolititis obliterante, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis pulmonar de una etiología conocida, estroma tumoral en la enfermedad pulmonar, esclerosis sistémica que afecta a los pulmones, síndrome de Hermansky-Pudlak, neumoconiosis del minero, asbestosis, silicosis, hipertensión pulmonar crónica, hipertensión pulmonar asociada al SIDA, sarcoidosis, asma moderada a grave y similares), enfermedad vascular fibrótica, esclerosis arterial, aterosclerosis, venas varicosas, infartos coronarios, infartos cerebrales, fibrosis del miocardio, fibrosis musculoesquelética, adherencias postquirúrgicas, enfermedad renal humana (por ejemplo, síndrome nefrítico, síndrome de Alport, nefropatía asociada a SIDA, enfermedad renal poliquística, enfermedad de Fabry, nefropatía diabética, glomerulonefritis crónica, nefritis asociada con lupus sistémico y similares), esclerosis sistémica progresiva (ESP), colangitis esclerosante primaria (PSC), fibrosis hepática, cirrosis hepática, fibrosis renal, fibrosis pulmonar, fibrosis quística, enfermedad injerto contra huésped crónica, esclerodermia (local y sistémica), oftalmopatía de Graves, retinopatía diabética, glaucoma, enfermedad de Peyronie, fibrosis del pene, ureteroestenosis después de cistoscopia, acreción interna después de cirugía, formación de cicatrices, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal idiopática, fibrosis peritoneal de una etiología conocida, ergotismo inducido por fármacos, fibrosis relacionada con cáncer benigno o maligno, fibrosis relacionada con una infección microbiana (por ejemplo, vírica, bacteriana, parasitaria, fúngica, etc.), enfermedad de Alzheimer, fibrosis relacionada con enfermedad inflamatoria intestinal (incluida la formación de estenosis en la enfermedad de Crohn y colitis microscópica), tumores de células estromales, mucositis, fibrosis inducida por ataques químicos o ambientales (por ejemplo, quimioterapia del cáncer, pesticidas o radiación (por ejemplo radioterapia contra el cáncer)). En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la fibrosis se selecciona de esclerodermia sistémica o local, queloides, cicatrices hipertróficas, aterosclerosis, reestenosis, inflamación pulmonar o fibrosis, fibrosis pulmonar idiopática, cirrosis hepática, fibrosis como resultado de una infección crónica de hepatitis B o C, enfermedad renal, enfermedad cardíaca resultante de tejido cicatricial,

degeneración macular y retinopatía retiniana y vítrea. En algunas realizaciones, el trastorno relacionado con la fibrosis es el resultado de los fármacos quimioterapéuticos, fibrosis inducida por radiación y lesiones y quemaduras. El trastorno o afección relacionada con la fibrosis puede ser resultado de cicatrices postquirúrgicas, por ejemplo, después de una trabeculectomía u otra cirugía de filtración del ojo.

5 El trastorno sensible a PTX-2 puede ser un trastorno de hipersensibilidad, tal como los mediados por las respuestas de Th1 o Th2. Los trastornos relacionados con la hipersensibilidad que pueden ser susceptibles de tratamiento con PTX-2 incluyen, pero sin limitación: rinitis alérgica, sinusitis alérgica, conjuntivitis alérgica, broncoconstricción alérgica, disnea alérgica, aumento alérgico en la producción de moco en los pulmones, eczema atópico, dermatitis, urticaria, anafilaxia, neumonitis y asma alérgica. En algunas realizaciones, un protómero de PTX-2 de la divulgación puede utilizarse para tratar respuestas inmunitarias específicas de alérgenos, tales como anafilaxia, a varios antígenos.

15 El trastorno sensible a PTX-2 puede ser un trastorno autoinmunitario, tal como los mediados por las respuestas de Th1 o Th2. Los trastornos relacionados con la autoinmunidad que pueden ser susceptibles de tratamiento con protómeros de PTX-2 de la divulgación incluyen, pero sin limitación, diabetes de tipo I, esclerosis múltiple, artritis reumatoide, artritis psoriásica, miocarditis autoinmunitaria, pénfigo, miastenia grave, tiroiditis de Hashimoto, enfermedad de Graves, enfermedad de Addison, hepatitis autoinmunitaria, artritis de Lyme inflamatoria, cardiomiopatía dilatada familiar, dermatomiositis juvenil, policondritis, síndrome de Sjogren, psoriasis, artritis idiopática juvenil, enfermedad inflamatoria del intestino, lupus eritematoso sistémico, enfermedad pulmonar obstructiva crónica y enfermedad de injerto contra huésped.

En algunos casos, el trastorno sensible a PTX-2 es una mucositis.

25 En determinados aspectos, las proteínas de fusión de PTX-2 que incluyen la PTX-2 funcionalizada de la divulgación se pueden usar para tratar trastornos múltiples o no relacionados en un paciente. Las proteínas de fusión de PTX-2 y los pentámeros de las mismas, incluida la PTX-2 funcionalizada de la divulgación, se pueden usar para tratar o prevenir un trastorno sensible a PTX-2 (por ejemplo, fibrosis o un trastorno relacionado con la fibrosis) y una inflamación y/o un trastorno relacionado con la inflamación en el paciente (por ejemplo, psoriasis, enfermedad de Crohn, enfermedades autoinmunitarias tales como espondilitis anquilosante, artritis psoriásica, artritis reumatoide, colitis ulcerosa, lupus eritematoso, sarcoidosis, etc.).

Vida media incrementada de posibles agentes profilácticos y terapéuticos: Las proteínas de fusión de PTX-2 que incluyen protómeros de PTX-2 funcionalizados que tienen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos pueden ser útiles para aumentar la vida media del agente activo. La PTX-2 humana es bastante estable en suero y es resistente a la proteólisis, especialmente en presencia de Ca^{2+} . Por lo tanto, la unión de moléculas menos estables a un armazón de PTX-2 puede mejorar la vida media de la molécula menos estable. Por ejemplo, la vida media eficaz de los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos puede aumentar hasta en un 50% o más al unir los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos a los protómeros de PTX-2.

40 La estabilidad de los armazones de PTX-2 puede aumentarse al proporcionar protómeros de PTX-2 funcionalizados que tienen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos que actúan para potenciar la estabilidad del PTX-2, lo que aumenta aún más la vida media del armazón de PTX-2 en circulación. Por ejemplo, el FcRn, un receptor que se expresa en una variedad de células inmunitarias, se ha demostrado que aumenta la vida media de las IgG al unirse a las IgG circulantes e inducir la endocitosis. Las IgG en el endosoma están protegidas de la degradación. Cuando las células inmunitarias se activan, las IgG endocitadas pueden transportarse fuera de la célula mediante exocitosis y liberarse nuevamente a la circulación. Varios restos de aminoácidos específicos en los dominios CH2 y CH3 de las IgG son esenciales para la unión a FcRn, y los aminoácidos en la región bisagra entre los dominios CH2 y CH3 de las IgG son diferentes de los involucrados en la unión a FcγR. También son conocidos los restos clave y las características estructurales de la unión de IgG a FcγR. Se puede preparar un armazón de PTX-2 quimérico que conserve los componentes clave de los dominios de anticuerpos CH2 y CH3, que se unen a FcRn mientras se eliminan los aminoácidos esenciales para la unión a FcγR y puede mejorar el régimen de dosificación y la efectividad de los armazones de PTX-2, mientras se evita cualquier posibilidad de la región Fc de IgG (CH2-CH3) de interferir con la unión de PTX-2 a los FcγR.

55 **Diagnóstico:** "Agentes de diagnóstico", como se usa en el presente documento, se refiere a moléculas utilizadas en ensayos *in vitro* para detectar la presencia y concentración de moléculas endógenas o moléculas exógenas que son indicativas de enfermedad. Dichos agentes de diagnóstico también pueden usarse para detectar la eficacia de agentes terapéuticos o profilácticos, por ejemplo, analizando la presencia y concentración de ciertos biomarcadores indicativos de recuperación o anticuerpos en el caso de una vacuna clásica. Actualmente, muchos agentes de diagnóstico incluyen reactivos de anticuerpos o detección de anticuerpos. La multivalencia de las proteínas de fusión de PTX-2 preparadas a partir de protómeros de PTX-2 funcionalizados con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos puede dar como resultado una interacción mejorada con un compañero de unión en comparación con una interacción antígeno monovalente/anticuerpo bivalente. En algunos casos, los agentes de diagnóstico de PTX-2 funcionalizados pueden proporcionar una sensibilidad y especificidad incrementadas que pueden permitir el desarrollo de ensayos de diagnóstico para moléculas que están presentes en una muestra a niveles de

concentración demasiado bajos para detectarse por otros medios. En consecuencia, se describen proteínas de fusión de PTX-2 y los protómeros de PTX-2 funcionalizados que presentan proteínas derivadas de anticuerpos o proteínas basadas en antígenos que se pueden usar como agentes de diagnóstico en ensayos de diagnóstico *in vitro*. Por ejemplo, las proteínas de fusión de PTX-2 que presentan scFv pueden prepararse para detectar y

5 cuantificar proteínas específicas o biomarcadores o secuencias de proteínas de la cubierta viral para detectar la formación de anticuerpos contra virus.

Los agentes de diagnóstico basados en armazones de PTX-2 tales como los descritos anteriormente pueden incluir además un marcador o sonda que permita que dichos agentes de diagnóstico se usen para la formación de

10 imágenes de tejidos o células *in vivo*. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, proporcionar un agente de diagnóstico basado en un armazón de PTX-2 multimérico puede proporcionar una mayor sensibilidad y mayor resolución que los agentes de diagnóstico similares basados en anticuerpos. Los agentes de diagnóstico basados en armazones de PTX-2 se pueden usar para la formación de imágenes *in vivo* en las que es particularmente

15 importante el direccionamiento al sitio de la enfermedad. Los agentes de diagnóstico basados en armazones de PTX-2 pueden utilizarse para dirigirse a sitios donde PTX-2 tiene una afinidad natural, tal como áreas donde se producen heridas, reparación, fibrosis y similares. Puede que no haya necesidad de incluir un grupo de direccionamiento.

