

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 746 052**

51 Int. Cl.:

A61K 38/55	(2006.01) A61P 1/00	(2006.01)
C07K 19/00	(2006.01) A61P 3/10	(2006.01)
A61K 39/395	(2006.01) A61P 37/06	(2006.01)
A61P 29/00	(2006.01) A61P 21/00	(2006.01)
A61P 9/00	(2006.01) A61P 31/04	(2006.01)
A61P 11/00	(2006.01) A61P 31/10	(2006.01)
A61P 11/06	(2006.01) A61P 31/12	(2006.01)
A61P 35/00	(2006.01) A61K 39/40	(2006.01)
A61P 9/10	(2006.01) A61K 39/42	(2006.01)
A61P 19/02	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

- 86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **28.06.2012 PCT/US2012/044730**
- 87 Fecha y número de publicación internacional: **03.01.2013 WO13003641**
- 96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **28.06.2012 E 12804863 (4)**
- 97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **19.06.2019 EP 2726092**

54 Título: **Polipéptidos de fusión de serpina y métodos de uso de los mismos**

30 Prioridad:

28.06.2011 US 201161502055 P
14.12.2011 US 201161570394 P
19.12.2011 US 201161577204 P
25.04.2012 US 201261638168 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
04.03.2020

73 Titular/es:

INHIBRX, LP (100.0%)
11099 N. Torrey Pines Road, Suite 130
La Jolla, CA 92037, US

72 Inventor/es:

ECKELMAN, BRENDAN, P.;
TIMMER, JOHN, C.;
NGUY, PETER, L.;
GUENTHER, GRANT, B. y
DEVERAUX, QUINN

74 Agente/Representante:

SÁEZ MAESO, Ana

ES 2 746 052 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

Polipéptidos de fusión de serpina y métodos de uso de los mismos

5 Campo de la invención

Esta invención se refiere a moléculas, particularmente polipéptidos, más particularmente proteínas de fusión que incluyen un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de serpina y un segundo polipéptido. Adicionalmente, la invención se refiere a proteínas de fusión que incluyen un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de polipéptidos de serpina, un segundo polipéptido, y un tercer polipéptido. Específicamente, esta invención se refiere a proteínas de fusión que incluyen al menos un polipéptido de serpina y un segundo polipéptido o proteínas de fusión que incluyen al menos un polipéptido de serpina, un segundo polipéptido, y un tercer polipéptido, en el que el segundo y tercer polipéptidos de las proteínas de fusión de la invención pueden ser al menos uno de los siguientes: un polipéptido Fc o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido Fc; un polipéptido dirigido a citoquina o una secuencia derivada de un polipéptido dirigido a citoquina; un polipéptido que contiene dominio WAP o una secuencia derivada de un polipéptido que contiene WAP; o un polipéptido de albúmina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de albúmina en suero. Esta invención también se refiere a métodos para utilizar dichas moléculas en una variedad de indicaciones terapéuticas y de diagnóstico, así como a métodos para producir dichas moléculas.

20 Antecedentes de la invención

La actividad aberrante de la serina proteasa o un desequilibrio del inhibidor de proteasa a proteasa puede conducir a la destrucción de tejido mediada por proteasa y respuestas inflamatorias. De acuerdo con lo anterior, subsiste la necesidad de productos terapéuticos y terapias que se dirijan a la actividad de serina proteasa aberrante y/o al desequilibrio del inhibidor de proteasa a proteasa. Adicionalmente, se pueden obtener efectos terapéuticos mejorados mediante la atenuación de la señalización de citoquinas aberrantes y la actividad de serina proteasa. Además, las proteínas serpinas han demostrado actividades antiinfecciosas, al mismo tiempo se ha mostrado que las citoquinas inflamatorias objetivo aumentan el riesgo de infección. Las proteínas de fusión de esta invención tienen el potencial de amortiguar la actividad inflamatoria de las citoquinas y limitar el riesgo de infección.

Resumen de la invención

La invención se define de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas. Las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de serpina (Polipéptido 1) y un segundo polipéptido (Polipéptido 2). Adicionalmente, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de serpina (Polipéptido 1), un segundo polipéptido (Polipéptido 2), y un tercer polipéptido (Polipéptido 3). Como se utiliza indistintamente en este documento, los términos "proteína de fusión" y "polipéptido de fusión" se refieren a un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de serpina unida de forma operable a al menos un segundo polipéptido o una secuencia de aminoácidos derivada de al menos un segundo polipéptido. Los elementos individualizados de la proteína de fusión se pueden unir en cualquiera de una variedad de formas, que incluyen, por ejemplo, la unión directa, el uso de un péptido intermedio o separador, el uso de una región ligadora, el uso de una región bisagra o el uso de tanto una región ligadora como bisagra. En algunos aspectos, la región ligadora puede caer dentro de la secuencia de la región bisagra, o alternativamente, la región bisagra puede caer dentro de la secuencia de la región ligadora. Preferiblemente, la región ligadora es una secuencia de péptidos. Por ejemplo, el péptido ligador incluye cualquier lugar desde cero hasta 40 aminoácidos, por ejemplo, desde cero hasta 35 aminoácidos, desde cero hasta 30 aminoácidos, desde cero hasta 25 aminoácidos, o desde cero hasta 20 aminoácidos. Preferiblemente, la región bisagra es una secuencia de péptidos. Por ejemplo, el péptido bisagra incluye cualquier lugar desde cero hasta 75 aminoácidos, por ejemplo, desde cero hasta 70 aminoácidos, desde cero hasta 65 aminoácidos o desde cero hasta 62 aminoácidos. En las realizaciones en las que la proteína de fusión incluye tanto una región ligadora como región bisagra, preferiblemente cada una de la región ligadora y la región bisagra es una secuencia de péptidos. En estos aspectos, el péptido bisagra y el péptido ligador juntos incluyen cualquier lugar desde cero hasta 90 aminoácidos, por ejemplo, desde cero hasta 85 aminoácidos o desde cero hasta 82 aminoácidos.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina y el segundo polipéptido se pueden unir a través de una proteína de unión intermedia. En algunos aspectos, la porción basada en serpina y la porción segundo polipéptido de la proteína de fusión se pueden unir de forma no covalente.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión de acuerdo con la divulgación pueden tener una de las siguientes fórmulas, en una dirección N-terminal a C-terminal o una dirección C-terminal a N-terminal:

Polipéptido 1_(a) - bisagra_m - Polipéptido 2_(b)
 Polipéptido 1_(a) - ligador_n - Polipéptido 2_(b)
 Polipéptido 1_(a) - ligador_n - bisagra_m - Polipéptido 2_(b)

Polipéptido 1_(a) - bisagra_m - ligador_n - Polipéptido 2_(b)

Polipéptido 1_(a) - Polipéptido 2_(b)- Polipéptido 3_(c)

Polipéptido 1_(a) - bisagra_m - Polipéptido 2_(b)- bisagra_m - Polipéptido 3_(c)

Polipéptido 1_(a) - ligador_n - Polipéptido 2_(b)- ligador_n - Polipéptido 3_(c)

5 Polipéptido 1_(a) - bisagra_m - ligador_n - Polipéptido 2_(b)-bisagra_m - ligador_n - Polipéptido 3_(c) Polipéptido 1_(a) - ligador_n - bisagra_m - Polipéptido 2_(b)- ligador_n - bisagra_m-Polipéptido 3_(c)

10 en las que n es un entero desde cero hasta 20, en las que m es un entero desde 1 hasta 62 y en las que a, b, y c son enteros de al menos 1. Estas realizaciones incluyen las formulaciones anteriores y cualquier variación o combinación de las mismas. Por ejemplo, el orden de los polipéptidos en las fórmulas también incluye Polipéptido 3_(c) - Polipéptido 1_(a)- Polipéptido 2_(b), Polipéptido 2_(b) - Polipéptido 3_(c)- Polipéptido 1_(a), o cualquier variación o combinación de los mismos.

15 En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos 1 incluye un polipéptido de serpina. Las serpinas son un grupo de proteínas con estructuras similares que se identificaron por primera vez como un conjunto de proteínas capaces de inhibir las proteasas. Las proteínas serpinas adecuadas para uso en las proteínas de fusión proporcionadas en el presente documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, alfa-1 antitripsina (AAT), proteína relacionada con antitripsina (SERPINA2), alfa 1-anticimotripsina (SERPINA3), calistatina (SERPINA4), inhibidor de elastasa de neutrófilos monocitos (SERPINB1), PI-6 (SERPINB6), antitrombina (SERPINC1), inhibidor del activador de plasminógeno 1 (SERPINE1), alfa 2-antiplasmina (SERPINF2), inhibidor del complemento 1 (SERPING1) y neuroserpina (SERPINI1)

20 En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos 1 incluye una secuencia de polipéptidos de alfa-1 antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT. En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos 1 incluye una porción de la proteína AAT. En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos 1 incluye al menos la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunas realizaciones, la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos: GTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNK SEQ ID NO: 1).

30 En un aspecto preferido, la secuencia de polipéptidos de AAT o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT es o se deriva de una secuencia de polipéptidos de AAT humana.

35 En algunas realizaciones, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de AAT humana de longitud completa que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1  EDPQGDAAQK  TDTSHHDQDH  PTFNKITPNL  AEFASFSLYRQ  LAHQSNSTNI  FFSPVSIATA
61  FAMLSTLGTKA  DTHDEILEGL  NFNLTETPEA  QIHEGFQELL  RTLNPQDSQL  QLTTGNGLFL
121  SEGLKLVDFK  LEDVKKLYHS  EAFTVNFQGT  EEAKKQINDY  VEKGTQGKIV  DLVKELDRDT
181  VFALVNYIFF  KGKWERPFEV  KDTEEDFHV  DQVTVKQVPM  MKRLGMFNIQ  HCKKLSWVL
241  LMKYLGNATA  IFFLPDEGKL  QHLENELTHD  IITKFLENED  RRSASLHLPK  LSITGTYDLK
301  SVLGQLGITK  VFSNGADLSG  VTEEAPLKLS  KAVHKAVLTI  DEKGTEAAGA  MFLEAIPMSI
361  PPEVKFNKPF  VFLMIEQNTK  SPLFMGKVVN  PTQK (SEQ ID NO: 2)
    
```

40 En algunos aspectos, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de AAT humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2.

45 En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos de AAT es, o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de AAT se deriva de, una o más de las secuencias de polipéptidos de AAT humanas mostradas en el Acceso GenBank Nos. AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1, y/o AAA51547.1.

50 En algunas realizaciones, las proteínas de fusión contienen una o más mutaciones. Por ejemplo, la proteína de fusión contiene al menos una mutación en un residuo de metionina (Met) en la porción de serpina de la proteína de fusión. En estas mutaciones Met, el residuo Met se puede sustituir con cualquier aminoácido. Por ejemplo, el residuo Met se puede sustituir con un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba, tal como, por ejemplo, leucina (Leu, L). Sin desear estar limitado por la teoría, las mutaciones Met evitan la oxidación y la posterior inactivación de la actividad inhibidora de las proteínas de fusión de la invención. En algunas realizaciones, el residuo Met se puede sustituir con un residuo cargado, tal como, por ejemplo, glutamato (Glu, E). En algunas realizaciones, la mutación Met está en la posición 358 de un polipéptido de AAT. Por ejemplo, la mutación Met es Met358Leu (M358L). En algunas realizaciones, la mutación Met está en la posición 351 de un polipéptido de AAT. Por ejemplo, la mutación Met es Met351Glu (M351E). En algunas realizaciones, la mutación Met está en la posición 351 y en la posición 358 de un polipéptido de AAT, por ejemplo, la mutación Met es Met351Glu (M351E) y Met358Leu (M358L). Por ejemplo, el bucle de sitio reactivo de esta variante del polipéptido de fusión AAT tiene la siguiente secuencia:

GTEAAGAEFLEAIPLS IPPEVKFNK (SEQ ID NO: 32). En algunas realizaciones, la mutación Met está en la posición 351 y en la posición 358 de un polipéptido de AAT, por ejemplo, la mutación Met es Met351Leu (M351L) y Met358Leu (M358L). Por ejemplo, el bucle de sitio reactivo de esta variante del polipéptido de fusión AAT tiene la siguiente secuencia: GTEAAGALFLEAIPLS IPPEVKFNK (SEQ ID NO: 33).

En algunos aspectos, el segundo polipéptido (Polipéptido 2) de la proteína de fusión serpina es un polipéptido Fc o derivado un polipéptido Fc. Estos aspectos se mencionan colectivamente en este documento como "proteínas de fusión serpina-Fc." Las proteínas de fusión serpina-Fc descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina y un polipéptido Fc o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido Fc. En algunos aspectos, la proteína de fusión serpina-Fc incluye un único polipéptido de serpina. En otros aspectos, las proteínas de fusión serpina-Fc incluyen más de un polipéptido de serpina, y estas realizaciones se denominan colectivamente en este documento como "proteína de fusión serpina_(a)-Fc," en la que (a') es un entero de al menos 2. En algunos aspectos, cada uno de los polipéptidos de serpina en una proteína de fusión serpina_(a)-Fc incluye la misma secuencia de aminoácidos. En otros aspectos, cada polipéptido de serpina en una proteína de fusión serpina_(a)-Fc incluye polipéptidos de serpina con distintas secuencias de aminoácidos. Los polipéptidos de serpina de proteínas de fusión serpina_(a)-Fc se pueden ubicar en cualquier posición dentro de la proteína de fusión.

En algunas realizaciones, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-Fc incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunas realizaciones, la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En algunas realizaciones, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-Fc incluye al menos la secuencia de aminoácidos de una variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunas realizaciones, la variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33. En algunas realizaciones, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-Fc incluye al menos la secuencia de polipéptidos de AAT humana de longitud completa que tiene secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-Fc incluye secuencia de polipéptidos de AAT humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 32 o 33.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-Fc incluye la secuencia de polipéptidos de AAT es o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de AAT se deriva de una o más de las secuencias de polipéptidos de AAT humanas mostradas en el Acceso GenBank Nos. AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1, y/o AAA51547.1.

En algunos aspectos, el polipéptido Fc de la proteína de fusión es un polipéptido Fc humano, por ejemplo, una secuencia de polipéptidos IgG Fc humanos o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de polipéptidos IgG Fc humanos. Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc IgG1 humano o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de polipéptidos Fc IgG1 humanos. En algunos aspectos, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc IgG2 humano o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de polipéptidos Fc IgG2 humanos. En algunos aspectos, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc IgG3 o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de polipéptidos Fc IgG3 humanos. En algunas realizaciones, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc IgG4 o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una secuencia de polipéptidos Fc IgG4 humanos. En algunos aspectos, el polipéptido Fc es un polipéptido Fc IgM o una secuencia de aminoácidos que se deriva una secuencia de polipéptidos Fc IgM humanos.

En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG1 humanos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1  APELLGGPSV FLFPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
61  PREEQYNSTY RVVSVLTIVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTIKAK GQPREPQVYT
121 LPPSRDELTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
181 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 3)

```

En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG1 humanos que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3.

En algunas realizaciones en las que la proteína de fusión de la invención incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc se muta o modifica para mejorar unión de FcRn. In estas realizaciones el polipéptido Fc mutado o modificado incluye

las siguientes mutaciones: Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S256T, T256E) o Met428Leu y Asn434Ser (M428L, N434S) utilizando el sistema de numeración Kabat. En algunos aspectos la porción Fc del polipéptido se muta o de otro modo se modifica para que interrumpa la dimerización mediada por Fc. En estos aspectos, la proteína de fusión es monomérica en naturaleza.

5 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG2 humanos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 APPVAGPSVF LFPPKPKDTL MISRTPEVTC VVVDVSHEDP EVQFNWYVDG VEVHNAKTKP
61 REEQFNSTFR VVSVLTVVHQ DWLNGKEYKC KVSNGKLPAP IEKTISKTKG QPREPQVYTL
121 PPSREEMTKN QVSLTCLVKG FYPSDIAVEW ESNQGQPENNY KTTTPMLDSD GSFFFLYSKLT
10 181 VDKSRWQQGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSPGK (SEQ ID NO: 4)
    
```

15 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG2 humanos que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 4.

20 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG3 humanos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVQFKWYVD GVEVHNAKTK
61 PREEQYNSTF RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKTK GQPREPQVYT
121 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESSGQPENN YNTTPMLDS DGSFFFLYSKL
20 181 TVDKSRWQQG NIFSCSVMHE ALHNRFQKS LSLSPGK (SEQ ID NO: 5)
    
```

25 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG3 humanos que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 5.

30 En algunas realizaciones en las que la proteína de fusión de la invención incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG4 humanos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 APEFLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSQED PEVQFNWYVD GVEVHNAKTK
61 PREEQFNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKGLPS SIEKTISKAK GQPREPQVYT
121 LPPSQEEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVEW ESNQGQPENNY KTTTPVLDS GSFFFLYSRLT
30 181 VDKSRWQEGN VFSCSVMHEA LHNHYTQKSL SLSLKG (SEQ ID NO: 6)
    
```

35 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgG4 humanos que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.

40 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos FC IgM humanos que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 IAELPPKVSF FVPPRDGFFG NPRKSKLICQ ATGFSPRQIQ VSWLREGKQV GSGVTTDQVQ
61 AEAKESGPTT YKVTSTLTIK ESDWLQSMF TCRVDHRGLT FQONASSMCV PDQDTAIRVF
121 AIPPSFASIF LTKSTKLTCV VTDLTYDSV TISWTRONGE AVKTHNTISE SHPNATFSAV
40 181 GEASICEDDW NSGERFTCTV THTDLPSPK QTISRPKG (SEQ ID NO: 7)
    
```

45 En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye un polipéptido Fc, el polipéptido Fc de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos Fc IgM humanos que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 7.

50 En algunos aspectos de las proteínas de fusión proporcionadas en este documento, el segundo polipéptido (Polipéptido 2) de la proteína de fusión serpina es un polipéptido dirigido a citoquina o derivado de un polipéptido dirigido a citoquina. Estos aspectos se mencionan colectivamente en este documento como "proteínas de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina". Las proteínas de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina descritas

en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de serpina y un polipéptido dirigido a citoquina, o derivación de los mismos. En algunos aspectos, la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina incluye un único polipéptido de serpina. En otros aspectos, la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina incluye más de un polipéptido de serpina, y estas realizaciones se denominan colectivamente en este documento como “proteínas de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina_(a')”, en las que (a') es un entero de al menos 2. En algunos aspectos, cada polipéptido de serpina en una proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina_(a') incluye la misma secuencia de aminoácidos. En otros aspectos, cada polipéptido de serpina de una proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina_(a) incluye polipéptidos de serpina con distintas secuencias de aminoácidos.

En algunos aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina de la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina es un receptor de citoquina o derivado de un receptor de citoquina. En un aspecto preferido, el polipéptido dirigido a citoquina o una secuencia de aminoácidos que se deriva del receptor de citoquina es o se deriva de una secuencia de receptores de citoquina humanos. En otros aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo anti-citoquina o fragmento de anticuerpo anti-citoquina. En un aspecto preferido, el polipéptido dirigido a citoquina o una secuencia de aminoácidos que se deriva del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se deriva de una secuencia de anticuerpos quiméricos, humanizados, o completamente humanos. El término fragmento de anticuerpo incluye cadena única, fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un scAb, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio único, y un anticuerpo de cadena ligera de dominio único.

En otros aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina une un receptor de citoquina y evita la unión de una citoquina al receptor. En otros aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina es un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo, por ejemplo, un anticuerpo de receptor de anti-citoquina o un fragmento de anticuerpo de receptor de anti-citoquina.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunos aspectos, la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión dirigidas a citoquina-serpina incluye al menos la secuencia de aminoácidos de una variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunos aspectos, la variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión dirigidas a citoquina-serpina incluye o se deriva de al menos la secuencia de polipéptidos de AAT humana de longitud completa que tiene secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos el polipéptido de serpina de la proteína de fusión dirigidas a citoquina-serpina incluye secuencia de polipéptidos de AAT humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 32 o 33.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión dirigidas a citoquina-serpina incluye una secuencia de polipéptidos de AAT o una secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de AAT que es o se deriva de una o más de las secuencias de polipéptidos de AAT humanas mostradas en el Acceso GenBank Nos. AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1, y/o AAA51547.1.

La proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina puede incorporar una porción de la proteína de fusión serpina-Fc. Por ejemplo, un anticuerpo contiene un polipéptido Fc. Por lo tanto, en algunos aspectos en los que el polipéptido dirigido a citoquina es un anticuerpo dirigido a citoquina, la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina incorporará una porción de la proteína de fusión serpina-Fc. Adicionalmente, la mayoría de proteínas de fusión receptoras que son de utilidad terapéutica son proteínas de fusión Fc. De esta manera, en algunos aspectos, en los que la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina es una proteína de fusión receptora de citoquina-serpina, la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina puede incorporar un polipéptido Fc además de la porción de serpina y la porción de receptor de citoquina.

En algunos aspectos, en los que la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina incluye una secuencia de polipéptidos Fc, la secuencia de polipéptidos Fc incluye o se deriva de la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7. En algunos aspectos en los que la proteína de fusión dirigidas a citoquina-serpina incluye una secuencia de polipéptidos Fc, la secuencia de polipéptidos Fc tiene al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una cualquiera de la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3, 4, 5, 6, o 7. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina y el polipéptido dirigido a citoquina se unen de forma operable a través de una región ligadora, por ejemplo, un ligador glicina-serina o ligador basado en glicina-serina. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina y el polipéptido dirigido a citoquina se unen de forma operable a través de una región bisagra. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina y el polipéptido dirigido a citoquina se unen de forma operable a través de una región ligadora y una región bisagra. En otros aspectos, se unen directamente el polipéptido de serpina y el polipéptido dirigido a citoquina.

En algunas realizaciones de las proteínas de fusión proporcionadas en este documento, el segundo polipéptido (Polipéptido 2) de la proteína de fusión serpina es un polipéptido que contiene dominio de proteína ácida de suero (WAP), o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene dominio WAP. Estas realizaciones se denominan colectivamente en este documento como "proteínas de fusión de dominio WAP-serpina." Las proteínas de fusión de dominio WAP-serpina incluyen al menos un polipéptido de serpina o al menos una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina, un polipéptido que contiene el dominio WAP o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene el dominio WAP. En algunas realizaciones, la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye un único polipéptido de serpina. En otras realizaciones, la proteína de fusión de polipéptido dirigido a WAP-serpina incluye más de un polipéptido de serpina. Estas realizaciones se denominan colectivamente en este documento como "proteínas de fusión de dominio WAP-serpina_(a)," en las que (a') es un entero de al menos 2. En algunas realizaciones, polipéptidos de serpina de la proteína de fusión de dominio WAP-serpina_(a) incluye la misma secuencia de aminoácidos. En otras realizaciones, los polipéptidos de serpina de la proteína de fusión de polipéptido dirigido a citoquina-serpina_(a), incluye polipéptidos de serpina con distintas secuencias de aminoácidos.

Estas proteínas de fusión de dominio WAP-serpina incluyen un polipéptido que contiene dominio WAP o secuencia de polipéptidos que es o se deriva de un polipéptido que contiene dominio WAP. El dominio WAP es un motivo de secuencia evolutivamente conservado de 50 aminoácidos que contiene ocho cisteínas que se encuentran en una disposición de núcleo de 4-disulfuro característico (también llamado motivo de núcleo de cuatro disulfuro). El motivo de secuencia de dominio WAP es un motivo funcional caracterizado por la actividad de inhibición de serina proteasa en una serie de proteínas.

Los polipéptidos que contienen el dominio WAP adecuados para uso en las proteínas de fusión proporcionadas en este documento incluyen, a modo de ejemplo no limitante, inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (SLPI), Elafina, y Eppina.

En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos que contienen el dominio WAP de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de inhibidor de proteasa leucocitaria secretora (SLPI) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de SLPI. Estos aspectos se denominan en este documento como "proteínas de fusión derivada de SLPI-serpina." En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos SLPI comprende una porción de la proteína de SLPI, tal como, por ejemplo, el dominio WAP2 o una subporción del mismo. En un aspecto preferido, la secuencia de polipéptidos SLPI o una secuencia de aminoácidos que se deriva de SLPI es o se deriva de una secuencia de polipéptidos SLPI humano.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de SLPI-serpina de la invención, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos SLPI humano de longitud completa que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 MKSSGLFPFL VLLALGTLAP WAVEGSGKSF KAGVCPKKS AQLRYKKPE CQSDWQCPGK
61 KRCCPDTGCI KCLDFVDTPN PTRRKPGKCP VTYGQCLMLN PPNFCEMDGQ CKRDLKCCMG
121 MCGKSCVSPV KA (SEQ ID NO:8)

```

En algunos aspectos de la proteína de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos SLPI humano que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 8.

En algunos aspectos de la proteína de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una porción de la secuencia de polipéptidos SLPI humano de longitud completa, en la que la porción tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```

1 SGKSFKAGVC PPKKSAQCLR YKKPECQSDW QCPGKKRCCP DTCGIKCLDP VDTPNPTRRK
61 PGKCPVTYGG CLMLNPPNFC EMDGQCKRDL KCCMGKCGKS CVSPVKA (SEQ ID NO: 9)

```

En algunos aspectos de la proteína de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos SLPI humano que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 9.

En algunos aspectos de la proteína de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye el dominio WAP2 de la secuencia de polipéptidos SLPI humano de longitud completa, en la que el dominio WAP2 tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: 1 TRRKPGKCPV TYGQCLMLNP PNFCEMDGQC KRDLKCCMGK CGKSCVSPVK A (SEQ ID NO: 10)

En algunos aspectos de la proteína de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos SLPI humano que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 10.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de polipéptidos SLPI o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de SLPI es o se deriva de, una o más de las secuencias de polipéptidos SLPI humanos mostradas en el Acceso GenBank Nos. CAA28187.1, NP_003055.1, EAW75869.1, P03973.2, AAH20708.1, CAB64235.1, CAA28188.1, AAD19661.1, y/o BAG35125.1.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de SLPI-serpina de la divulgación, la secuencia de polipéptidos SLPI o una secuencia derivada de SLPI de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos SLPI humano que se modifica en un residuo de Metionina (Met). En estas mutaciones Met, el residuo Met se puede sustituir con cualquier aminoácido. Por ejemplo, el residuo Met se puede sustituir con un aminoácido con una cadena lateral hidrófoba, tal como, por ejemplo, leucina (Leu, L) o valina (Val, V). Sin desear limitarse a la teoría, las mutaciones Met evitan la oxidación y la posterior inactivación de la actividad inhibitora de las proteínas de fusión de la invención. En algunos aspectos, la mutación Met está en la posición 98 de un polipéptido de SLPI. Por ejemplo, la secuencia modificada de polipéptidos SLPI de la serpina-SLPI incluye mutaciones M98L o M98V *en la SEQ ID NO: 8*.