Los armazones de PTX-2 utilizados como agentes de diagnóstico pueden incluir cualquier marcador o sonda conocidos en la técnica, incluidos, pero sin limitación: sondas fluorescentes, nanopartículas, radionucleótidos y similares. Se espera que la multivalencia de una proteína de armazón de PTX-2 permita la incorporación de

20 múltiples restos de direccionamiento, así como restos de detección tales como fluoróforos de infrarrojo cercano. El armazón de PTX-2 puede incluir una sonda fluorescente basada en infrarrojo cercano. Las sondas fluorescentes de infrarrojo cercano ofrecen las ventajas de la emisión de longitud de onda larga que reduce la atenuación de fotones

25 en los tejidos vivos, lo que permite una mayor profundidad de detección y una sensibilidad incrementada, así como una seguridad y rentabilidad mejoradas. Otra ventaja de la obtención de imágenes fluorescentes es que las proteínas o los péptidos a los que se unen las sondas fluorescentes pueden diseñarse y dirigirse para proporcionar una imagen molecular en lugar de una imagen anatómica o morfológica, como ocurre con otros métodos de

30 formación de imágenes. Por ejemplo, el trastuzumab (Herceptin®) marcado con moléculas colorantes en el IR cercano, se ha utilizado para detectar los niveles de sobreexpresión de EGFR2 en el cáncer de mama. Los armazones de PTX-2 pueden incluir una o más sondas fotoactivables o sondas fluorescentes tipo interruptor que son sensibles a eventos bioquímicos específicos, tales como una actividad enzimática. Usos similares a los descritos

35 anteriormente en los ejemplos pueden ser proteínas de armazón de PTX-2 de este tipo, además de formación de imágenes para detectar directamente la distribución o ubicación específica de una proteína.

Ciertas características estructurales de PTX-2 tales como, por ejemplo, la unión a FcγR o la unión a ligandos dependiente de Ca²⁺ puede eliminarse de los protómeros de PTX-2 utilizados en la preparación de agentes de diagnóstico para eliminar la unión a elementos fuera de la diana deseada y/o para reducir las interacciones no

40 específicas que podrían contaminar los resultados de los ensayos de diagnóstico. Se puede usar la mutagénesis para alterar los aminoácidos necesarios para las interacciones asociadas con las características estructurales o se pueden eliminar porciones de la PTX-2 que realizan tales funciones. Los armazones de PTX-2 se pueden usar para suministrar un marcador o sonda a tejidos o células en los que PTX-2 tiene una afinidad natural tal como, por

45 ejemplo, sitios de fibrosis y/o lesión. Los armazones de PTX-2 pueden usarse para dirigirse a otros compañeros de unión conocidos, tales como, fosfatidiletanolamina, que se expone en la superficie de las células apoptóticas y en los desechos celulares. Los agentes de diagnóstico de armazón de PTX-2 pueden ser útiles para controlar la apoptosis en otras enfermedades o tratamientos, tales como en cáncer o aterosclerosis.

Las proteínas del armazón de PTX-2 pueden usarse con otras tecnologías de formación de imágenes. Por ejemplo, los armazones de PTX-2 se pueden usar para desarrollar agentes de diagnóstico para MRI combinando el armazón

50 de PTX-2 con agentes paramagnéticos de formación de imágenes. Tales agentes paramagnéticos de formación de imágenes son conocidos en la técnica. Se pueden preparar armazones de PTX-2 similares a los de las células diana involucradas en la enfermedad o los tejidos enfermos, utilizando tales técnicas y pueden proporcionar agentes de diagnóstico por imagen útiles que pueden proporcionar información morfológica y bioquímica, y pueden usarse los

55 armazones de PTX-2 que presentan restos de direccionamiento específicos y agentes de formación de imágenes de MRI para dirigir y controlar receptores u otros marcadores bioquímicos de enfermedad o recuperación. El direccionamiento inherente de PTX-2 a ciertos sitios de lesión y reparación o ciertos tipos de células también se puede utilizar para dirigir a un agente de diagnóstico por imagen de este tipo.

Se describen composiciones farmacéuticas que incluyen al menos uno o más pentámeros de PTX-2 funcionalizados, tales como los descritos anteriormente, y uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables. Por lo

60 tanto, en algunos casos, la composición farmacéutica puede ser una composición terapéutica o profiláctica que incluye armazones de PTX-2 que tienen anticuerpos o fragmentos de anticuerpos unidos que son útiles en el tratamiento o prevención de la enfermedad. En otros casos, los armazones de PTX-2 de la composición farmacéutica pueden tener anticuerpos o fragmentos de anticuerpos, sondas o marcadores y pueden usarse como

65 un agente farmacéutico de diagnóstico. Las formulaciones farmacéuticas y las composiciones farmacéuticas son bien conocidas en la técnica, y se pueden encontrar, por ejemplo, en Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack

Publishing Co., Easton, Pa., EE. UU., que se incorpora por referencia, en su totalidad, en el presente documento.

Los excipientes farmacéuticos son bien conocidos en la técnica e incluyen, pero sin limitación, sacáridos tales como, por ejemplo, lactosa o sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol, preparaciones de celulosa, fosfatos de calcio tales como fosfato tricálcico o hidrogenofosfato de calcio, así como aglutinantes, tales como, pasta de almidón tal como, por ejemplo, almidón de maíz, almidón de trigo, almidón de arroz, almidón de patata, gelatina, tragacanto, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, carboximetilcelulosa de sodio, polivinilpirrolidona y combinaciones de los mismos.

Las formulaciones farmacéuticas pueden incluir cualquiera de los pentámeros de PTX-2 funcionalizados descritos e incorporados anteriormente, un portador o excipiente farmacéuticamente aceptable, y cualquier número de componentes adicionales o auxiliares conocidos en las técnicas farmacéuticas, tales como, por ejemplo, aglutinantes, cargas, agentes disgregantes, edulcorantes, agentes humectantes, colorantes, agentes de liberación sostenida, y similares, y la composición farmacéutica pueden incluir uno o más agentes activos secundarios. Agentes disgregantes, tales como almidones como se describe anteriormente, carboximetil almidón, polivinilpirrolidona entrecruzada, agar, ácido alginico o una sal del mismo, tales como alginato de sodio y combinaciones de los mismos. Los agentes auxiliares pueden incluir, por ejemplo, agentes reguladores del flujo y lubricantes, tales como sílice, talco, ácido esteárico o sales del mismo, tales como estearato de magnesio o estearato de calcio, polietilenglicol y combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, los núcleos de grageas pueden prepararse con recubrimientos adecuados que sean resistentes a los jugos gástricos, tal como soluciones de sacáridos concentrados, que pueden contener, por ejemplo, goma arábiga, talco, polivinilpirrolidona, polietilenglicol, dióxido de titanio, soluciones de laca y disolventes orgánicos adecuados o mezclas de disolventes y combinaciones de los mismos. Con el fin de producir recubrimientos resistentes a los jugos gástricos, también se pueden usar soluciones de preparaciones de celulosa adecuadas, tales como ftalato de acetocelulosa o ftalato de hidroxipropilmetilcelulosa. En otras realizaciones más, se pueden añadir colorantes o pigmentos a los comprimidos o recubrimientos de las grageas, por ejemplo, para su identificación o para caracterizar combinaciones de dosis de compuestos activos. El portador o excipiente puede no ser dimetilsulfóxido (DMSO). En determinadas realizaciones, un portador o excipiente usado en formulaciones puede ser etanol a una concentración mayor que pero no igual a 2,5%, tal como mayor que 5 %, mayor que 7,5%, o mayor que 10%, y un portador o excipiente usado en formulaciones puede ser etanol en una concentración menor que, pero no igual a 2,5%.

Los pentámeros de PTX-2 funcionalizados incorporados anteriormente pueden formularse para administración tópica tal como, por ejemplo, como loción. En dichas realizaciones, la formulación tópica puede ser una emulsión de aceite en agua que se puede preparar con una base de agua o alcohol, y en algunas realizaciones, la concentración de agua o alcohol en la formulación tópica puede ser suficientemente alta para facilitar el secado de los componentes de la formulación después de la aplicación a la piel del sujeto. Dichas formulaciones tópicas pueden incluir cualquier componente conocido en la técnica que sea útil para la preparación de una formulación tópica incluyendo, pero sin limitación, solubilizantes, tensioactivos, co-tensioactivos y combinaciones de los mismos. Tales formulaciones tópicas pueden incluir solubilizantes tales como, por ejemplo, Caperol™ 90, Caperol™ Pgmc, Labrafil® M 1944 CS, Labrafil® M 2125 CS, Labrasol®, Labrafac™, Lipophile W1 1349, Labrafac™ PG, Lauroglycol™ 90, Lauroglycol™ FCC, Plurol® Oleique CC 497, Transcutol® P y similares y combinaciones de los mismos, tensioactivos tales como, por ejemplo, Labrasol®, Plurol® Diisostearique y similares y combinaciones de los mismos, co-tensioactivos, tales como, por ejemplo, Caperol™ 90, Lauroglycol™ 90 y similares y combinaciones de los mismos. Cualquiera de los solubilizantes, tensioactivos y co-tensioactivos enumerados se pueden usar en formulaciones tópicas separadas o se pueden combinar en una única formulación tópica.