En otros aspectos, la secuencia de polipéptidos que contienen el dominio WAP de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de elafina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de elafina. Estos aspectos se denominan en este documento como "proteínas de fusión serpina-elafina. En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos de elafina incluye una porción de la proteína de elafina, tal como, por ejemplo, el dominio WAP o una subporción del mismo. En un aspecto preferido, la secuencia de polipéptidos de elafina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de elafina es o se deriva de una secuencia de polipéptidos de elafina humana.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de elafina humana de longitud completa que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
1 MRASSFLIVV VFLIAGTLVL EAAVTGVPVK GQDTVKGRVP FNGQDPVKGQ VSVKGQDKVK
61 AQEPVKGPVS TKPGSCPIIL IRCAMLNPPN RCLKDTDCPG IKKCEGSCG MACFVPQ
(SEQ ID NO: 11)
```

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de elafina humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 11.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye una porción de la secuencia de polipéptidos de elafina humana de longitud completa, en la que la porción tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

```
1 AVTGVPVKGQ DTVKGRVFPN GQDPVKGQVS VKGQDKVKAQ EPVKGPVSTK PGSCPIILIR
61 CAMLNPPNRC LKDTDCPGIK KCEGSCGMA CFVPQ
(SEQ ID NO: 12)
```

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de elafina humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 12.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye el dominio WAP de la secuencia de polipéptidos de elafina humana de longitud completa, en la que el dominio WAP tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: 1 VSTKPGSCPI ILIRCAMLNP PNRCLKDTDC PGIKKCEGS CGMACFVPQ (SEQ ID NO: 13)

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de elafina humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 13.

En algunos aspectos de las proteínas de fusión de serpina-elafina, la secuencia de polipéptidos de elafina o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de elafina se deriva de una o más de las secuencias de polipéptidos de elafina humana mostradas en el Acceso GenBank Nos. P19957.3, NP_002629.1, BAA02441.1, EAW75814.1, EAW75813.1, Q8IUB2.1, y/o NP_542181.1.

En otros aspectos, la secuencia de polipéptidos que contienen el dominio WAP de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de Eppina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de Eppina. Estos aspectos se

denominan en este documento como “proteínas de fusión serpina_(a)-Eppina. En algunos aspectos, la secuencia de polipéptidos de Eppina de la proteína de fusión serpina-Eppina incluye una porción de la proteína Eppina, tal como, por ejemplo, el dominio WAP o una subporción del mismo. En un aspecto preferido, la secuencia de polipéptidos de Eppina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de Eppina es o se deriva de una secuencia de polipéptidos de Eppina humana.

En algunos aspectos de la serpina-Eppina proteínas de fusión, la secuencia de polipéptidos de Eppina o secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de Eppina es o se deriva de una o más de las secuencias de polipéptidos de Eppina humana mostradas en el Acceso GenBank Nos. O95925.1, NP_065131.1, AAH44829.2, AAH53369.1, AAG00548.1, AAG00547.1, y/o AAG00546.1.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunas realizaciones, la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión serpina-WAP incluye al menos la secuencia de aminoácidos de una variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunos aspectos, la variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye al menos la secuencia de polipéptidos de AAT humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos el polipéptido de serpina de la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye secuencia de polipéptidos de AAT humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 32 o 33.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye la secuencia de polipéptidos de AAT es, o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de AAT se deriva de, una o más de las secuencias de polipéptidos de AAT humanas mostradas en el Acceso GenBank Nos. AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1, y/o AAA51547.1.

En algunos aspectos, la proteína de fusión de dominio WAP-serpina también puede incluir un polipéptido Fc o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido Fc. Estos aspectos se mencionan colectivamente en este documento como “proteínas de fusión de serpina-Fc-dominio WAP.” En estos aspectos, ningún orden particular debe ser interpretado por esta terminología. Por ejemplo, el orden de la proteína de fusión puede ser serpina-Fc-dominio WAP, serpina-dominio WAP-Fc, o cualquier combinación de variación del mismo. Las proteínas de fusión de serpina-Fc-dominio WAP descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina, polipéptido que contiene el dominio WAP o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene el dominio WAP, y un polipéptido Fc o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido Fc.

En algunos aspectos, en los que la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye una secuencia de polipéptidos Fc, la secuencia de polipéptidos Fc puede tener la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 3-7. En otros aspectos, en los que la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye una secuencia de polipéptidos Fc, la secuencia de polipéptidos Fc puede tener al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NOs. 3-7. En algunos aspectos, la proteína de fusión de dominio WAP-serpina también puede incluir un polipéptido de albúmina, o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de albúmina. Estos aspectos se mencionan colectivamente en este documento como “proteínas de fusión de serpina-albúmina-dominio WAP.” En estos aspectos, ningún orden particular debe ser interpretado por esta terminología. Por ejemplo, el orden de la proteína de fusión puede ser serpina-albúmina-dominio WAP, serpina- dominio WAP-albúmina, o cualquier combinación de variación del mismo. Las proteínas de fusión de serpina-albúmina-dominio WAP descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina, polipéptido que contiene el dominio WAP, o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene el dominio WAP, y un polipéptido de albúmina, o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de albúmina.

En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina incluye la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14-15, descrita en este documento. En otros aspectos, en los que la proteína de fusión de dominio WAP-serpina incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina tiene al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% de identidad con una cualquiera de las secuencias de aminoácidos que tiene la SEQ ID NO: 14 o 15.

En algunos aspectos, el segundo polipéptido (Polipéptido 2) de la proteína de fusión serpina es un polipéptido de albúmina o se deriva de un polipéptido de albúmina. Estos aspectos se mencionan colectivamente en este

documento como "serpina_(a)-albúmina proteínas de fusión." Las proteínas de fusión de serpina-albúmina descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina y un polipéptido de albúmina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de albúmina. Adicionalmente esta divulgación se refiere a una proteína de fusión de polipéptido de unión a serpina albúmina, en la que la albúmina se une de forma operable a la serpina a través de una molécula de unión intermedia. En este documento, la serpina se une de forma covalente o ni covalente a albúmina en suero humana.

En los aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina de la proteína de fusión es un polipéptido de albúmina en suero humana (HSA) o una secuencia de aminoácidos derivada de HSA. En algunos aspectos, la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de HSA que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

DAHKSEVAHRFKDLGEEFNKALVLI AFAQYLOQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAEN
 CDKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMADCCAKQEPERNECFLQHKDDNPNLPRLLVRPEVDV
 MCTAFHDNEETF LKKYLYE IARRHPYFYAP ELLFFAKRYKAAFTECCQAADKAAACLLPKLD
 ELRDEGKASSAKQRLKCASLQKFGERAFAKAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTE
 CCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDS ISSKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSL
 AADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYEYARRHPDYSVVL LRLAKTYETTLEKCCAAADP
 HECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNCLEFELQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVS
 RNLGKVGSKCKKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCF
 SALEVDETYVVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD
 DFAAFVEKCKKADDKETCFAEEGKKLVAASQAALGL (SEQ ID NO: 14)

En los aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina en suero humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 14.

En los aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina de la proteína de fusión incluye un dominio 3 de la secuencia de polipéptidos de albúmina en suero humana que tiene la siguiente secuencia de aminoácidos:

EEPQNLIKQNCLEFELQGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKK
 HPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVSDRVTKCTESLVNRRPCF SALEVDETYVVP
 KEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMD DFAAFVEKCC
 KADDKETCFAEEGKKLVA (SEQ ID NO: 15)

En los aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la secuencia de polipéptidos de albúmina de la proteína de fusión incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina en suero humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 15.

En algunos aspectos en los que la proteína de fusión de la divulgación incluye una secuencia de polipéptidos de albúmina, la proteína de fusión se une a la albúmina en suero humana a través de un polipéptido de unión a albúmina intermedio. El polipéptido de unión a albúmina puede ser un anticuerpo o un fragmento de anticuerpo o derivado de un anticuerpo o fragmento de anticuerpo. En un aspecto preferido, el polipéptido de unión a albúmina o una secuencia de aminoácidos que se deriva del anticuerpo o fragmento de anticuerpo se deriva de una secuencia de anticuerpos quiméricos, humanizados, o completamente humanos. El término fragmento de anticuerpo incluye cadena única, fragmento Fab, un fragmento F(ab')₂, un scFv, un scAb, un dAb, un anticuerpo de cadena pesada de dominio único, y un anticuerpo de cadena ligera de dominio único. Adicionalmente, el polipéptido de unión a albúmina puede ser un péptido de unión a albúmina. Otro aspecto de la divulgación es una serpina polipéptido de unión a fusión de albúmina, en la que el polipéptido de unión a albúmina es el dominio 3 de la proteína estreptocócica G o una secuencia derivada del dominio 3 de la proteína estreptocócica G.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión de serpina_(a)-albúmina incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunos aspectos, la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:1. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de la serpina-albúmina proteína de fusión incluye al menos la secuencia de aminoácidos de una variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT. En algunos aspectos, la variante de la porción del bucle del sitio reactivo de la proteína AAT incluye al menos la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:32 o SEQ ID NO:33. En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión de serpina-albúmina incluye al menos la secuencia de polipéptidos de AAT humana de longitud completa que tiene la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2. En algunos aspectos el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión de serpina-albúmina incluye secuencia de polipéptidos de AAT humana que es al menos 50%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% o 99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 2 o 32 o 33.

En algunos aspectos, el polipéptido de serpina de las proteínas de fusión de serpina-albúmina incluye la secuencia de polipéptidos de AAT o la secuencia de aminoácidos derivada de un polipéptido de AAT es o se deriva de una o más de las secuencias de polipéptidos de AAT humanas mostradas en el Acceso GenBank Nos. AAB59495.1, CAJ15161.1, P01009.3, AAB59375.1, AAA51546.1, CAA25838.1, NP_001002235.1, CAA34982.1, NP_001002236.1, NP_000286.3, NP_001121179.1, NP_001121178.1, NP_001121177.1, NP_001121176.16, NP_001121175.1, NP_001121174.1, NP_001121172.1, y/o AAA51547.1.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión se modifican para aumentar o inhibir la división proteolítica, por ejemplo, al mutar uno o más sitios de división proteolítica. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión se modifican para alterar o modular de otro modo una función efectora Fc de la proteína de fusión, mientras que simultáneamente retienen la función de unión e inhibidora en comparación con una proteína de fusión inalterada. Las funciones efectoras de Fc incluyen, a modo de ejemplos no limitantes, la unión al receptor de Fc, prevención de la liberación del mediador proinflamatorio al unirse al receptor de Fc, fagocitosis, citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos modificados (ADCC), citotoxicidad modificada dependiente del complemento (CDC), glicosilación modificada en el residuo Asn297 (índice EU de numeración de Kabat, Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest) del polipéptido Fc. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión se mutan o modifican de otro modo para influir en la unión del receptor Fc. En algunas realizaciones, el polipéptido Fc se modifica para mejorar la unión de FcRn. Ejemplos de mutaciones del polipéptido Fc que mejoran la unión a FcRn son Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu (M252Y, S256T, T256E) (numeración de Kabat, Dall'Acqua et al 2006, J. Biol Chem Vol 281 (33) 23514-23524) o Met428Leu y Asn434Ser (M428L, N434S) (Zalevsky et al. 2010 Nature Biotech, vol. 28(2) 157-159). (Índice de la UE de Kabat et al 1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest). En algunas realizaciones, la porción del polipéptido Fc de muta o modifica de otro modo para interrumpir la dimerización mediada por Fc (Ying y col. 2012 J. Biol Chem 287(23): 19399-19408). En estas realizaciones, la proteína de fusión es de naturaleza monomérica.

Las proteínas de fusión y variantes de las mismas proporcionadas en este documento exhiben actividad inhibidora, por ejemplo, al inhibir una serina proteasa tal como elastasa de neutrófilos humanos (NE), una serina proteasa de doblez de quimiotripsina que es secretada por neutrófilos durante una respuesta inflamatoria. Las proteínas de fusión proporcionadas en este documento reducen completa o parcialmente o de otra forma modulan la actividad o expresión de serina proteasa luego de unión a, o de otra forma interactúan con, una serina proteasa, por ejemplo, una serina proteasa humana. La reducción o modulación de una función biológica de una serina proteasa es completa o parcial luego de interacción entre las proteínas de fusión y la proteína de serina proteasa humana, polipéptido y/o péptido. Se considera que las proteínas de fusión inhiben completamente la actividad o expresión de serina proteasa cuando el nivel de actividad o expresión de serina proteasa en la presencia de la proteína de fusión se reduce en al menos 95%, por ejemplo, en 96%, 97%, 98%, 99% o 100% cuando se compara con el nivel de actividad o expresión de serina proteasa en la ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con una proteína de fusión descrita en este documento. Se considera que las proteínas de fusión inhiben parcialmente la actividad o expresión de serina proteasa cuando el nivel de actividad o expresión de serina proteasa en la presencia de la proteína de fusión se reduce en menos de 95%, por ejemplo, 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, 60%, 75%, 80%, 85% o 90% cuando se compara con el nivel de actividad o expresión de serina proteasa en la ausencia de interacción, por ejemplo, unión, con una proteína de fusión descrita en este documento.

Las proteínas de fusión descritas en este documento son útiles en una variedad de indicaciones terapéuticas, diagnósticas y profilácticas. Por ejemplo, las proteínas de fusión son útiles en el tratamiento de una variedad de enfermedades y trastornos en un sujeto. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión de serpina, que incluyen, proteínas de fusión descritas en este documento, son útiles en el tratamiento en tratar, aliviar un síntoma de, mitigar y/o retrasar la progresión de una enfermedad o trastorno en un sujeto que sufre de o se identifica que está en riesgo de una enfermedad o trastorno seleccionado de deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT), enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), asma alérgica, fibrosis quística, cánceres de pulmón, isquemia-lesión por reperfusión, que incluye, por ejemplo, isquemia/lesión por reperfusión después de trasplante cardíaco, infarto de miocardio, artritis reumatoide, artritis séptica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, diabetes tipo I y/o tipo II, infecciones

bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones víricas, neumonía, septicemia, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), cicatrización de herida, lupus eritematoso sistémico, y esclerosis múltiple.

5 Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con la invención incluyen una proteína de fusión de la invención, que incluye proteínas de fusión modificadas y otras variantes, junto con un portador adecuado. Estas composiciones farmacéuticas se pueden incluir en kits, tales como, por ejemplo, kits de diagnóstico.

Breve descripción de los dibujos

10 La Figura 1A es una representación esquemática de algunas realizaciones de proteínas de fusión serpina-Fc de acuerdo con la invención. La serpina se puede ubicar en cualquier posición dentro de la proteína de fusión. También se re representan proteínas de fusión serpina-Fc que incorporan más de un polipéptido de serpina. La Figura 1B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra AAT derivada de suero (columna 1), AAT-Fc1 (columna 2, Fc IgG1 humano), y AAT-EL-Fc1 (columna 3, mutaciones Met351Glu, Met358Leu dentro de AAT, IgG1 Fc humano). La
 15 La Figura 1C es una gráfica que muestra la inhibición de actividad de elastasa de neutrófilos mediante proteínas de fusión AAT-Fc. La Figura 1D es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra AAT-Fc-AAT tetravalente, que tiene dos polipéptidos de AAT por polipéptido Fc. La Figura 1E es una gráfica que muestra la inhibición de actividad de elastasa de neutrófilos mediante una proteína de fusión AAT-Fc-AAT tetravalente. La Figura 1F es una gráfica que demuestra el efecto de baja elución de pH de la resina A de proteína, en la que la capacidad inhibidora de NE de la proteína de fusión AAT-Fc eluida a bajo pH se reduce drásticamente. La Figura 1G es una gráfica que muestra que el doble mutante, AAT-EL-Fc (mutaciones Met351Glu, Met358Leu) es resistente a inactivación de H₂O₂ (conc.), en comparación con la AAT tipo silvestre y la AAT-EM-Fc (Met351Glu) mutante única. La Figura 1H es una gráfica que representa las tasas de aclaramiento en suero de AAT derivada de suero (sdAAT) en comparación con AAT-Fc en ratas dosificadas con 10 mg/kg de proteína (3 ratas/proteína de prueba). La semivida de AAT-Fc es
 20 sustancialmente más larga que aquella de sdAAT.

La Figura 2A es una representación esquemática de algunas realizaciones de las proteínas de fusión dirigidas a citoquina-serpina de la invención. La serpina se puede fusionar a ya sea la cadena pesada, la cadena ligera, o
 30 ambas de un anticuerpo. También se representan las proteínas de fusión de receptor de citoquina-serpina. La Figura 2B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra el anticuerpo D2E7 (columna 1), y el anticuerpo D2E7 con AAT fusionada a la cadena pesada (columna 2). La Figura 2C es una gráfica que muestra la inhibición de actividad de elastasa de neutrófilos mediante un anticuerpo D2E7 fusionado a AAT. La AAT derivada de suero se muestra como un control positivo, mientras que solo el anticuerpo D2E7 se muestra como un control negativo para la inhibición de NE.

35 La Figura 3A es una representación esquemática de algunas realizaciones de las proteínas de fusión de serpina-Fc-WAP. La Figura 3B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra AAT-Fc-ELAFINA (columna 1) y AAT-Fc-SLPI (columna 2). La Figura 3C es una gráfica que muestra la inhibición de actividad de elastasa de neutrófilos mediante una proteína de fusión AAT-Fc-ELAFINA y una proteína de fusión AAT-Fc-SLPI. Una proteína de fusión AAT-Fc y AAT derivada de suero se incluye para comparación.

La Figura 4A es una representación esquemática de algunas realizaciones de las proteínas de fusión AAT-HSA. La
 40 Figura 4B es una fotografía de un gel de SDS-PAGE que muestra una fusión AAT-HSA. La Figura 4C es una gráfica que muestra la inhibición de actividad de elastasa de neutrófilos mediante una AAT-HSA en comparación con AAT derivada de suero.

Descripción detallada de la invención

50 La elastasa de neutrófilos humanos (NE) es una serina proteasa de doblez de quimotripsina, secretada por neutrófilos durante la inflamación. La actividad aberrante de NE da como resultado una degradación progresiva de los tejidos de elastina y la lenta destrucción de las estructuras alveolares de los pulmones que conducen a enfisema y fibrosis pulmonar (Lungarella et al 2008 Int. J. Biochem Cell Biol 40: 1287). A menudo, la actividad errónea de NE se debe a un desequilibrio de la proteasa con su inhibidor natural, la alfa 1-antitripsina (AAT). Este desequilibrio puede ser el resultado de una mayor infiltración de neutrófilos en los pulmones, como se observa en los pulmones de los fumadores y pacientes con fibrosis quística (CF) o síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS). Por el contrario, una deficiencia de AAT, generalmente como resultado de una mutación puntual que hace que ATT se agregue y se acumule en el hígado, deja los pulmones expuestos a una actividad de NE no controlada. Las personas con deficiencias de AAT tienen un mayor riesgo de enfisema, COPD, enfermedad hepática y muchas otras
 55 afecciones.

60 La deficiencia de AAT afecta a aproximadamente 100.000 estadounidenses (según estimaciones de la Fundación Alpha-1), y muchas de las personas afectadas mueren entre los 30 y los 40 años. Actualmente solo hay unos pocos fármacos aprobados por la FDA para el tratamiento de la deficiencia de ATT (Prolastin®, Aralast™, Zemaira®, Glassia™). Cada fármaco es el AAT natural derivado del plasma humano agrupado, que parece ser insuficiente para satisfacer la demanda clínica anticipada. Adicionalmente, estos productos tienen semividas en suero cortas (T_{1/2} de aproximadamente 5 días) y requieren infusiones semanales de dosis altas (60 mg/kg de peso corporal). El mercado
 65

actual de estos fármacos se estima en aproximadamente USD\$ 400 millones. Es probable que el mercado de fármacos similares a AAT sea sustancialmente mayor, según la estimación de que hasta el 95% de las personas con deficiencias de AAT no se diagnostican, y el hecho de que estos fármacos tienen el potencial de ser terapias efectivas para patologías caracterizadas por una actividad de NE mejorada en individuos que no tienen deficiencia de AAT (por ejemplo, fibrosis quística (CF), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), enfisema inducido por fumar y/o COPD).

Se ha sugerido que la AAT tiene actividad antiinflamatoria de amplio espectro (Tilg et al 1993 J Exp Med 178: 1629-1636, Libert et al 1996 Immunol 157: 5126-5129, Pott et al, Journal of Leukocyte Biology 85 2009, Janciauskiene et al 2007 J. Biol Chem 282(12): 8573-8582, Nita et al 2007 Int J Biochem Cell Biol 39: 1165-1176). Recientemente, se ha acumulado evidencia de que la AAT puede ser útil en el tratamiento de numerosas patologías humanas, fuera de las afecciones pulmonares inflamatorias comúnmente sugeridas. La AAT humana ha mostrado proteger a los ratones de los signos clínicos e histopatológicos de encefalomiелitis autoinmunitaria experimental (EAE), lo que sugiere que podría ser un posible tratamiento de enfermedades autoinmunitarias, tales como la esclerosis múltiple o el lupus eritematoso sistémico (SLE) (Subramanian et al 2011 Metab Brain Dis 26: 107-113). La AAT en suero ha mostrado actividad en modelos de roedores de la enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD) (Tawara et al. 2011 Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 564-569, Marcondes et al. 2011 3 de noviembre; 118 (18): 5031-9), lo que ha llevado a un ensayo clínico en humanos con AAT para tratar a personas con GVHD aguda no sensible a esteroides (NCT01523821). Adicionalmente, la AAT ha sido eficaz en modelos animales de diabetes tipo I y tipo II, amortiguando la inflamación, protegiendo las células de los islotes de la apoptosis y permitiendo un aloinjerto de células de islotes duradero (Zhang et al. 2007 Diabetes 56: 1316-1323, Lewis et al. 2005 Proc Natl Acad Sci USA 102: 12153-12158, Lewis et al 2008 Proc Natl Acad Sci USA 105: 16236-16241, Kalis et al 2010 Islets 2: 185-189). Actualmente, existen numerosos ensayos clínicos tempranos en humanos de diabetes tipo I con productos de AAT derivados del suero (NCT01183468, NCT01319331, NCT01304537).

Los productos actuales de AAT derivados del suero se someten a una purificación y pruebas exhaustivas para garantizar la eliminación de virus patógenos, sin embargo, el riesgo de transmisión de agentes infecciosos no se puede eliminar por completo. Más aún, el suero es limitado, lo que limita la capacidad de producción de AAT derivada del suero. Los intentos para abordar las preocupaciones de los productos derivados del suero y los problemas de producción se han dirigido a la expresión de AAT recombinante. Sin embargo, después de 20 años de trabajo, la generación de un AAT recombinante terapéuticamente viable aún no ha llegado al mercado (Kamaukhova et al 2006 Amino Acids 30: 317). Al igual que los productos derivados del plasma, las versiones recombinantes de AAT sufren de semividas en suero cortas, bajos rendimientos de producción y mala distribución pulmonar.

Las proteínas de fusión de la presente invención tienen funcionalidades mejoradas en comparación con la molécula AAT no modificada. La fusión de un polipéptido de AAT con un segundo polipéptido que interactúa con el receptor Fc neonatal (FcRn) sirve para aumentar la semivida en suero, proporcionando un beneficio de dosificación muy necesario para los pacientes. Estos polipéptidos que interactúan con FcRn de la proteína de fusión incluyen polipéptidos Fc de inmunoglobulina (Ig) derivados de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM humana, y derivados de albúmina humana. En algunas realizaciones, la proteína de fusión incorpora mutaciones con la porción de AAT que hacen que la molécula sea más resistente a la inactivación por oxidación. Por ejemplo, Met351Glu, Met358Leu (AAT-EL-Fc), demuestra la inactivación de resistencia por oxidación H₂O₂ (Figura 1G). Si bien la AAT es una proteína antiinflamatoria natural, algunas realizaciones de la invención proporcionan una mayor capacidad de amortiguación de la inflamación a través de la fusión de un polipéptido de AAT y un polipéptido dirigido a las citoquinas. El acoplamiento de funcionalidades antiinflamatorias duales de AAT y un segundo polipéptido proporcionará una proteína terapéutica más potente que cualquiera de los polipéptidos por sí solo. Adicionalmente, el acoplamiento de la actividad antiinfecciosa de AAT mitigará el riesgo de infección de la mayoría de las biología dirigidas a las citoquinas. Algunas realizaciones proporcionan proteínas antiinflamatorias y antiinfecciosas más potentes mediante la fusión de un polipéptido de AAT y un polipéptido que contiene el dominio WAP. Se espera que las proteínas de fusión de la presente invención tengan una gran utilidad terapéutica y sean superiores a los productos de AAT derivados de suero actuales.

Para extender la semivida de AAT recombinante, se usó tecnología de ADN recombinante para crear una fusión de genes AAT con el dominio Fc de IgG1, IgG2, IgG3 humana, IgG4, IgM o HSA, de modo que el producto de proteína esperado sería AAT seguido de un dominio Fc ((AAT-Fc (IgG1), AAT-Fc (IgG2), AAT-Fc (IgG3), AAT-Fc (IgG4), AAT-Fc (IgM)) o AAT seguida de HSA. Si bien se sabía que la fusión de dominios Fc de HSA con algunas proteínas, dominios de proteínas o péptidos podría extender su semivida (véase, por ejemplo, Jazayeri et al. BioDrugs 22, 11-26, Huang et al. (2009) Curr Opin Biotechnol 20, 692-699, Kontermann et al. (2009) BioDrugs 23, 93-109, Schmidt et al. (2009) Curr Opin Drug Discov Devel 12, 284-295), no se sabía si un dominio Fc o HSA fusionado con AAT permitiría el plegamiento y el mantenimiento adecuados de la actividad inhibidora de NE, o podría extender la semivida de AAT recombinante. Se muestra que las proteínas de fusión de la presente invención son inhibidores potentes de NE, tienen semividas en suero extendidas y, en algunas realizaciones, resistentes a la oxidación. En otras realizaciones, las proteínas de fusión descritas en el presente documento tienen propiedades distintas mediante la incorporación de otros polipéptidos funcionales, que incluyen polipéptidos dirigidos a citoquinas y polipéptidos que contienen dominios WAP.