Una formulación tópica o de depósito puede prepararse proporcionando calcio a una preparación de protómeros de PTX-2 funcionalizados en una solución. En dichas realizaciones, la PTX-2 funcionalizada puede formar una suspensión coloidal que puede usarse para producir una formulación tópica. La cantidad de calcio añadido a la preparación de PTX-2 funcionalizada puede variar entre las realizaciones y puede ser cualquier cantidad de calcio necesaria para hacer que se forme el coloide. Sin embargo, en la preparación de PTX-2, la cantidad de calcio puede ser aproximadamente de igual o más molaridad que los sitios de unión a Ca^{2+} . El efecto del calcio en la preparación de PTX-2 puede revertirse eliminando el calcio de la suspensión coloidal, por ejemplo, proporcionando un agente quelante que sea capaz o eliminando el calcio de la suspensión. Sin pretender quedar ligados a teoría alguna, este efecto coloide puede ser útil en la preparación de formulaciones tópicas y formulaciones tópicas de liberación prolongada, así como en suspensiones coloidales y suspensiones coloidales de liberación prolongada para, por ejemplo, para inyección de depósitos.

Debido a que hay un total de 10 sitios de unión a calcio/pentámero de PTX-2 para formar una suspensión coloidal de todos los PTX-2 disponibles en solución, la cantidad de calcio debe ser aproximadamente equimolar al número de sitios de unión a calcio en la solución de PTX-2. Después de adición de calcio, la suspensión de PTX-2-Ca se recuperó por centrifugación en un sedimento. Como se muestra en la FIG. 5, <1% de PTX-2 permanece en solución cuando la concentración de calcio es aproximadamente igual a o mayor que la concentración de los sitios de unión a calcio en PTX-2 después de la centrifugación. La suspensión dependiente de calcio también se revierte fácilmente mediante la adición de un exceso molar de quelantes, tales como, EDTA o citrato, y la solución de PTX-2 soluble resultante recuperada de la suspensión coloidal no parece contener ningún aumento en el contenido de agregados

con respecto a la solución inicial de PTX-2 basándose en datos de SEC.

También se describen métodos para preparar una formulación tópica y las formulaciones tópicas preparadas por tales métodos. Por ejemplo, en algunas realizaciones, se puede preparar una formulación tópica combinando cualquiera de los compuestos descritos anteriormente con un solubilizante y proporcionando el solubilizante a la mayor concentración posible para proporcionar una solución. El método puede incluir además la identificación de solubilizantes que tienen las mejores propiedades de solubilización, tales como, la MSA más alta y el uso de estos solubilizantes en etapas adicionales. Tales métodos pueden incluir además la incorporación de un tensioactivo, o emulsionante, en la solución, y en algunas realizaciones, el tensioactivo puede tener un número bajo de balance hidrófilo-lipofílico (HLB). La solución solubilizada se puede añadir al tensioactivo muy lentamente, y en ciertas realizaciones, la concentración final del solubilizante puede ser de aproximadamente el 60% a aproximadamente el 80% de la solución final. Puede incorporarse un alcohol en la formulación tópica y puede proporcionar tiempos de secado mejorados y puede ayudar a preservar el compuesto o la composición. El método puede incluir la adición de un estabilizante para producir una microemulsión.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación se pueden administrar a cualquier animal y, en particular, a cualquier mamífero, que puede experimentar un efecto beneficioso como resultado de la administración de un compuesto de la divulgación incluyendo, pero sin limitación: seres humanos, caninos, felinos, ganado, caballos, vacas, ovejas y similares. La dosis o cantidad proporcionada de al menos un compuesto de acuerdo con la divulgación en las composiciones farmacéuticas de las realizaciones puede variar y puede depender, por ejemplo, del uso de la composición farmacéutica, el modo de administración o liberación de la composición farmacéutica, la indicación de la enfermedad que se está tratando, la edad, la salud, el peso, etc. del beneficiario, tratamiento concurrente, si lo hubiera, la frecuencia del tratamiento y la naturaleza del efecto deseado y así sucesivamente. Se describen composiciones farmacéuticas que incluyen uno o más compuestos de la divulgación en una cantidad suficiente para tratar o prevenir enfermedades tales como, por ejemplo, cáncer. Una cantidad eficaz de uno o más compuestos puede variar y puede ser, por ejemplo, de aproximadamente 0,001 mg a aproximadamente 1000 mg o, en otras realizaciones, de aproximadamente 0,01 mg a aproximadamente 100 mg.

Las composiciones farmacéuticas de la divulgación pueden administrarse por cualquier medio que logre el fin que se pretende. Por ejemplo, las vías de administración abarcadas por la divulgación incluyen, pero sin limitación: subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, bucal, subconjuntival, intravital o se contemplan otras vías, rectal, parenteral, intrasistémica, intravaginal, tópica (mediante polvos, pomadas, gotas o parches transdérmicos), inhalada (nebulizador o polvo seco), pulverización oral o nasal en combinación con las composiciones descritas anteriormente.

Las formulaciones para administración parenteral pueden incluir uno o más compuestos de la divulgación en forma soluble en agua, por ejemplo, sales solubles en agua, soluciones alcalinas y complejos de inclusión de ciclodextrina en un diluyente fisiológicamente aceptable que puede administrarse por inyección. Diluyentes fisiológicamente aceptables de tales realizaciones, pueden incluir, por ejemplo, líquidos estériles tales como agua, solución salina, dextrosa acuosa, otras soluciones de azúcares farmacéuticamente aceptables; alcoholes tales como etanol, isopropanol o alcohol hexadecílico; glicoles, tales como propilenglicol o polietilenglicol; cetales de glicerol tal como 2,2-dimetil-1,3-dioxolano-4-metanol; éteres tales como poli(etilenglicol)400; aceites farmacéuticamente aceptables tales como ácido graso, éster de ácido graso o glicérido, o un glicérido de ácido graso acetilado. Las formulaciones adecuadas para administración parenteral pueden incluir adicionalmente uno o más tensioactivos farmacéuticamente aceptables, tales como un jabón o detergente; agente de suspensión tal como pectina, carbómeros, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa o carboximetilcelulosa; un agente emulsionante; adyuvantes farmacéuticamente aceptables o combinaciones de los mismos. Los aceites adicionales farmacéuticamente aceptables que pueden ser útiles en tales formulaciones incluyen los de petróleo, de origen animal, vegetal o sintético incluyendo, pero sin limitación: aceite de cacahuete, aceite de soja, aceite de sésamo, aceite de semilla de algodón, aceite de oliva, aceite de girasol, vaselina y aceite mineral; ácidos grasos tales como ácido oleico, ácido esteárico y ácido isoesteárico; y ésteres de ácidos grasos tales como etil oleato e isopropil miristato. Los detergentes adecuados adicionales incluyen, por ejemplo, sales de metales alcalinos de ácidos grasos, amonio y trietanolamina; detergentes catiónicos tales como haluros de dimetil dialquil amonio, haluros de alquil piridinio y acetatos de alquilamina; y detergentes aniónicos, tales como sulfonatos de alquilo, arilo y olefina, sulfatos de alquilo, olefina, éter y monoglicéridos, y sulfosuccinatos. Pueden ser útiles en formulaciones parenterales de la divulgación, detergentes no iónicos incluyendo, pero sin limitación: óxidos de aminas grasas, alcanolamidas de ácidos grasos y copolímeros de polioxietileno-polipropileno o detergentes anfóteros tales como alquil- β -aminopropionatos y sales cuaternarias de 2-alquilimidazolina, y mezclas de los mismos.

También se pueden añadir tampones, conservantes, tensioactivos, etc. a las formulaciones adecuadas para la administración parenteral. Por ejemplo, los tensioactivos adecuados pueden incluir ésteres de ácidos grasos de polietileno sorbitán, tales como monooleato de sorbitán, y los aductos de alto peso molecular de óxido de etileno con una base hidrófoba, formados por la condensación de óxido de propileno con propilenglicol.

Las composiciones farmacéuticas para administración parenteral pueden contener de aproximadamente un 0,5 a aproximadamente un 25% en peso de uno o más de los pentámeros de PTX-2 funcionalizados y de

aproximadamente un 0,05% a aproximadamente un 5% de agente de suspensión en un medio isotónico. La solución inyectable debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que se pueda cargar fácilmente en una jeringa. Además, las composiciones farmacéuticas inyectables pueden ser estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento y, por lo tanto, pueden conservarse frente a la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos.

La administración tópica incluye la administración a la piel o mucosa, incluidas las superficies del pulmón y el ojo. Las composiciones para administración tópica, puede prepararse como un polvo seco que puede ser presurizado o no presurizado. En composiciones en polvo no presurizadas, los principios activos en mezcla se preparan como un polvo finamente dividido. Al menos el 95% en peso de las partículas de la mezcla puede tener un tamaño de partícula eficaz en el intervalo de 0,01 a 10 micrómetros. El polvo de mezcla finamente dividido se puede mezclar adicionalmente con un portador inerte tal como un azúcar que tiene un tamaño de partícula más grande, por ejemplo, de hasta 100 micrómetros de diámetro. Como alternativa, la composición puede presurizarse utilizando un gas comprimido, tal como nitrógeno o un propulsor de gas licuado. Cuando se usa un medio propulsor licuado, el propulsor puede elegirse de tal manera que el compuesto y/o una mezcla que incluya el compuesto no se disuelva en el propulsor en una medida sustancial. Una forma presurizada de la composición también puede contener un agente tensioactivo. El agente tensioactivo puede ser un agente tensioactivo no iónico líquido o sólido o puede ser un agente tensioactivo aniónico sólido, que puede estar en forma de una sal de sodio.