Las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina y un segundo polipéptido. En algunas realizaciones, por ejemplo, la invención proporciona un polipéptido de serpina fusionado a derivados de IgG1-Fc, IgG2-Fc, IgG3-Fc, IgG4-Fc, IgM-Fc, o HSA humanos. Se espera que la fusión de serpina descrita en este documento sea útil en tratar una variedad de indicaciones, que incluyen, a modo de ejemplo no limitante, deficiencia de alfa-1-antitripsina (AAT), enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), asma alérgica, fibrosis quística, cánceres de pulmón, isquemia-lesión por reperfusión, que incluyen, por ejemplo, isquemia/lesión por reperfusión después de trasplante cardíaco, infarto de miocardio, artritis reumatoide, artritis séptica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, diabetes tipo I y/o tipo II, infecciones bacterianas, infecciones fúngicas, infecciones víricas, neumonía, septicemia, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), cicatrización de herida, lupus eritematoso sistémico, y esclerosis múltiple.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y segundo polipéptido. Por ejemplo, la invención proporciona alfa-1-antitripsina (AAT) (AAT) fusionada a derivados de IgG1-Fc, IgG2-Fc, IgG3-Fc, IgG4-Fc, IgM-Fc, o HSA humanos.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de serpina y un polipéptido dirigido a citoquina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido dirigido a citoquina. Por ejemplo, la invención proporciona polipéptido de serpina o una secuencia derivada de un polipéptido de serpina fusionado a un receptor de citoquina humano o derivado del mismo. Otro aspecto de la divulgación proporciona polipéptido de serpina o una secuencia derivada de un polipéptido de serpina fusionado a un anticuerpo dirigido a citoquina, por ejemplo, un anticuerpo anti-citoquina, o una secuencia derivada de un anticuerpo dirigido a citoquina, por ejemplo, un anticuerpo anticitoquina, o secuencia derivada de un fragmento de anticuerpo dirigido a citoquinas, por ejemplo, un fragmento de un anticuerpo anticitoquina. Por ejemplo, la divulgación proporciona un polipéptido de serpina o una secuencia derivada de un polipéptido de serpina fusionado a un polipéptido dirigido a citoquina en el que el polipéptido dirigido a citoquina une cualquiera de las siguientes citoquinas humanas: TNF α , IgE, IL-12, IL-23, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-17, IL-13, IL-4, IL-10, IL-2, IL-18, IL-27, o IL-32.

Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina objetiva TNF α e incluye cualquiera del siguiente polipéptido dirigido a TNF α o secuencias derivadas de los siguientes polipéptidos dirigidos a TNF α : Remicade®, Humira®, Simponi®, Cimiza®, Enbrel® o ATN-103 y ATN-192.

Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina objetiva IgE e incluye cualquiera de los siguientes polipéptidos dirigidos a IgE o secuencias derivadas de los siguientes polipéptidos dirigidos a IgE: Xolair o FceRI.

Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina objetiva la subunidad p40 compartida de IL-12 y IL-23 e incluye el polipéptido Stelara® o secuencias derivadas del polipéptido Stelara®.

Por ejemplo, el polipéptido Stelara® dirigido a citoquina objetiva IL-13 e incluye el polipéptido CDP7766 o secuencias derivadas del polipéptido CDP7766.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos a polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y un polipéptido dirigido a citoquina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido dirigido a citoquina. Por ejemplo, la divulgación proporciona el inhibidor de alfa-1-antitripsina (AAT) fusionado un polipéptido dirigido a citoquina en el que el polipéptido dirigido a citoquina une cualquiera de las siguientes citoquinas humanas: TNF α , IgE, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-13, IL-23, IL-4, IL-10, IL-2, IL-18, IL-27, o IL-32.

En algunos aspectos el polipéptido dirigido a citoquina une un receptor de citoquina y evita la unión de la citoquina. Por ejemplo, la presente divulgación incluye una serpina fusionada a un receptor de anticuerpo dirigido a citoquina. Por ejemplo, la divulgación proporciona un inhibidor de alfa-1-antitripsina (AAT) fusionado a un polipéptido dirigido a citoquina en el que el polipéptido dirigido a citoquina une el receptor de cualquiera de las siguientes citoquinas humanas: TNF α , IgE, IL-6, IL-1 α , IL-1 β , IL-12, IL-17, IL-13, IL-23, la subunidad p40 de IL-12 y IL-23, IL-4, IL-10, IL-2, IL-18, IL-27, o IL-32.

Por ejemplo, en algunos aspectos, el polipéptido dirigido a citoquina objetiva el receptor IL-6 e incluye el polipéptido Actemra® (como se describe en la publicación de patente EP0628639), o el polipéptido ALX-0061 (como se describe en WO2010/115998), o secuencias derivadas del polipéptido Actemra®, o polipéptido ALX-0061.

Por ejemplo, Actemra® el polipéptido dirigido a citoquina objetiva el receptor IL-6 e incluye el polipéptido tocilizumab o secuencias derivadas del polipéptido tocilizumab.

El direccionamiento de las citoquinas inflamatorias y los agentes inmunoestimulantes mediante productos terapéuticos de proteínas ha demostrado un éxito clínico en numerosas afecciones inflamatorias. Las proteínas más comunes utilizadas como agentes de direccionamiento de citoquinas son los receptores de citoquinas solubles y los anticuerpos monoclonales y fragmentos de los mismos. Un inconveniente significativo con las citoquinas dirigidas es el mayor riesgo de infección en estos pacientes, como lo demuestran las biología de objetivación TNF α , Remicade®, Humira®, Simponi®, Cimiza® y Enbrel®, y el anticuerpo de objetivación IL-12/23 p40, Stelara®. Es probable que este sea un problema común de objetivar las citoquinas inflamatorias que conducen a la supresión inmunitaria en pacientes. La AAT y otras proteínas serpinas son interesantes porque demuestran actividades tanto antiinfecciosas como antiinflamatorias. Por lo tanto, las proteínas de fusión de polipéptido dirigido a serpina-citoquina de esta divulgación pueden amortiguar las actividades aberrantes de citoquinas al tiempo que alivian el riesgo de infecciones.

En algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina, un polipéptido que contiene el dominio WAP o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene el dominio WAP, y un polipéptido Fc o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido Fc. Por ejemplo, la divulgación proporciona un polipéptido de serpina, un polipéptido que contiene el dominio WAP y derivados de IgG1-Fc, IgG2-Fc, IgG3-Fc, IgG4-Fc o IgM-Fc humanos unidos operablemente juntos en cualquier combinación funcional. En algunas realizaciones, la proteína que contiene dominio WAP es SLPI humano o derivado de SLPI humano. En otras realizaciones, la proteína que contiene dominio WAP es ELAFINA humana o derivada de ELAFINA humana. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y a polipéptido de SLPI o una secuencia de aminoácidos que se deriva de SLPI. En algunas realizaciones, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de AAT o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y un polipéptido de elafina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de Elafina.

La SPLI y Elafina son proteínas que contienen dominio WAP que exhiben actividad inhibidora de la serina proteasa. Ambas proteínas son antiinflamatorias en su función. Además, estas proteínas poseen amplias capacidades antiinfecciosas frente a numerosas cepas de bacterias, virus y hongos.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina y un polipéptido de albúmina en suero humana (HSA) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de HSA. Aspectos adicionales de la divulgación incluyen proteínas de fusión de polipéptido de unión a serpina, en las que el polipéptido de unión a albúmina es responsable de la asociación de la serpina y HSA. Por lo tanto, la divulgación incluye tanto enlaces covalentes y no covalentes del polipéptido de serpina y el polipéptido de HSA o secuencias derivadas del polipéptido de serpina o un polipéptido de HSA. Por ejemplo, la divulgación proporciona un polipéptido de serpina fusionado a HSA humana, o derivados de HSA, o péptidos o polipéptidos de unión a HSA.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y un polipéptido de HSA o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de HSA. Por ejemplo, la divulgación proporciona alfa-1-antitripsina (AAT) fusionada a HSA o un fragmento derivado de HSA, o un polipéptido de unión a albúmina.

En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen un polipéptido de serpina o una secuencia de aminoácidos que se deriva de una serpina, un polipéptido de HSA o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de HSA, y un polipéptido que contiene el dominio WAP o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido que contiene el dominio WAP. En algunos aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y un polipéptido de HSA o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de HSA, y a polipéptido de SLPI o secuencia de aminoácidos derivada de SLPI. En otros aspectos, las proteínas de fusión descritas en este documento incluyen al menos un polipéptido alfa-1-antitripsina (AAT) o una secuencia de aminoácidos que se deriva de AAT y un polipéptido de HSA o una secuencia de aminoácidos que se deriva de un polipéptido de HSA, y un polipéptido de elafina o secuencia de aminoácidos derivada de Elafina.

Las proteínas de fusión de la presente invención se pueden producir fácilmente en sistemas de expresión de células de mamífero. Por ejemplo, las células de ovario de hámster chino (CHO), las células 293 del riñón embrionario humano (HEK), las células COS, las células PER.C6®, NS0, SP2/0, YB2/0 se pueden utilizar fácilmente para la expresión de las proteínas de fusión de serpina descritas en este documento. Es importante destacar que los sistemas de expresión de células de mamíferos producen proteínas que generalmente son más óptimas para uso terapéutico. A diferencia de los sistemas de expresión basados en bacterias, insectos o levaduras, los sistemas de expresión de células de mamíferos producen proteínas con patrones de glucosilación que son similares o iguales a los que se encuentran en las proteínas humanas naturales. La glucosilación adecuada de una proteína puede influir en gran medida en la estabilidad del suero, la farmacocinética, la biodistribución, el plegamiento de proteínas y la funcionalidad. Por lo tanto, la capacidad de producir proteínas terapéuticas en sistemas de expresión de mamíferos tiene distintas ventajas sobre otros sistemas. Adicionalmente, la mayoría de los sistemas de expresión de células de

mamíferos (por ejemplo, células CHO, NSO, PER.C6®) se pueden escalar fácilmente en instalaciones de fabricación comerciales para producir proteínas terapéuticas para satisfacer las demandas clínicas. Las proteínas de fusión descritas en el presente documento tienen funcionalidades mejoradas sobre la forma natural de AAT y se pueden producir en sistemas de expresión de mamíferos para suministro clínico y comercial. Algunas realizaciones de la invención incluyen un sistema de purificación que permite el aislamiento de proteínas de fusión de serpina que retienen su capacidad de inhibir la NE. Es importante destacar que el proceso de purificación de la presente invención se puede incorporar fácilmente en los procesos comerciales de fabricación basados en células de mamíferos comerciales de hoy.

A menos que se defina lo contrario, los términos científicos y técnicos utilizados en relación con la presente invención tendrán los significados que comúnmente entienden los expertos en la técnica. Adicionalmente, a menos que el contexto requiera lo contrario, los términos singulares incluirán pluralidades y los términos plurales incluirán el singular. Generalmente, las nomenclaturas utilizadas en relación con las técnicas de cultivo celular y de tejido, la biología molecular y la química e hibridación de proteínas y oligo- o polinucleótidos descritas en el presente documento son bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Se utilizan técnicas estándar para ADN recombinante, síntesis de oligonucleótidos y cultivo de tejidos transformación (por ejemplo, electroporación, lipofección). Las reacciones enzimáticas y las técnicas de purificación se realizan de acuerdo con las especificaciones del fabricante o como se logra comúnmente en la técnica o como se describe en este documento. Las técnicas y procedimientos anteriores generalmente se realizan de acuerdo con métodos convencionales bien conocidos en la técnica y como se describe en varias referencias generales y más específicas que se citan y discuten a lo largo de la especificación. Véase, por ejemplo, Sambrook et al. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (2ª ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. (1989)). Las nomenclaturas utilizadas en relación con, y los procedimientos y técnicas de laboratorio de química analítica, química orgánica sintética y química medicinal y farmacéutica descritas en el presente documento son aquellas bien conocidas y comúnmente utilizadas en la técnica. Las técnicas estándar se utilizan para síntesis químicas, análisis químicos, preparación farmacéutica, formulación y suministro, y tratamiento de pacientes. El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios.

Se apreciará que la administración de entidades terapéuticas de acuerdo con la invención se administrará con portadores, tampones, excipientes y otros agentes adecuados que se incorporan a las formulaciones para proporcionar una transferencia, suministro, tolerancia y similares mejorados. Se pueden encontrar una multitud de formulaciones apropiadas en el formulario conocido por todos los químicos farmacéuticos: Remington's *Pharmaceutical Sciences* (15ª ed, Mack Publishing Company, Easton, PA (1975)), particularmente el Capítulo 87 de Blaug, Seymour, en el mismo. Estas formulaciones incluyen, por ejemplo, polvos, pastas, pomadas, jaleas, ceras, aceites, lípidos, lípidos (catiónicos o aniónicos) que contienen vesículas (tales como Lipofectin™), conjugados de ADN, pastas de absorción anhidra, emulsiones de aceite en agua y agua en aceite, emulsiones carbowax (polietilenglicoles de diversos pesos moleculares), geles semisólidos y mezclas semisólidas que contienen carbowax. Cualquiera de las mezclas anteriores puede ser apropiada en tratamientos y terapias de acuerdo con la presente invención, siempre que la formulación no inactive el ingrediente activo en la formulación y la formulación sea fisiológicamente compatible y tolerable con la vía de administración. Véase también Baldrick P. "Pharmaceutical excipient development: the need for preclinical guidance." *Regul. Toxicol Pharmacol.* 32(2):210-8 (2000), Wang W. "Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals." *Int. J. Pharm.* 203(1-2):1-60 (2000), Charman WN "Lipids, lipophilic drugs, and oral drug delivery-some emerging concepts." *J Pharm Sci.* 89(8):967-78 (2000), Powell et al. "Compendium of excipients for parenteral formulations" *PDA J Pharm Sci Technol.* 52:238-311 (1998) y citas de las mismas para obtener información adicional relacionada con formulaciones, excipientes y vehículos bien conocidos por los químicos farmacéuticos.

Las formulaciones terapéuticas de la invención, que incluyen una proteína de fusión de la invención, se utilizan para tratar o aliviar un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa aberrante en un sujeto. La presente divulgación también proporciona métodos para tratar o aliviar un síntoma asociado con una enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa aberrante en un sujeto. Un régimen terapéutico se lleva a cabo al identificar un sujeto, por ejemplo, un paciente humano que sufre (o corre el riesgo de desarrollar) una enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa aberrante, utilizando métodos estándar, que incluyen cualquiera de una variedad de estudios clínicos y/o procedimientos de laboratorio. El término paciente incluye sujetos humanos y veterinarios. El término sujeto incluye humanos y otros mamíferos.

La eficacia del tratamiento se determina en asociación con cualquier método conocido para diagnosticar o tratar la enfermedad o trastorno particular asociado con la actividad de serina proteasa aberrante. El alivio de uno o más síntomas de la enfermedad o trastorno asociado con la actividad de serina proteasa aberrante indica que la proteína de fusión confiere un beneficio clínico.

Los métodos para el cribado de proteínas de fusión que poseen la especificidad deseada incluyen, pero no se limitan a, ensayo de inmunosorción ligada a enzimas (ELISA), ensayos enzimáticos, citometría de flujo y otras técnicas inmunológicamente mediadas conocidas en la técnica.

Las proteínas de fusión descritas en el presente documento se pueden utilizar en métodos conocidos dentro de la técnica relacionados con la localización y/o cuantificación de un objetivo tal como una serina proteasa, por ejemplo, para uso en la medición de niveles de estos objetivos dentro de muestras fisiológicas apropiadas, para uso en métodos diagnósticos, para utilizar en la formación de imágenes de la proteína, y similares). Los términos “muestra fisiológica” y “muestra biológica”, utilizados indistintamente en este documento, pretenden incluir tejidos, células y fluidos biológicos aislados de un sujeto, así como tejidos, células y fluidos presentes dentro de un sujeto. Por lo tanto, se incluye dentro del uso de los términos “muestra fisiológica” y “muestra biológica”, sangre y una fracción o componente de la sangre que incluye suero sanguíneo, plasma sanguíneo o linfa.

En una realización dada, las proteínas de fusión específicas para un objetivo dado, o un derivado, fragmento, análogo u homólogo del mismo, que contienen el dominio de unión al objetivo, se utilizan como compuestos farmacológicamente activos (denominados en lo sucesivo “Productos Terapéuticos”).

Una proteína de fusión de la invención se puede utilizar para aislar un objetivo particular utilizando técnicas estándar, tales como inmovilización, cromatografía o inmunoprecipitación. La detección se puede facilitar al acoplar (es decir, unir físicamente) la proteína de fusión a una sustancia detectable. Los ejemplos de sustancias detectables incluyen varias enzimas, grupos prostéticos, materiales fluorescentes, materiales luminiscentes, materiales bioluminiscentes y materiales radiactivos. Ejemplos de enzimas adecuadas incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, β -galactosidasa o acetilcolinesterasa; ejemplos de complejos de grupos prostéticos adecuados incluyen estreptavidina/biotina y avidina/biotina; ejemplos de materiales fluorescentes adecuados incluyen umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; un ejemplo de un material luminiscente incluye luminol; ejemplos de materiales bioluminiscentes incluyen luciferasa, luciferina y aequorina, y ejemplos de material radioactivo adecuado incluye ^{125}I , ^{131}I , ^{35}S o ^3H .

Una cantidad terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión de la invención se refiere generalmente a la cantidad necesaria para lograr un objetivo terapéutico. Como se señaló anteriormente, esta puede ser una interacción de unión entre la proteína de fusión y su objetivo que, en ciertos casos, interfiere con el funcionamiento del objetivo. La cantidad requerida para ser administrada dependerá adicionalmente de la afinidad de unión de la proteína de fusión para su objetivo específico, y también dependerá de la velocidad a la que se agota una proteína de fusión administrada del volumen libre a otro sujeto al que se administra. Los rangos comunes para la dosificación terapéuticamente efectiva de una proteína de fusión o fragmento de la invención pueden ser, a modo de ejemplo no limitativo, desde aproximadamente 0.1 mg/kg de peso corporal hasta aproximadamente 250 mg/kg de peso corporal. Las frecuencias de dosificación comunes pueden variar, por ejemplo, de dos veces al día a una vez al mes.

Cuando se utilizan fragmentos de proteínas de fusión, se prefiere el fragmento inhibidor más pequeño que se une específicamente al objetivo. Por ejemplo, se pueden diseñar moléculas peptídicas que retengan la capacidad de unirse al objetivo. Dichos péptidos se pueden sintetizar químicamente y/o producir mediante tecnología de ADN recombinante. (Véase, por ejemplo, Marasco et al, Proc. Natl. Acad. Sci. Estados Unidos, 90: 7889-7893 (1993)). La formulación también puede contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular a tratar, preferiblemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan negativamente entre sí. Alternativamente, o adicionalmente, la composición puede comprender un agente que mejora su función, tal como, por ejemplo, un agente citotóxico, citoquina, agente quimioterapéutico, agente inhibidor del crecimiento, un agente antiinflamatorio o agente antiinfeccioso. Dichas moléculas están adecuadamente presentes en combinación en cantidades que son efectivas para el propósito pretendido.

Los ingredientes activos también pueden quedar atrapados en microcápsulas preparadas, por ejemplo, por técnicas de coacervación o por polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli (metacrilato de metilo), respectivamente, en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas), microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones.

Las formulaciones que se utilizarán para la administración in vivo deben ser estériles. Esto se logra fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen la proteína de fusión, cuyas matrices están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli (2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (Patente de Estados Unidos No. 3,773,919), copolímeros de ácido L-glutámico y γ -etil-L-glutamato, etileno-acetato de vinilo no degradable, copolímeros degradables de ácido láctico-ácido glicólico como LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida), y ácido poli-D(-)-3-hidroxi-butírico. Mientras que los polímeros tales como el etileno-acetato de vinilo y el ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante períodos de tiempo más cortos.

Composiciones farmacéuticas

Las proteínas de fusión de la invención (también denominadas en el presente documento “compuestos activos”), y derivados, fragmentos, análogos y homólogos de los mismos, se pueden incorporar en composiciones farmacéuticas adecuadas para la administración. Dichas composiciones comprenden normalmente la proteína de fusión y un vehículo farmacéuticamente aceptable. Como se utiliza en el presente documento, el término “vehículo farmacéuticamente aceptable” pretende incluir cualquiera y todos los solventes, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y retardadores de la absorción, y similares, compatibles con la administración farmacéutica. Los portadores adecuados se describen en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, un texto de referencia estándar en el campo. Los ejemplos preferidos de dichos vehículos o diluyentes incluyen, pero no se limitan a, agua, solución salina, soluciones de timbre, solución de dextrosa y albúmina de suero humano al 5%. También se pueden utilizar liposomas y vehículos no acuosos tales como aceites fijos. El uso de dichos medios y agentes para sustancias farmacéuticamente activas es bien conocido en la técnica. Excepto en la medida en que cualquier medio o agente convencional sea incompatible con el compuesto activo, se contempla el uso del mismo en las composiciones. Los compuestos activos suplementarios también se pueden incorporar en las composiciones.

Una composición farmacéutica de la invención está formulada para ser compatible con su ruta de administración prevista. Los ejemplos de rutas de administración incluyen la administración parenteral, por ejemplo, intravenosa, intradérmica, subcutánea, oral (por ejemplo, inhalación), transdérmica (es decir, tópica), transmucosa y rectal. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica o subcutánea pueden incluir los siguientes componentes: un diluyente estéril como agua para inyección, solución salina, aceites fijos, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros solventes sintéticos; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabenos; antioxidantes tales como ácido ascórbico o bisulfito de sodio; agentes quelantes tales como ácido etilendiammetetraacético (EDTA); tampones como acetatos, citratos o fosfatos, y agentes para el ajuste de la tonicidad como cloruro de sodio o dextrosa. El pH se puede ajustar con ácidos o bases, como el ácido clorhídrico o el hidróxido de sodio. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringas desechables o viales de dosis múltiples de vidrio o plástico.

Las composiciones farmacéuticas adecuadas para uso inyectable incluyen soluciones acuosas estériles (solubles en agua) o dispersiones y polvos estériles para la preparación extemporánea de soluciones o dispersiones inyectables estériles. Para la administración intravenosa, los portadores adecuados incluyen solución salina fisiológica, agua bacteriostática, Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) o solución salina tamponada con fosfato (PBS). En todos los casos, la composición debe ser estéril y debe ser fluida en la medida en que exista una fácil jeringabilidad. Debe ser estable bajo las condiciones de fabricación y almacenamiento y debe preservarse contra la acción contaminante de microorganismos tales como bacterias y hongos. El vehículo puede ser un solvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, poliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. Se puede mantener la fluidez adecuada, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como la lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de surfactantes. La prevención de la acción de los microorganismos se puede lograr mediante diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabenos, clorobutanol, fenol, ácido ascórbico, timerosal y similares. En muchos casos, será preferible incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, cloruro de sodio en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede lograrse al incluir en la composición un agente que retrase la absorción, por ejemplo, monoestearato de aluminio y gelatina.

Las soluciones inyectables estériles se pueden preparar al incorporar el compuesto activo en la cantidad requerida en un solvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según sea necesario, seguido de esterilización filtrada. Generalmente, las dispersiones se preparan al incorporar el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de aquellos enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos de preparación son el secado al vacío y la liofilización que produce un polvo del ingrediente activo más cualquier ingrediente adicional deseado de una solución filtrada previamente estéril del mismo.

Las composiciones orales generalmente incluyen un diluyente inerte o un vehículo comestible. Se pueden encerrar en cápsulas de gelatina o comprimirse en comprimidos. Para el propósito de la administración terapéutica oral, el compuesto activo puede incorporarse con excipientes y utilizarse en forma de comprimidos, pastillas o cápsulas. Las composiciones orales también se pueden preparar utilizando un vehículo fluido para utilizar como enjuague bucal, en el que el compuesto en el vehículo fluido se aplica por vía oral y se agita y expectora o traga. Los agentes de unión farmacéuticamente compatibles y/o los materiales adyuvantes pueden incluirse como parte de la composición. Los comprimidos, píldoras, cápsulas, pastillas y similares pueden contener cualquiera de los siguientes ingredientes, o compuestos de naturaleza similar: un aglutinante tal como celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; un excipiente tal como almidón o lactosa, un agente desintegrante tal como ácido algínico, Primogel o almidón de maíz; un lubricante tal como estearato de magnesio o Sterotes; un deslizante tal como dióxido de silicio coloidal; un agente edulcorante tal como sacarosa o sacarina; o un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aroma de naranja.

Para la administración por inhalación, los compuestos se administran en forma de aerosol desde un recipiente o dispensador presurizado que contiene un propulsor adecuado, por ejemplo, un gas tal como dióxido de carbono o un nebulizador.

5 La administración sistémica también puede ser por medios transmucosos o transdérmicos. Para la administración transmucosa o transdérmica, se utilizan penetrantes apropiados para la barrera a atravesar en la formulación. Dichos penetrantes son generalmente conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, para administración transmucosa, detergentes, sales biliares y derivados de ácido fusídico. La administración transmucosa se puede
10 lograr mediante el uso de aerosoles nasales o supositorios. Para la administración transdérmica, los compuestos activos se formulan en pomadas, ungüentos, geles o cremas como se conoce generalmente en la técnica.

Los compuestos también se pueden preparar en forma de supositorios (por ejemplo, con bases de supositorios convencionales tales como manteca de cacao y otros glicéridos) o enemas de retención para el suministro rectal.

15 En una realización, los compuestos activos se preparan con vehículos que protegerán el compuesto contra la eliminación rápida del cuerpo, tal como una formulación de liberación controlada, que incluye implantes y sistemas de suministro microencapsulados. Se pueden utilizar polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etileno y vinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, colágeno, poliortoésteres y ácido poliláctico. Los métodos para
20 la preparación de dichas formulaciones serán evidentes para aquellos expertos en la materia. Los materiales también se pueden obtener comercialmente de Alza Corporation y Nova Pharmaceuticals, Inc. Las suspensiones liposomales también se pueden utilizar como vehículos farmacéuticamente aceptables. Estos se pueden preparar de acuerdo con métodos conocidos por aquellos expertos en la técnica, por ejemplo, como se describe en la Patente de Estados Unidos No. 4,522,811.

25 Es especialmente ventajoso formular composiciones orales o parenterales en forma de unidad de dosificación para facilitar la administración y la uniformidad de la dosificación. La forma de unidad de dosificación como se utiliza en el presente documento se refiere a unidades físicamente discretas adecuadas como dosificaciones unitarias para el sujeto a tratar; cada unidad contiene una cantidad predeterminada de compuesto activo calculada para producir el