Las composiciones para administración rectal o vaginal pueden prepararse mezclando los compuestos o composiciones de la divulgación con excipientes o portadores adecuados no irritantes tales como, por ejemplo, manteca de cacao, polietilenglicol o una cera de supositorio. Dichos portadores pueden ser sólidos a temperatura ambiente pero líquidos a temperatura corporal y, por lo tanto, se funden en el recto o la cavidad vaginal y liberan los medicamentos.

Los compuestos o composiciones de la divulgación se pueden administrar en forma de liposomas. Los liposomas generalmente derivan de fosfolípidos u otras sustancias lipídicas que forman cristales líquidos hidratados mono o multilamelares cuando se dispersan en un medio acuoso. Se puede usar cualquier lípido no tóxico, fisiológicamente aceptable y metabolizable capaz de formar liposomas, y en realizaciones particulares, los lípidos utilizados pueden ser fosfolípidos y fosfatidilcolinas (lecitinas) naturales y/o sintéticos. Los métodos para formar liposomas son conocidos en la técnica (véase, por ejemplo, Prescott, Ed., Meth. Cell Biol. 14:33 (1976), que se incorpora por referencia, en su totalidad, en el presente documento). Las composiciones que incluyen uno o más compuestos de la divulgación en forma de liposoma pueden contener, por ejemplo, estabilizantes, conservantes, excipientes y similares.

Uno o más compuestos de la divulgación pueden formularse para uso *in vitro*. La composición de la divulgación puede incluir uno o más compuestos presentados en el presente documento anteriormente en un portador que es adecuado para un ensayo. Dichos portadores pueden estar en forma sólida, líquida o de gel y pueden o no ser estériles. Los ejemplos de portadores adecuados incluyen, pero sin limitación, dimetilsulfóxido, etanol, diclorometano, metanol y similares.

También se describen métodos para utilizar la composición farmacéutica descrita anteriormente. Se describe la administración de una cantidad eficaz de una o más proteínas de fusión de PTX-2 que tienen uno o más protómeros que tienen un anticuerpo o fragmento de anticuerpo unido. Los anticuerpos o fragmentos de anticuerpos pueden fusionarse al extremo C-terminal o N-terminal o insertarse internamente en la secuencia primaria del protómero de PTX-2, o unirse de otro modo al protómero de PTX-2. La proteína de fusión de PTX-2 puede incluir dos o más anticuerpos o fragmentos de anticuerpos.

El estado de enfermedad tratado usando tales métodos puede variar y puede variar dependiendo del anticuerpo o fragmento de anticuerpo o la combinación de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo unidos. Sin embargo, el estado de enfermedad puede ser inflamación o inflamación crónica, tal como la inflamación asociada con artritis o artritis reumatoide, y en tales realizaciones, el tratamiento puede depender, al menos en parte, de la propensión natural de la proteína de fusión de PTX-2 a acumularse en áreas de inflamación.

Ejemplos

Aunque la presente divulgación se ha descrito con bastante detalle con referencia a ciertas realizaciones preferidas de la misma, son posibles otras versiones. Se ilustrarán varios aspectos de la presente divulgación con referencia a los siguientes ejemplos no limitantes.

Ejemplo 1

Preparación de la proteína de fusión anti-TNF α

Se diseñó un vector de expresión para codificar una proteína de fusión que incluye un fragmento de anticuerpo anti-TNF α (VHH3), un enlazador y una secuencia primaria de PTX-2. Se esperaba que la proteína de fusión (anti-TNF α -

VHH3-PTX-2) producida a partir de este vector de expresión fuera de 364 aa con un peso molecular: 40451,5 (aglicosilado) y se esperaba que incluyera un fragmento de anticuerpo anti-TNF α N-terminal que se uniera al protómero de PTX-2 a través de un enlazador. Este vector de expresión se transformó en una línea celular basada en la tecnología GPEX® (Catalent Middleton, Middleton, WI).

La proteína de fusión se produjo en un matraz de agitación de lote alimentado de 1 litro y se aclaró por centrifugación seguida de una filtración de 0,2 μ m. El filtrado se cargó, a continuación, en resina de afinidad de fosfoetanolamina (PE) equilibrada en HEPES 50 mM/NaCl 100 mM/CaCl₂ 1 mM, pH 8,0 para capturar la proteína de fusión y la columna se lavó con un tampón de equilibrado. La proteína de fusión se eluyó con HEPES 50 mM/NaCl 100 mM/EDTA 5 mM, pH 8,0 seguido de filtración viral a través de un filtro Pall DV50 y, a continuación, filtración de 0,2 μ m.

La proteína de fusión eluida se purificó adicionalmente sobre una columna de intercambio aniónico Source 30Q (S30Q). La columna se equilibró en HEPES 50 mM/NaCl 10 mM, pH 8,0, y la proteína eluida se diluyó 3 veces en tampón de equilibrado antes de cargarla en la columna. A continuación, la proteína de fusión se eluyó con un gradiente de 20-VC a NaCl 250 mM en HEPES 50 mM, pH 8,0. Las fracciones del pico de elución se agruparon y se concentraron hasta 5 mg/ml utilizando un concentrador de centrifugación Millipore de 10 kDa. Las muestras de la proteína de fusión de 5 mg/ml se analizaron mediante bioensayo *in vitro* y análisis farmacocinéticos (PK) (inyección iv) en ratas, así como SDS-PAGE y análisis SE-HPLC.

El análisis SE-HPLC se realizó en todas las muestras utilizando un sistema Agilent 1200 a concentraciones que oscilan entre 0,5 y 115 mg/ml para evaluar el contenido de agregados. La proteína de fusión purificada se sometió a 5 ciclos de congelación/descongelación (-20 a +20 °C) y se cargó aproximadamente 10 μ g de una muestra después de cada ciclo en una columna de exclusión por tamaño Tosoh 3000 SW XL con una temperatura de columna de 25 °C. Se ejecutó la fase móvil de Tris 50 mM/Fosfato de sodio 50 mM/cloruro de sodio 0,25 M, pH 7,5 a un caudal de 1,0 ml/min. La detección de la proteína de fusión se realizó a 280 nm. El cromatograma resultante de estos experimentos se muestra en la FIG. 6 como una superposición de la proteína de fusión purificada antes y después de cada uno de los 5 ciclos de congelación/descongelación, y se proporciona el porcentaje de pentámero determinado para cada traza de HPLC en la Tabla 1 a continuación. Estos datos indicaron que poco o nada de la PTX-2 pentamérica se disocia o agrega durante los ciclos de congelación y descongelación y demuestra la estabilidad de la proteína de fusión para el ciclado de congelación/descongelación.

Tabla 1

Ciclo	% de pentámero
0	93,5 %
1	93,6 %
2	94,2 %
3	93,4 %
4	93,3 %
5	93,2 %

Como en el análisis SE-HPLC descrito anteriormente, la proteína de fusión anti-TNF α -VHH3-PTX-2 purificada se sometió a 5 ciclos de congelación/descongelación (-20 a +20 °C) y se cargó aproximadamente 4 μ g de la proteína por carril en un gel de SDS-PAGE con Bis-Tris al 4-12% utilizando un tampón de ejecución MOPS (Invitrogen, Inc.). El gel se ejecutó a 150 V durante 50 minutos y se tiñó usando la tinción SimplyBlue Safe (Invitrogen, Inc.). Un ejemplo del gel resultante se proporciona en la FIG. 7 con carriles designados de la siguiente manera:

Carril	Muestra
1	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 0 F/T, 4 μ g no reducida
2	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 1 F/T, 4 μ g no reducida
3	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 2 F/T, 4 μ g no reducida
4	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 3 F/T, 4 μ g no reducida
5	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 4 F /T, 4 μ g no reducida
6	anti-TNF α -VHH3-PTX-2 5 F/T, 4 μ g no reducida
7	SeeBlue+2 MWM
8	hPTX-2 patrón, 2,5 μ g reducida

Estos datos muestran una proteína de fusión que tiene el peso molecular esperado (42 kDa). Adicionalmente, la integridad de la banda de 42 kDa y la ausencia de productos de degradación visibles indican que se produce poca o ninguna degradación de la proteína de fusión, incluso después de cinco ciclos de congelación/descongelación.

El análisis LC-MS se realizó en todas las muestras para evaluar el contenido de ácido siálico de los glicanos asociados con la proteína de fusión. El análisis de HPLC se realizó en un Waters 2695 conectado a un Waters LCT Premier XE. Se inyectaron aproximadamente 10 μ g de cada muestra de variante en una columna PerSeptive Biosystems Poros R2/10. Se ejecutaron la fase móvil A (ácido fórmico al 0,05% en agua) y la fase móvil B (ácido fórmico al 0,05% en acetonitrilo) a 0,2 ml/min con un gradiente de 30% de B a 70% de B durante 5 minutos. El efluente total se inyectó en el espectrómetro de masas. El espectrómetro de masas se ejecutó con un voltaje de capilaridad de 3000, un voltaje de cono de 50, una temperatura de desolvatación de 250 °C, una temperatura de fuente de 120 °C y un gas de cono y un gas de desolvatación de 50 y 550 l/min, respectivamente. El detector MCP se ajustó a un voltaje de 2000. Los datos se analizaron con Mass Lynx 4.0 utilizando MaxEnt, resta inicial, suavizado y centrado. Se utilizaron todos los parámetros por defecto para cada función. Se proporciona una señal representativa en la FIG. 8. Todas las masas marcadas son variantes de glicofomas esperadas de anti-TNF α -VHH3-PTX-2. Estos datos muestran dos masas de especies principales observadas de 42055 Da y 42347 Da, que corresponden a la masa esperada de la aglico proteína (40452 Da) más la estructura de glicano biantenaria esperada (GlcNAc₂-Man₃-(GlcNAc-Gal)₂) con 0 y 1 ácidos siálicos terminales, respectivamente.