30 efecto terapéutico deseado en asociación con el vehículo farmacéutico requerido. La especificación para las formas de unidad de dosificación de la invención está dictada por y depende directamente de las características únicas del compuesto activo y el efecto terapéutico particular que se va a lograr, y las limitaciones inherentes en la técnica de combinar dicho compuesto activo para el tratamiento de individuos.

35 Las composiciones farmacéuticas se pueden incluir en un recipiente, paquete o dispensador junto con instrucciones para la administración.

La invención se describirá adicionalmente en los siguientes ejemplos, que no limitan el alcance de la invención descrita en las reivindicaciones.

40 EJEMPLOS

Ejemplo 1: Proteínas de fusión AAT-Fc y variantes

45 Ejemplos de proteínas de fusión AAT-Fc de ejemplo, pero no limitantes de acuerdo con la invención incluyen las siguientes secuencias. Aunque estos ejemplos incluyen una secuencia bisagra y/o ligadora, proteínas de fusión de la invención se pueden elaborar utilizando cualquier secuencia bisagra y/o ligadora adecuada en longitud y/o flexibilidad. Alternativamente las proteínas de fusión se pueden elaborar sin utilizar una secuencia bisagra y/o
50 ligadora. Por ejemplo, los componentes de polipéptido se pueden unir directamente.

Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-hFc1 (Fc IgG1 humana) descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2) y la porción de polipéptido de IgG-Fc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 3).

55 AAT-hFc1 (Fc IgG1 humana)

EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEFTVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRTVFA
LVNYIFFKWKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQ
LGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKE
NKPFVFLMIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:16)

5 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-hFc2 (Fc IgG2 humana), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2) y la porción de polipéptido de IgG-Fc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 4).

AAT-hFc2 (Fc IgG2 humana)

EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPNFKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEFTVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRTVFA
LVNYIFFKWKWERPFVVDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFFLPDEGKLQHLLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQ
LGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKE
NKPFVFLMIEQNTKSPFLFMGKVVNPTQKERKCCVECPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKGLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYF
SDIAVEWESNGQPENNYKTTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSQVMHEALHNN
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 17)

10 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-MM-EL-hFc1 (Fc IgG1 humana, Met351Glu/Met358Leu), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 34), la porción de polipéptido de IgGFc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 3), y la mutación Met351Glu está en cuadro, y la mutación Met358Leu está sombreada en gris.

15 AAT-MM-EL-hFc1(Fc IgG1 humana, Met351Glu/Met358Leu)

EDPQGDAAQKTDTSSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFA
LVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLLGQ
LGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAEFLEAIPSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVSVLTTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAGQPREPQVYTLPSRDELTKNQVSLTCLVK

GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 18)

5 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-MM-EL-hFc2 (Fc IgG2 humana, Met351Glu/Met358Leu), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 34), la porción de polipéptido de IgGFc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 4), la mutación Met351Glu está en cuadro, y la mutación Met358Leu está sombreada en gris.

AAT-MM-EL-hFc2(Fc IgG2 humana, Met351Glu/Met358Leu)

EDPQGDAAQKTDTSSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTLNQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDTVFA
LVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLLGQ
LGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAEFLEAIPSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQKERKCCVECPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVSVLTTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKLPAPIEKTISKTKGQPREPQVYTLPSREMTKNQVSLTCLVKGFY
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 19)

10
15 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-MM-LL-hFc1 (Fc IgG1 humana, Met351Leu/Met358Leu), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 35), la porción de polipéptido de IgGFc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 3), la mutación Met351Leu está sombreada en negro, y la mutación Met358Leu está sombreada en gris.

AAT-MM-LL-hFc1(Fc IgG1 humana, Met351Leu/Met358Leu)

EDPQGDAAQKTDTSSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRRTLNQPDSQLQLTGNGLFLSE
GLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFA
LVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY

LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQ
LGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGALFLEAIPLSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:36)

5 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-MM:LL-hFc2(Fc IgG2 humana, Met351Leu/Met358Leu), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 35), la porción de polipéptido de IgGFc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 4), la mutación Met351Leu está sombreada en negro, y la mutación Met358Leu está sombreada en gris.

10 AAT-MM:LL-hFc2(Fc IgG2 humana, Met351Leu/Met358Leu)

EDPQGDAAQKTDTSSHHDQDHPTFNKITPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRRTLNQPDSQLQLTGNGLFLSE
GLKLVDKFLEDVKKLYHSEAFTVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFA
LVNYIFFKGKWERPFEVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQ
LGITKVFSNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGALFLEAIPLSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVNPTQKERKCCVECPPCPAPPVAGPSVLFPPKPKDTLM
ISRTPEVTCVVDVSHEDPEVQFNWVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTFRVVSVLTVVHQDW
LNGKEYKCKVSNKLPAIEKTISKTKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYP
SDIAVEWESNGQPENNYKTTPPMLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQGNVFSCSVMHEALHNH
YTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:20)

15 Una proteína de fusión AAT-Fc de ejemplo es la AAT-hFc1-AAT (human IgG1), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), la porción de polipéptido de IgG-Fc de la proteína de fusión está en cursiva (SEQ ID NO: 3).

AAT-hFc1-AAT (IgG1 humana)

EDPQGDAAQKTDTSHHDDHPTFNKI TPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNLQNPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDVFVA
LVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQ
LGITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSP LFMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPVETCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQOGNVSFCSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKASTGSEDPQGDAAQKTDTSHHDDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQ
LAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLR
TLNLQNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVFGDTEEAKKQINDYVE
KGTQGKIVDLVKELDRDVFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRL
LGMFNIQHCKKLSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLLENELTHDIIITKFLNEDRRSA
SLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGT
EAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSP LFMGKVVNPTQK (SEQ ID
NO:21)

Estas proteínas de fusión AAT-Fc de ejemplo se hicieron utilizando las siguientes técnicas.

- 5 El gen que codifica AAT humano se amplificó por PCR a partir de ADNc de hígado humano (Zyagen). Se generaron mutaciones puntuales específicas dentro del gen que codifica AAT o la región Fc mediante la superposición de PCR. El gen que codifica AAT se clonó en cuadro con un gen que codifica la región bisagra, seguido de un dominio CH2 y un dominio CH3 de IgG1, IgG2, IgG3, IgG4 o IgM humana en un vector de expresión de mamífero, que contiene una secuencia de señal de secreción de mamífero en dirección ascendente del sitio de inserción del gen AAT. Estos
- 10 vectores de expresión se transfectaron en células de mamífero (específicamente células HEK293 o CHO) y se cultivaron durante varios días en CO₂ al 8% a 37°C. Las proteínas de fusión AAT-Fc recombinantes se purificaron del sobrenadante de la célula de expresión mediante cromatografía de proteína A. Es importante destacar que se utilizó un tampón de pH casi neutro (Gentle Ag/Ab Elution Buffer, Thermo Scientific) para eluir la proteína de fusión AAT-Fc de la resina de proteína A. La proteína de fusión AAT-Fc no se puede eluir de la resina de proteína A
- 15 utilizando una elución estándar de pH bajo, ya que la capacidad de AAT para inhibir NE está comprometida después del tratamiento con pH bajo, probablemente debido a una oligomerización de AAT mediada por pH bajo. La Figura 1F muestra los efectos de la elución de pH bajo sobre la capacidad de AAT para inhibir la elastasa de neutrófilos. La proteína de fusión AAT-Fc se puede purificar mediante la proteína A y un tampón de elución de pH casi neutro, mediante la matriz de afinidad CaptureSelect® Alpha-1 Antitrypsin (BAC BV).
- 20 Se probó la actividad de las proteínas de fusión AAT-Fc purificadas al determinar su capacidad para inhibir la elastasa de neutrófilos (NE). La Figura 1B y 1D muestran un gel reductor SDS-PAGE de proteínas de fusión AAT (sdAAT) y AAT-Fc derivadas de suero purificadas (Figura 1B- columna 1: sdAAT, columna 2: AAT-Fc (SEQ ID NO: 16), columna 3: AAT-EL-Fc (SEQ ID NO: 18), Figura 1D AAT-Fc-AAT (SEQ ID NO: 20). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de coomassie.
- 25

30 Para monitorizar la actividad de la elastasa de neutrófilos (NE) humana se utilizó un ensayo de microplaca fluorescente. La actividad inhibitoria se midió mediante una disminución concomitante en la actividad residual de NE utilizando el siguiente ensayo. Este tampón de ensayo se compone de Tris 100 mM pH 7.4, NaCl 500 mM y Triton X-100 al 0.0005%. El NE humano se utiliza a una concentración final de 5 nM (pero también se puede utilizar de 1-20 nM). El sustrato peptídico fluorescente AAVP-AMC se utiliza a una concentración final de 100 µM en el ensayo. El lector de placas Gemini EM de Molecular Devices se utiliza para leer la cinética del ensayo utilizando longitudes de onda de excitación y emisión de 370 nm y 440 nm respectivamente, y un límite de 420 nm. El ensayo se lee durante

10 minutos a temperatura ambiente escaneando cada 5 a 10 segundos. El Vmax por segundo corresponde a la actividad residual de NE, que se representa para cada concentración de inhibidor. La intersección con el eje x indica la concentración de inhibidor necesaria para inactivar completamente la concentración inicial de NE en el ensayo. Se utilizó AAT derivada de suero humano (sdAAT) como control positivo en estos ensayos. Las proteínas de fusión AAT-Fc muestran una potente actividad inhibitoria de NE como se muestra en la Figura 1C. La fusión en la que hay dos polipéptidos AAT fusionados con un polipéptido Fc único (AAT-Fc-AAT) muestra una potencia mejorada tanto sobre sdAAT como sobre la proteína de fusión AAT-Fc que comprende un único polipéptido de AAT (Figura 1E). Estos hallazgos presentados aquí demuestran por primera vez que la AAT se puede fusionar a una región Fc y mantener su capacidad para inhibir la NE. De particular interés, se encontró que la proteína de fusión AAT-Fc-AAT era un inhibidor de NE más potente.

La Figura 1F demuestra la resistencia de la proteína de fusión AAT-EL-Fc (M35 IE, M358L) a la inactivación por oxidación. Las proteínas de fusión AAT, AAT-Fc (wt), AAT-EL-Fc (M351E, M358L) y AAT-EM-Fc (M351E), se trataron con H₂O₂ 33 mM y se compararon con las proteínas de fusión no tratadas en los ensayos de inhibición de NE. La inhibición de NE por AAT-EL-Fc no estaba comprendida por la oxidación, contrario a las otras proteínas probadas.

Adicionalmente, la proteína de fusión AAT-Fc mostró una semivida en suero más larga en ratas en comparación con AAT derivada de suero (Figura 1H). En estos estudios se inyectaron 3 ratas por cada proteína de prueba I.V. con 10 mg/kg de sdAAT o AAT-Fc. Se tomaron muestras de suero en varios momentos durante un período de 48. La concentración de ATT en suero fue utilizando un ELISA. Estos hallazgos demuestran que las proteínas de fusión de la invención tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas y son un formato terapéutico superior a la AAT derivada del suero, para tratar numerosas afecciones inflamatorias humanas y enfermedades infecciosas.

Ejemplo 2: Proteínas de fusión de la molécula dirigida a AAT-TNF α

Los estudios presentados en el presente documento describen varios ejemplos no limitativos de derivados de AAT recombinantes que comprenden AAT humana fusionada a un anticuerpo anti-TNF α o un derivado de un receptor de TNF α . Estos ejemplos se proporcionan a continuación para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran una metodología útil para practicar la invención. Estos ejemplos no limitan ni pretenden limitar la invención reivindicada.

Las proteínas de fusión a continuación incluyen secuencias de polipéptidos dirigidos a citoquinas que son o se derivan de (i) el anticuerpo anti-TNF α D2E7 (también conocido como Adalimumab o Humira®), o (ii) el dominio extracelular del Receptor TNF α Tipo 2 (TNFR2-ECD). La porción del polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada, las regiones constantes de anticuerpo (CH1-bisagra-CH2-CH3 o CL) están en cursiva, y D2E7-VH, D2E7-VK y TNFR2-ECD se indican en negrita. Si bien estos ejemplos incluyen una secuencia bisagra y/o una secuencia ligadora, las proteínas de fusión de la invención se pueden preparar utilizando cualquier secuencia bisagra y/o una secuencia ligadora adecuada en longitud y/o flexibilidad. Alternativamente, las proteínas de fusión se pueden preparar sin utilizar una secuencia bisagra y/o ligadora.

Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de D2E7-Cadena ligera-AAT (G₃S)₂, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), D2E7-VK se denota en negrita (SEQ ID NO: 37), y las regiones constantes de anticuerpo están en cursiva (SEQ ID NO: 38)

Ligador de D2E7-Cadena ligera-AAT (G₃S)₂

DIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQGIRNYLAWYQQKPGKAPKLLIYAASTLQSGVPSR
FSGSGSGTDFTLT*ISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK**RTVAAPSVFIFPPSD*
*EQLKSGTASVVCLLN**NFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK**DSTYLSLSTLTLSK*
*ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSGGGSEDPQGDA*QKTD*TSHHDQD*HPT
FNKITPNLA*EFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKAD*THDEILEGLN*FN*
LTEIPEAQIHEGFQ*ELLRTL*NQPD*SQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVK*KLYHSEAFT
VNFGDTEEAKKQ*INDYVEKGTQ*GKIVDLVKELDRD*TVFALVNYIFFK*GKWERPFEVKDTEE
EDFHVDQVTTVKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLQHLENE
LTHDIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFSNGADLSGVTEEEAPL

KLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKV
VNPTQK (SEQ ID NO:22)