Ejemplo 2

Inhibición de la diferenciación de monocitos

Las células mononucleares de sangre periférica (PBMC) se estimularon con M-CSF (Factor estimulante de colonias de macrófagos) para promover la diferenciación de monocitos a fibrocitos y elevar la producción de quimiocinas derivadas de macrófagos (MDC). Las PBMC se obtuvieron de Biological Specialty Corporation y se colocaron en placas a 50.000 células por pocillo en medios FibroLife suplementados (Life Line Cell Technology). Las células se trataron con 25 ng/ml de M-CSF para estimular la diferenciación de los monocitos en fibrocitos, aumentando así la liberación de MDC. Se diluyó en serie PTX-2 natural (rhPTX-2) y anti-TNF α -VHH3-PTX-2, para lograr concentraciones finales en los pocillos que oscilan entre 30 μ g/ml y 0,0045 μ g/ml. Las células se incubaron durante 96 horas a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se extrajeron de las placas y se analizaron en un ELISA de MDC (R&D Systems), y se midieron los niveles de MDC para determinar si las proteínas inhibían de forma dependiente de la dosis la expresión de MDC. Las placas se leyeron en un lector de placas Tecan Infinite M200 utilizando el software Magellan. El porcentaje de inhibición se calculó y analizó usando el análisis de ajuste logístico de 4 parámetros Prism.

Las curvas de ejemplo que muestran el porcentaje de inhibición de MDC (% de inhibición de MDC) para tanto rhPTX-2 como anti-TNF α -VHH3-PTX-2 se muestran en la FIG. 9. Estos datos demuestran una inhibición similar dependiente de la dosis de la diferenciación de monocitos a fibrocitos y de la producción de MDC, lo que indica que la proteína de fusión retiene la bioactividad de PTX-2.

Ejemplo 3

Inhibición de la actividad de IL-8

Se estimularon células inmortalizadas de monocitos/macrófagos aisladas de sangre periférica humana (células de macrófagos SC) con Phorbol 12-miristato 13-acetato (PMA, Sigma-Aldrich) que aumenta la producción de IL-8. Las células se colocaron en placas a 50.000 células por pocillo en medio de Dulbecco modificado de Iscove que contenía

30 ng/ml de PMA. La rhPTX-2 y el anti-TNF α -VHH3-PTX-2 se diluyeron en serie para lograr concentraciones finales en el pocillo que oscilan desde 60 μ g/ml hasta 0,009 μ g/ml. Las células se incubaron durante 48 horas a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Los sobrenadantes se extrajeron de las placas y se analizaron en un ELISA de IL-8 (R&D Systems) después de esta incubación, y se midieron los niveles de IL-8 para determinar si las proteínas inhibían la expresión de IL-8 de forma dependiente de la dosis. Las placas se leyeron en un lector de placas Tecan Infinite M200 utilizando el software Magellan. El porcentaje de inhibiciones se calculó y analizó mediante el análisis de ajuste logístico de 4 parámetros Prism.

Las curvas que muestran como ejemplo el porcentaje de inhibición de IL-8 (% de inhibición de IL-8) para tanto rhPTX-2 como anti-TNF α -VHH3-PTX-2 se muestran en la FIG. 10. Estos datos muestran que tanto rhPTX-2 como anti-TNF α -VHH3-PTX-2 demuestran inhibición de IL-8 dependiente de la dosis. Además, anti-TNF α -VHH3-PTX-2 parece más potente que el rhPTX-2 en este ensayo, lo que indica una inesperada sinergia entre la bioactividad de PTX-2 y la bioactividad de anti-TNF α cuando ambas actividades están presentes en la misma molécula.

Ejemplo 4

Actividad de Anti-TNF α

Las células L929 se trataron con TNF α citotóxico en presencia de rhPTX-2, Remicade o anti-TNF α -VHH3-PTX-2 para evaluar los efectos protectores de la actividad anti-TNF α de un anticuerpo desnudo anti-TNF α (Remicade®) en comparación con un fragmento similar a un anticuerpo anti-TNF α asociado con PTX-2. rhPTX-2, Remicade y anti-TNF α -VHH3-PTX-2 se diluyeron individualmente en serie en medios de ensayo (MEM de Eagle que contiene FBS al 10% y L-glutamina 2 mM) y se añadieron 25 μ l de TNF α humano (1,5 ng/ml), 25 μ l de actinomicina D (40 μ g/ml) y 50 μ l de células L929 (25.000 células por pocillo) a cada uno de estos pocillos de prueba. Los pocillos de control que contienen 25 μ l de medio de ensayo, 25 μ l de actinomicina D y 50 μ l de células L929 y TNF α humano en concentraciones de 3125 pg/ml, 100 pg/ml, 1 pg/ml, que no contienen TNF α , también estaban presentes en la placa. Las placas se incubaron durante 20 horas a 37 °C, con un 5 % de CO₂. Después de la incubación, se añadieron 30 μ l de reactivo MTS (Promega®) a cada pocillo y las placas se incubaron durante 2 horas adicionales. La absorbancia se leyó a 490 nm y las curvas de viabilidad se calcularon utilizando Excel y análisis sigmoidal de dosis respuesta GraphPad Prism.

Se proporcionan resultados como ejemplo en la FIG. 11. Como se esperaba, rhPTX-2 demuestra ausencia de actividad en este ensayo, y el anti-TNF α -VHH3-PTX-2 demuestra efectos protectores potentes contra la citotoxicidad inducida por TNF α , lo que indica que la proteína de fusión inhibe el TNF α , una actividad que no estaba presente en la PTX-2 natural. Además, estos datos muestran que anti-TNF α -VHH3-PTX-2 proporciona una actividad de inhibición de anti-TNF α mejorada en comparación con Remicade, un estándar de la industria para la inhibición de TNF α basada en anticuerpos.

Ejemplo 5

Farmacocinéticas

Para mostrar la actividad farmacocinética de anti-TNF α -VHH3-PTX-2, rhPTX-2 y anti-TNF α -VHH3-PTX-2 se administraron a ratas por vía intravenosa (iv) a una dosis de 5 mg/kg. Las muestras de plasma se tomaron a varios tiempos y estas muestras se analizaron en un ELISA para PTX-2. Se compraron ratas Sprague Dawley macho (175-200 gramos) de Hilltop Lab Animals (Scottsdale, PA) con catéteres de vena yugular dual implantados quirúrgicamente (JVC). El día de su uso, se pesaron las ratas y se estableció la permeabilidad de los JVC. Las ratas con JVC permeables se dosificaron en el JVC izquierdo con 1,67 ml/kg, para una dosis final de 5 mg/kg de rhPTX-2 y 8,2 mg/kg de anti-TNF α -VHH3-PTX-2 (dando como resultado una dosis de 5 mg/kg de rhPTX-2). Después de la dosificación, el catéter se enjuagó con 0,5 ml de solución salina y, a continuación, se ató.

Se conectó un tramo de tubo de extensión al JVC derecho y se pasó a través de la parte superior de una jaula de cajas de zapatos especialmente diseñada que permitió la recolección de muestras de sangre sin restricciones. Las muestras (0,5 ml) de sangre completa se recogieron en jeringas predosis de 1 cc revestidas con EDTA, 5 min y 1,2, 4, 8 y 24 h después de la dosificación. El catéter de recogida se lavó con aproximadamente 0,4 ml de solución salina heparinizada y la sangre se transfirió a tubos que contenían 25 μ l de EDTA disódico 16 mM. Los tubos se mantuvieron en hielo hasta que se centrifugaron a 15.000 RPM durante 10 minutos a 4 °C. El plasma se recogió y se transfirió a un criotubo y se almacenó a -80 °C hasta su análisis. Después de la recogida de 8 horas, se desconectó el tubo de extensión, se ató el JVC y se devolvió el animal a su jaula de origen. Se recogió una muestra de sangre terminal a las 24 h mediante punción cardíaca tras inhalación de CO₂.

Las concentraciones de rhPTX-2 en plasma se determinaron utilizando un método de inmunoensayo ligado a enzimas (ELISA). En resumen, se recubrieron microplacas de 96 pocillos con un anticuerpo monoclonal de ratón anti-PTX-2 para capturar toda la proteína de fusión o rhPTX-2 en la muestra. Se usó un anticuerpo policlonal de conejo anti-PTX-2 para la detección seguido de un sistema conjugado de peroxidasa de rábano picante anticonejo de cabra. La densidad óptica de cada pocillo se determinó a 450 nm con una corrección a 630 nm. Según fuera

apropiado, se incluyó una curva patrón de rhPTX-2 o anti-TNF α -VHH3-PTX-2 en cada placa con un intervalo de calibración de 0,125 a 20,0 ng/ml, y un límite inferior de cuantificación de 0,25 ng/ml. Si se tiene en cuenta la dilución de muestra mínima requerida de 200 veces, esto se traduce en un LLOQ de 50,0 ng/ml. Todos los resultados de la muestra se interpolaron a partir de la curva patrón y se convirtieron de ng/ml a μ g/ml.

- 5 Se proporciona un gráfico de aclaramiento como ejemplo en la **FIG.12**. Estos datos muestran farmacocinéticas similares entre las dos proteínas. Por lo tanto, anti-TNF α -VHH3-PTX-2 muestra una distribución y aclaramiento similares a las de los fármacos que son casi idénticos a los de la PTX-2 natural.

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión que comprende un pentámero de amiloide sérico P (PTX-2) que tiene al menos un protómero de PTX-2 fusionado con un anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno; en donde el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo se fusiona al extremo N-terminal de al menos un protómero de PTX-2; y en donde la proteína de fusión comprende además un enlazador entre el anticuerpo o el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno y el al menos un protómero de PTX-2.
2. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el pentámero de PTX-2 comprende cinco protómeros fusionados con anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno.
3. La proteína de fusión de la reivindicación 1, en donde el pentámero de PTX-2 comprende uno o más protómeros de PTX-2 no modificados.
4. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en donde el pentámero de PTX-2 comprende uno o más protómeros de PTX-2 que se modifican para eliminar un sitio de unión a ligandos en protómeros de PTX-2 de origen natural, un sitio de unión a Ca^{2+} en protómeros de PTX-2 de origen natural o una combinación de los mismos.
5. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4, en donde el pentámero de PTX-2 comprende uno o más protómeros de PTX-2 que tienen al menos un aminoácido cisteína adicional que no está presente en los protómeros de PTX-2 de origen natural.
6. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en donde al menos un aminoácido cisteína participa en un enlace disulfuro con el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno.
7. La proteína de fusión de la reivindicación 5, en donde al menos un aminoácido cisteína adicional participa en un enlace disulfuro con otra cisteína del protómero de PTX-2.
8. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un agente terapéutico conocido.
9. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 8, en donde el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno se selecciona de fragmentos variables de cadena sencilla (scFv), proteínas VHH de camélidos o anexinas.
10. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 9, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz (TIMP) o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti factor de necrosis tumoral (TNF).
11. La proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es antiinflamatorio.
12. Una composición farmacéutica que comprende la proteína de fusión de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11 y uno o más portadores o excipientes farmacéuticamente aceptables.
13. Un método para preparar un pentámero de PTX-2 funcionalizado que comprende:
 - introducir un primer plásmido que incluye al menos una secuencia de nucleótidos para un primer protómero de PTX-2 funcionalizado en un sistema de expresión, en donde el primer plásmido al menos comprende una secuencia de nucleótidos que codifica una secuencia de aminoácidos que es al menos 95% idéntica a la SEQ ID NO: 1 y una secuencia de nucleótidos para uno o más primeros anticuerpos o fragmentos de anticuerpos de unión a antígeno, en donde dicho protómero de PTX-2 funcionalizado es una proteína de fusión como se define en una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11;
 - expresar el primer protómero de PTX-2 funcionalizado; y
 - aislar pentámeros de PTX-2 funcionalizados, purificar pentámeros de PTX-2 funcionalizados o combinaciones de los mismos a partir del sistema de expresión.
14. Un pentámero de PTX-2 para su uso en un método para tratar a un paciente que necesita tratamiento, en donde el pentámero de PTX-2 es una proteína de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.
15. El pentámero para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el fragmento de anticuerpo de unión a antígeno es un fragmento variable de cadena sencilla (scFv), proteína VHH de camélidos o anexina.
16. El pentámero para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el anticuerpo o fragmento de anticuerpo

de unión a antígeno es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti inhibidor tisular de metaloproteinasas de matriz (TIMP) o un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo de unión a antígeno anti factor de necrosis tumoral (TNF).

- 5 17. El pentámero para su uso de acuerdo con la reivindicación 14, en donde el pentámero se administra para reducir la inflamación.

18. Un método para preparar un coloide de PTX-2 que comprende:

- 10 aislar pentámeros de PTX-2, purificar pentámeros de PTX-2, o combinaciones de los mismos; y añadir calcio a los pentámeros de PTX-2 aislados y/o purificados, en donde los pentámeros de PTX-2 son proteínas de fusión de acuerdo con una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11.

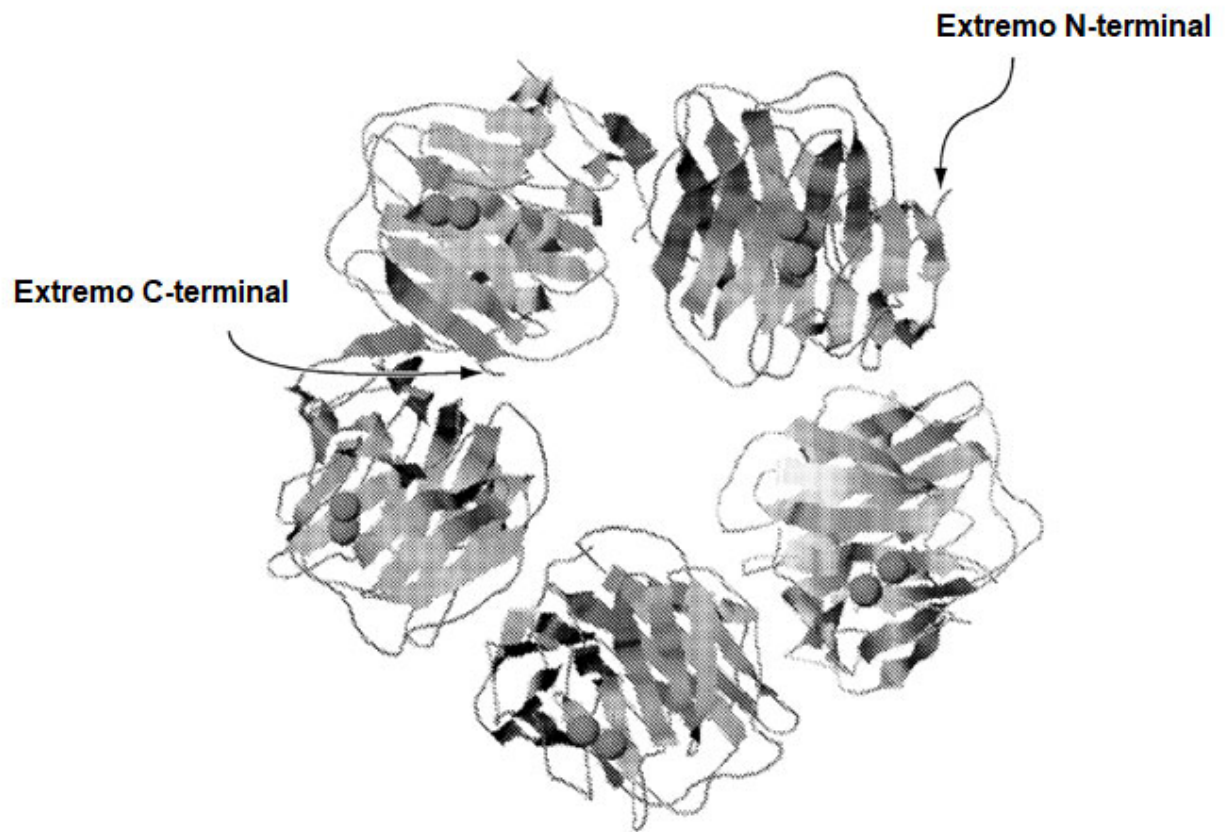
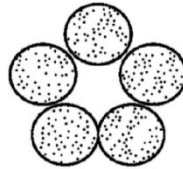


Fig. 1

SAP
(Pentraxina corta)



PTX3
(Pentraxina larga)

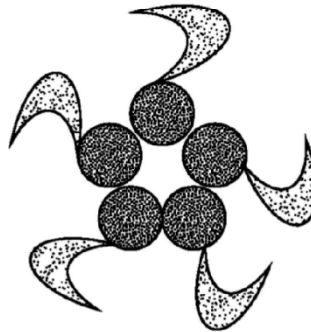


Fig. 2

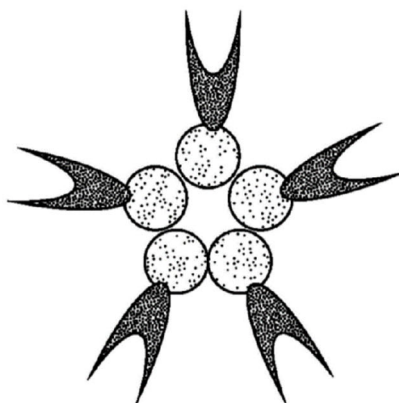
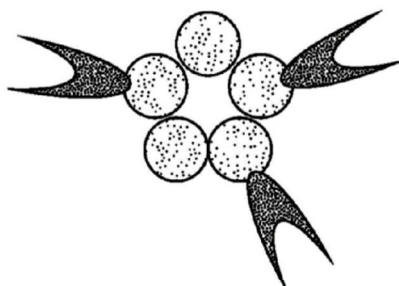


Fig. 3A



scFv

Fig. 3B

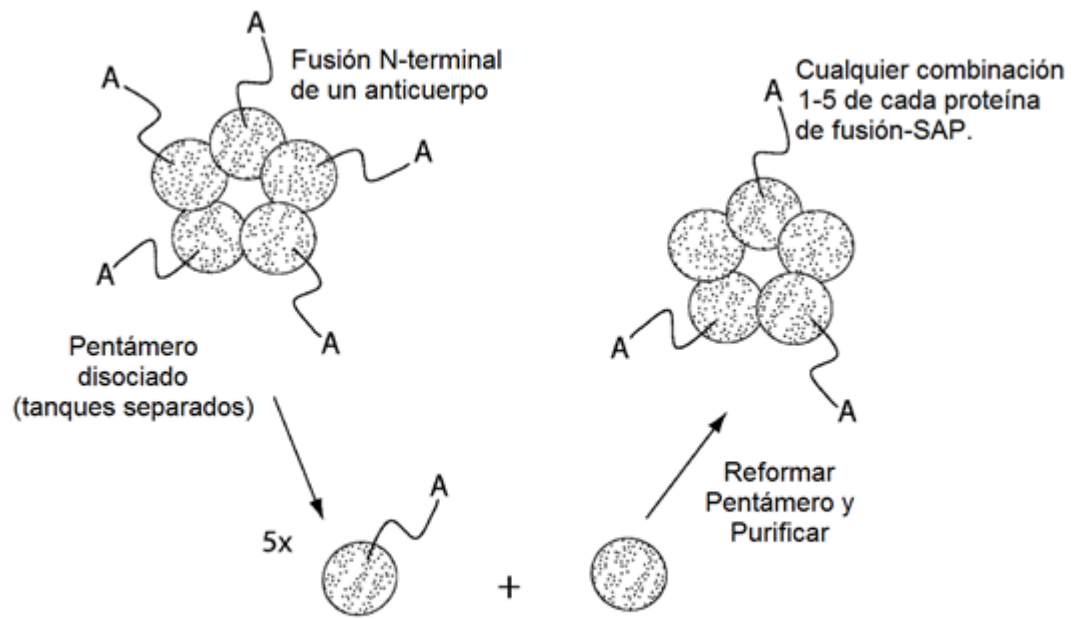


Fig. 4

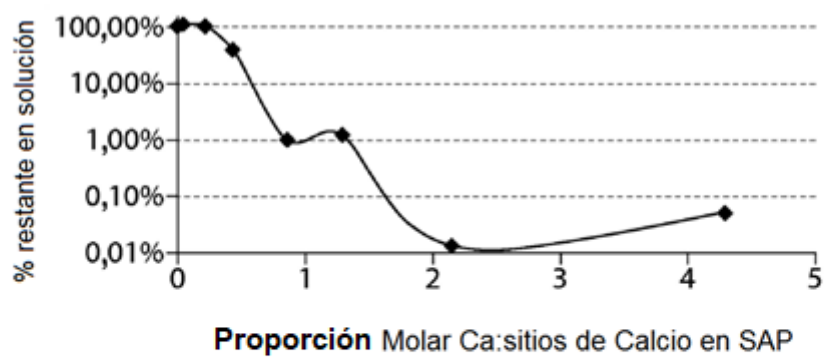


Fig. 5

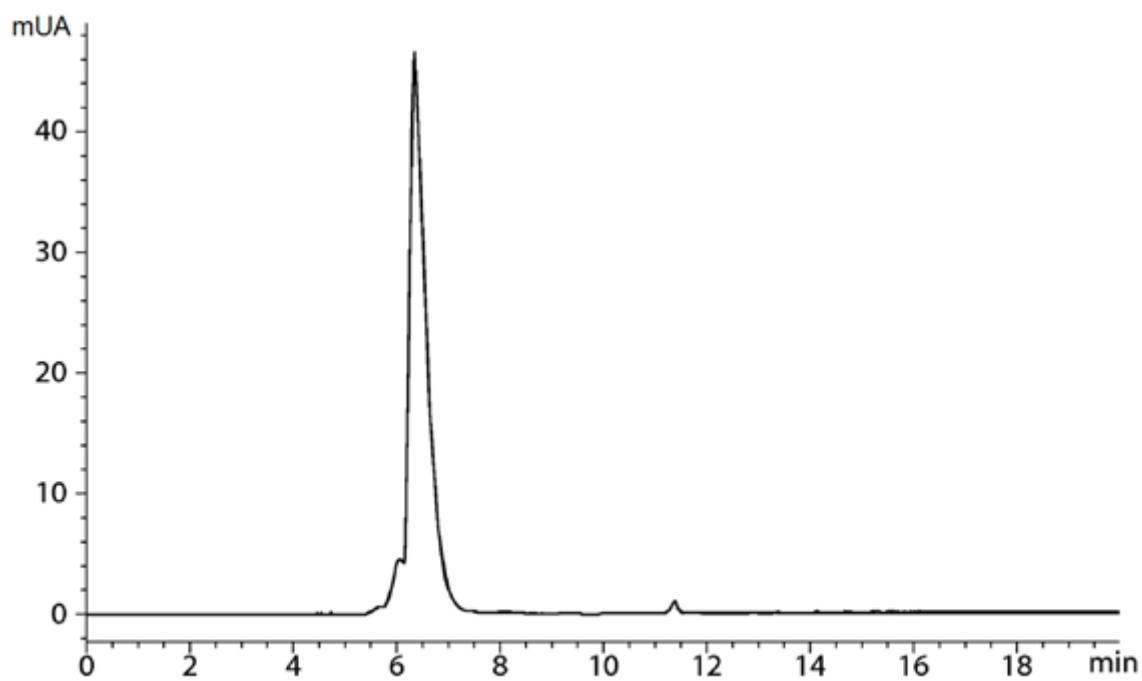


Fig. 6

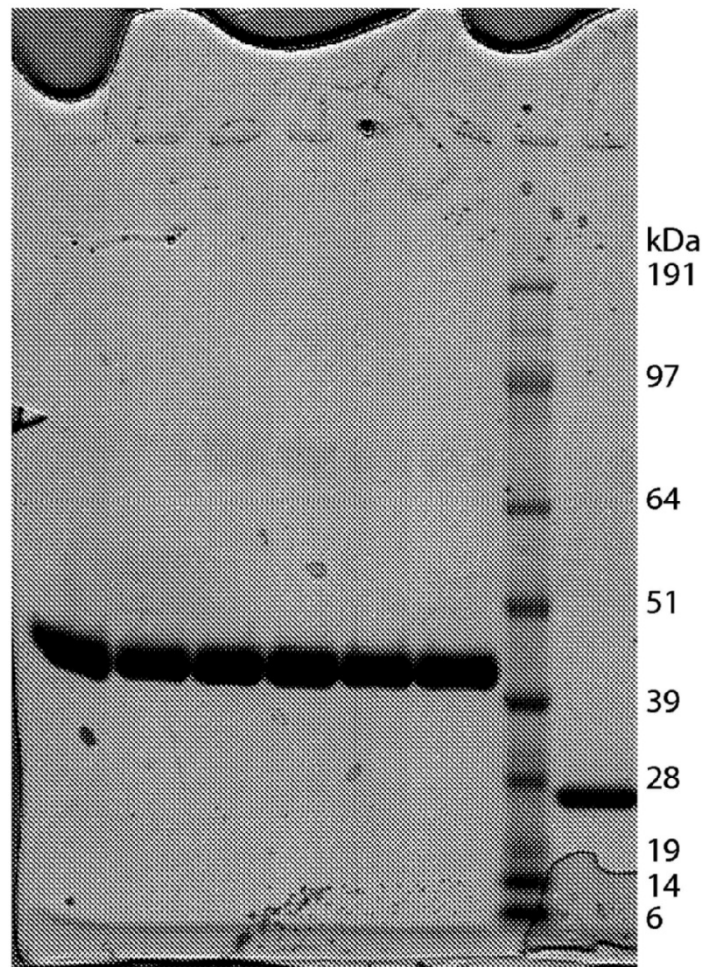


Fig. 7

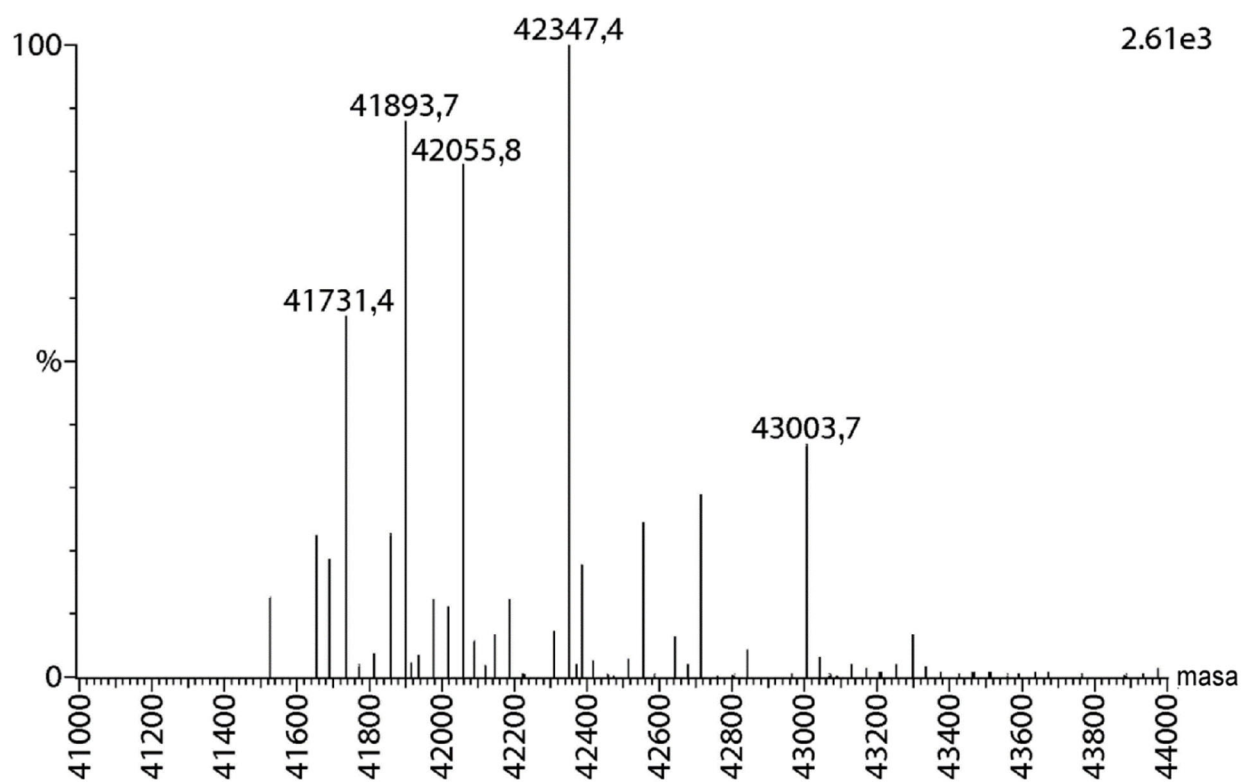


Fig. 8

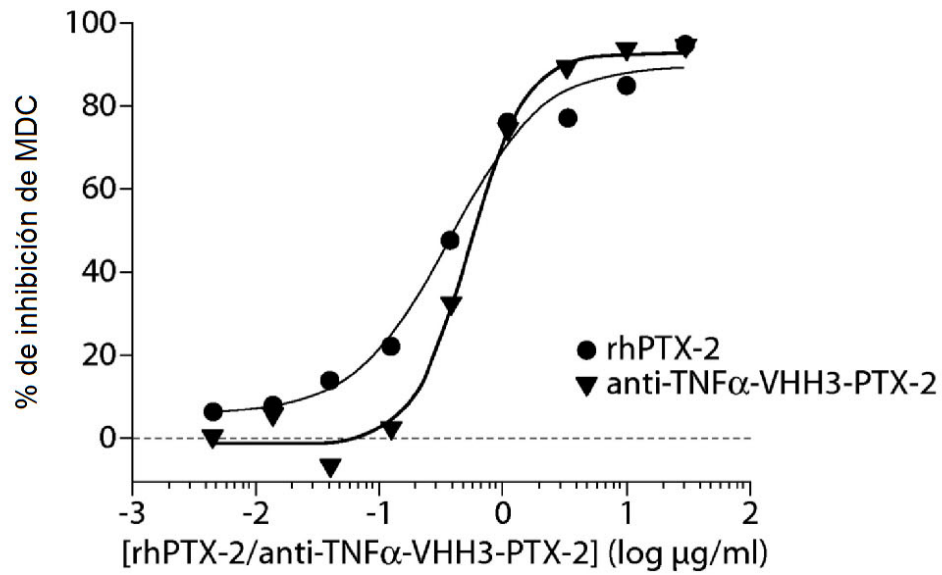


Fig. 9

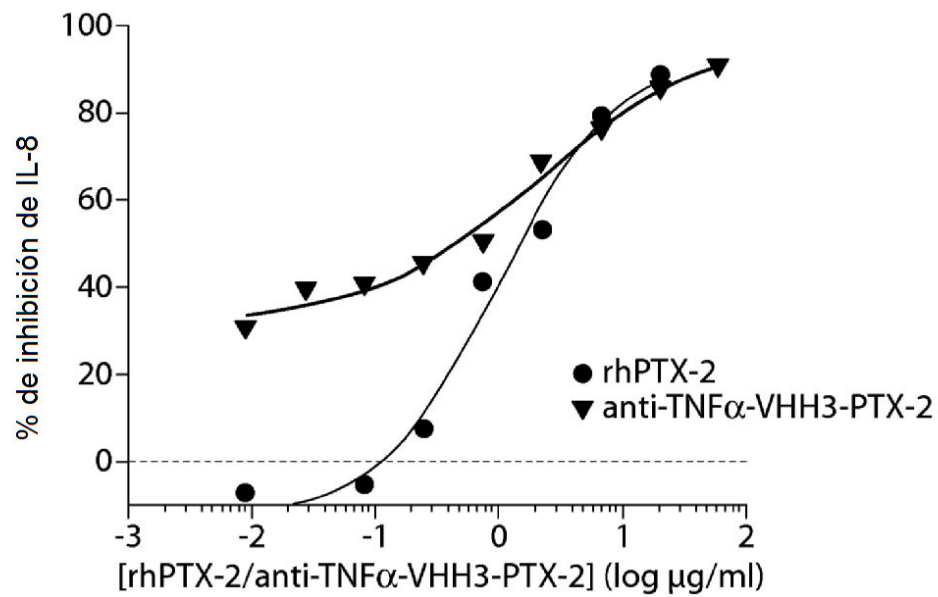


Fig. 10

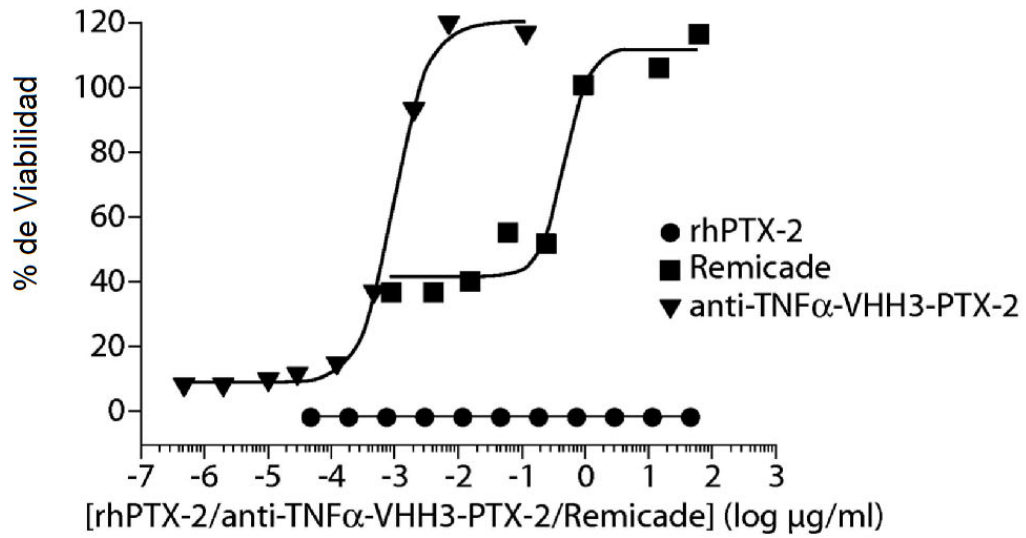


Fig. 11

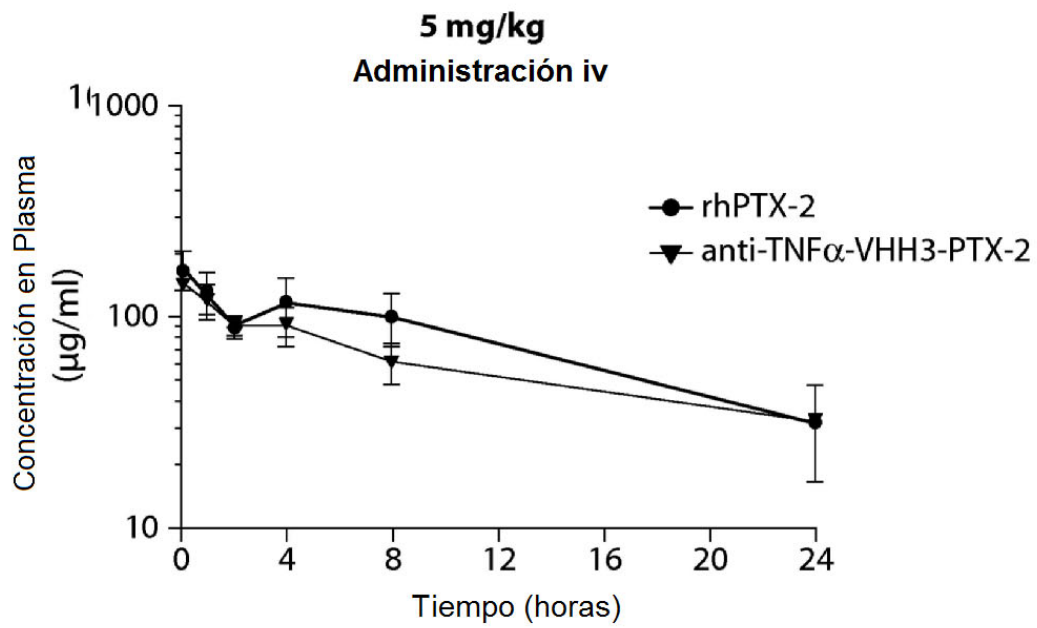


Fig. 12

QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCAASGRTFSDHSGYTYTIGWFRQAPGK
EREFVARIYWSSGNTYYADSVKGRFAISRDIKNTVDLTMNNLEPEDTAV
YYCAARDGIPTSRSVESYNYWGQGTQVTVSSEPKTPKPQPAEAAAKEA
AAKEAAKEAAKAHTDLSGKVFVFPRESVTDHVNLTPLEKPLQNFTLC
FRAYSDLSRAYSLFSYNTQGRDNELLVYKERVGEYSLYIGRHKVTSKVIK
FPAPVHICVSWESSGIAEFWINGTPLVKKGLRQGYFVEAQP KIVLGQEQD
SYGGKFDRSQSFVGEIGDLYMWDSVLPPENILSAYQGTPLPANILDWQALN
YEIRGYVIKPLVWV (SEQ ID NO: 2)

Fig. 13

REFERENCIAS CITADAS EN LA DESCRIPCIÓN

La lista de referencias citadas por el solicitante es para la conveniencia del lector solamente. No forma parte del documento de patente europea. Aunque se ha puesto gran cuidado para la recopilación de las referencias, no se puede excluir la existencia de errores u omisiones y la Oficina de Patentes Europea declina toda responsabilidad al respecto.

Documentos de patente citados en la descripción

- WO 2010148234 A [0005]
- US 20070243163 A [0089]

10

Literatura no patente citada en la descripción

- KATRE et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1987, vol. 84, 1487 [0004]
- THIE H et al. *NEW BIOTECHNOLOGY*, 2009, vol. 26, 314-321 [0005]
- BOWIE et al. *Science*, 1990, vol. 247, 1306-1310 [0057]
- Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Publishing Co. [0101]
- Meth. Cell Biol. 1976, vol. 14, 33 [0115]