5 Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de D2E7-Cadena ligera-AAT ASTGS, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), D2E7-VK se denota en negrita (SEQ ID NO: 37), y las regiones constantes de anticuerpo están en negrita (SEQ ID NO: 38)

Ligador de D2E7-Cadena ligera-AAT ASTGS

DIQMTQSPSSLSASVGRVITITCRASQGI RNYLAWYQOKPGKAPKLLIYAAS TLQSGVPSR
FSGSGSGTDFLTITISSLQPEDVATYYCQRYNRAPYTFGQGTKVEIK*RTVAAPS VFI FPPSD*
EQLKSGTASV VCLLN FYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSL SSTLTLSK
*ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*ASTGSEDPQGDAAQKTDTSHHDDQDHPTFNK
 ITPNLAEF AFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTE
 IPEAQIHEGFQELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAF TVNF
 GDTEEAKQINDYVEKGTQ GKIVDLVKELDRDRTVFALVNYIFFKGKWERPF EVKDTEEEDF
 HVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKYLG NATAIFFLPDEGKLQHLENELTH
 DIITKFL ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLS
 KAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKV VNP
 TQK

10

15 Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de D2E7-Cadena Pesada-AAT (G₃S)₂, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), D2E7-VH se denota en negrita (SEQ ID NO: 39), y las regiones constantes de anticuerpo están en negrita (SEQ ID NO: 40)

Ligador de D2E7-Cadena Pesada-AAT (G₃S)₂

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLS CAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSAITWNSGHIDYA
DSVEGRFTISRDNKNSLYLQMN SLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGT LVTVSSA
STKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
YSLSSVTV PSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
VVSVLT VLVHQLD WLNQKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ

VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGSEDPQGDAQAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPN
LAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEA
QIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTE
EAKKQINDYVEKGTQGGKIVDLVKELDRDVFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEDDFHVDQ
VTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLOHLENELTHDIIIT
KFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLKSKAVH
KAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
 (SEQ ID NO:24)

5 Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de D2E7-Cadena Pesada-AAT ASTGS, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), D2E7-VH se denota en negrita (SEQ ID NO: 39), y las regiones constantes de anticuerpo están en negrita (SEQ ID NO: 40)

Ligador de D2E7-Cadena Pesada-AAT ASTGS

EVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFDDYAMHWVRQAPGKGLEWVSATWNSGHIDYA
DSVEGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCAKVSYLSTASSLDYWGQGTLVTVSSA
 STKGPSVFPPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL
 YLSLVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
 FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI SKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLSDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASTGSEDPQGDAQAQKTDTSHHDDQDHPTFNKITPNLAE
FAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIH
EGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAK
KQINDYVEKGTQGGKIVDLVKELDRDVFALVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEDDFHVDQVTT
VKVPMMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKLOHLENELTHDIIITKFL
ENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGQLGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLKSKAVHKAV
LTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSPLFMGKVVNPTQK
 (SEQ ID NO:25)

10
 15 Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de TNFR2-ECD-Fc1-AAT(G₃S)₂, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), TNFR2-ECD se denota en negrita (SEQ ID NO: 41), y las regiones constantes de anticuerpo están en negrita (SEQ ID NO: 42)

Ligador de TNFR2-ECD-Fc1-AAT(G₃S)₂

LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTY
TQLWNVWPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKEGECRLCAPLRKCR
PGFGVARPGTETSDDVCKPCAPGTFSNNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSP
TRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPPPAEGSTGDEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPQVKFNWYVDGVQVH
NAKTKPREQQYNSTYRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGSGGGSEDPQGDAAQKTDI
SHHDQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHD
EILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVK
KLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVNYIFFKWKWER
PFEVKDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDE
GKLQHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTIDLKSVLGQLGITKVFVSNADL
SGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNT
KSPLFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:26)

5 Una proteína de fusión AAT-TNF α de ejemplo es el Ligador de TNFR2-ECD-Fc1-AAT ASTGS, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), TNFR2-ECD se denota en negrita (SEQ ID NO: 41), y las regiones constantes de anticuerpo están en negrita (SEQ ID NO: 42)

Ligador de TNFR2-ECD-Fc1-AAT ASTGS

10 **LPAQVAFTPYAPEPGSTCRLREYYDQTAQMCCSKCSPGQHAKVFCTKTSDTVCDSCEDSTY**
TQLWNVWPECLSCGSRCSDDQVETQACTREQNRICTCRPGWYCALSKEGECRLCAPLRKCR
PGFGVARPGTETSDDVCKPCAPGTFSNNTSSTDICRPHQICNVVAIPGNASMDAVCTSTSP
TRSMAPGAVHLPQPVSTRSQHTQPTPEPSTAPSTSFLLPMGPPPAEGSTGDEPKSCDKTH
TCPPCPAPELLGGPSVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPQVKFNWYVDGVQVH
NAKTKPREQQYNSTYRVVSVLTVLHQNWLDGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLY
SKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKASTGSEDPQGDAAQKTDITSHH
DQDHPTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAFAMLSLGTKADTHDEIL
EGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSEGLKLVDFLEDVKKLY
HSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDRTVFALVNYIFFKWKWERPFE
VKDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSSWVLLMKYLGNATAIFFLPDEGKL
QHLENELTHDIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTIDLKSVLGQLGITKVFVSNADLSGV
TEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTEAAGAMFLEAIPMSIPPEVKFNKPFVFLMIEQNTKSP
LFMGKVVNPTQK (SEQ ID NO:27)

Estos ejemplos de proteínas de fusión de molécula dirigida a AAT-TNF α se hicieron utilizando las siguientes técnicas.

Los genes que codifican las regiones variable pesada (VH) y variable kappa (VK) del anticuerpo anti-TNF α , D2E7, se generaron por síntesis génica. El gen D2E7-VH se clonó en el marco con un gen que codifica una región constante de la cadena pesada del anticuerpo IgG1 humano, que consiste en un dominio CH1, un dominio bisagra, un dominio CH2 y un dominio CH3, en un vector de expresión de mamífero que contiene una secuencia de señal de secreción de mamífero en dirección ascendente del sitio de inserción del dominio VH (D2E7-HC). El gen D2E7-VK se clonó en marco con un dominio constante de cadena ligera (CL) de anticuerpo humano kappa, en un vector de expresión de mamífero, que contiene una secuencia de señal de secreción de mamífero en dirección ascendente del sitio de inserción del dominio VK (D2E7-LC). El gen que codifica AAT y la secuencia ligadora 5' adyacente se clonaron en el marco en el extremo 3' de cualquiera, el dominio CH3 del gen de la cadena pesada D2E7 (D2E7-HC-AAT) o el dominio CL del gen de la cadena ligera D2E7 (D2E7-LC-AAT) que codifica secuencias en los vectores de expresión de mamíferos descritos anteriormente. El dominio extracelular del Receptor 2 de TNF α (TNFR2-ECD) se generó mediante síntesis génica y se clonó en un marco con un gen que codifica la región bisagra, seguido de un dominio CH2 y un dominio CH3 de IgG1 humana (hFc1) en una expresión de mamífero, que contiene una secuencia de señal de secreción de mamífero en dirección ascendente del sitio de inserción TNFR2-ECD. El gen que codifica AAT y la secuencia ligadora 5' adyacente se clonaron en marco en el extremo 3' del gen que codifica TNFR2-ECD-hFc1 en un vector de expresión de mamífero (TNFR2-ECD-hFc1-AAT).

El vector de expresión D2E7-HC-AAT se cotransfectó con el vector de expresión D2E7-LC o D2E7-LC-AAT en células de mamífero (específicamente células HEK293 o CHO) para generar el anticuerpo D2E7 con AAT fusionado al C-terminal de la cadena pesada o al terminal C tanto de la cadena pesada como de la cadena ligera, respectivamente. El D2E7-LC-AAT se cotransfectó con el vector de expresión D2E7-HC en células de mamífero para generar el anticuerpo D2E7 con AAT fusionado al C-terminal de la cadena ligera. El vector de expresión TNFR2-hFc1-AAT se transfectó en células de mamífero. Las células transfectadas se cultivaron durante varios días en CO₂ al 8% a 37°C.

Las proteínas de fusión dirigidas a AAT-TNF α recombinantes se purificaron del sobrenadante de células de expresión mediante cromatografía de proteína A. Se utilizó un tampón de pH casi neutro (Gentle Ag/Ab Elution Buffer, Thermo Scientific) para eluir las proteínas de fusión dirigidas a AAT-TNF α de la resina de proteína A.

La Figura 2B muestra un gel SDS-PAGE del anticuerpo D2E7 solo (columna 1) y una variante en la que AAT se fusiona con la cadena pesada de D2E7 (columna 2). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de coomassie.

Se probó la actividad de las proteínas de fusión de la molécula dirigida a AAT-TNF α purificada al determinar su capacidad para inhibir la elastasa de neutrófilos. Se utilizó AAT derivada de suero humano (sdAAT) como control positivo en estos ensayos. El ensayo inhibitorio de NE se realizó como se describió anteriormente. La Figura 2C se demuestra en relación con sdAAT, la proteína de fusión de la molécula dirigida a AAT-TNF α muestra una inhibición similar de la elastasa de neutrófilos, lo que indica que la capacidad inhibitoria de AAT no se ha visto comprometida por su fusión a un anticuerpo.

Ejemplo 3 AAT-Fc-SLPI y AAT-Fc-Elafina

Los estudios presentados en el presente documento describen varios ejemplos no limitativos de derivados de AAT recombinantes que comprenden AAT humano fusionados con una proteína que contiene un dominio WAP. Estos ejemplos se proporcionan a continuación para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran una metodología útil para practicar la invención. La porción del polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada, la porción Fc está en cursiva y el polipéptido que contiene el dominio WAP está en negrita. Si bien estos ejemplos incluyen una secuencia bisagra y/o una secuencia ligadora, las proteínas de fusión de la invención se pueden elaborar utilizando cualquier secuencia bisagra y/o una secuencia ligadora adecuada en longitud y/o flexibilidad. Alternativamente, las proteínas de fusión se pueden preparar sin utilizar una secuencia bisagra y/o ligadora. Por ejemplo, los componentes del polipéptido se pueden unir directamente.

Una proteína de fusión AAT-Fc-SLPI de ejemplo es AAT-hFc1-SLPI (Fc IgG1 humana), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), la porción Fc está en cursiva (SEQ ID NO: 3), y el polipéptido que contiene dominio WAP está en negrita (SEQ ID NO: 9)

AAT-hFc1-SLPI (Fc IgG1 humana)

EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKIIPNLAFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELEDRDVFVA
LVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPLDEGKLQHLLENELTHDIIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGG
LGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLKSAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKASTGSSGKSFKAGVCPKPKSAQCLRYKKEPCQSDWQCPGKKRCCP
DTCGIKCLDPVDTNPTRRKPGKCPVTYGQCLMLNPNPFCMDGQCKRDLKCCMGKSC
VSPVKA (SEQ ID NO:28)

5 Una proteína de fusión AAT-Fc-SLPI de ejemplo es AAT-hFc1-SLPI (Fc IgG1 humana), descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), la porción Fc está en cursiva (SEQ ID NO: 3), y el polipéptido que contiene dominio WAP está en negrita (SEQ ID NO: 12)

AAT-hFc1-Elafina (Fc IgG1 humana)

10 EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKIIPNLAFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETIPEAQIHEGFQELLRTLNLQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELEDRDVFVA
LVNYIFFKKGWERPFVVKDTEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPLDEGKLQHLLENELTHDIIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGG
LGITKVFVSNADLSGVTEEAPLKLKSAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQKEPKSCDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPK
DTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL
HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK
GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEA
LHNHYTQKSLSLSPGKASTGSAVTGVPVKGQDTPVKGRVPFNGQDPVKGQVSVKGQDKVKAQ
EPVKGVPVSTKPGSCPIILIRCAMLNPPNRLKDTDCPGIKKCEGSCGMACFVPQ (SEQ
 ID NO:29)

15 Los genes que codifican el SLPI y Elafina fueron amplificados por PCR a partir de ADNc de bazo humano (Zyagen). Estos genes se clonaron en los vectores de expresión de mamíferos del ejemplo 1, en el que el gen SLPI o Elafina se insertó en el marco con el gen AAT-Fc. Estos vectores de expresión se transfectoron en células de mamífero (específicamente células HEK293 o CHO) y se cultivaron durante varios días en CO₂ al 8% a 37°C. Las proteínas de fusión del dominio AAT-Fc- WAP recombinante se purificaron del sobrenadante de la célula de expresión mediante cromatografía de proteína A. Se utilizó un tampón de pH casi neutro (Gentle Ag/Ab Elution Buffer, Thermo Scientific) para eluir la proteína de fusión del dominio AAT-Fc- WAP de la resina de proteína A.

20 La Figura 3B muestra un gel SDS-PAGE de las proteínas de fusión AAT-Fc- WAP (columna 1 AAT-Fc-Elafina, columna 2 AAT-Fc-SLPI). Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de coomassie. Las proteínas de

fusión del dominio AAT-Fc-WAP purificadas se analizaron para determinar su actividad determinando su capacidad para inhibir la elastasa de neutrófilos. Los ensayos inhibitorios de NE se realizaron como se describe anteriormente. La AAT derivada de suero humano (sdAAT) y la proteína de fusión AAT-Fc se utilizaron como control positivo en estos ensayos. En relación con sdAAT, las proteínas de fusión de la molécula dirigida a AAT-Fc-WAP muestran una potencia mejorada de la inhibición de NE de la elastasa de neutrófilos (Figura 3C).

Ejemplo 4 AAT-Albúmina

Los estudios presentados en el presente documento describen varios ejemplos no limitantes de derivados de AAT recombinante que comprenden AAT humana fusionada con un polipéptido de albúmina. Estos ejemplos se proporcionan a continuación para ilustrar adicionalmente diferentes características de la presente invención. Los ejemplos también ilustran una metodología útil para practicar la invención. Estos ejemplos no limitan ni pretenden limitar la invención reivindicada. La porción de AAT está subrayada y la porción de albúmina está en cursiva. Por ejemplo, los componentes del polipéptido se pueden unir directamente.

Una proteína de fusión AAT-Albúmina de ejemplo es AAT-HSA, descrita en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), y el polipéptido de albúmina está en cursiva (SEQ ID NO: 14)

AAT-HSA

EDPQGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKI TPNLAEFAFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEIILEGLNFNLTEIPEAQIHEGFQELLRTL NQPDSQLQLTTGNGLFLSE
GLKLVDFKLEDVKKLYHSEAF TVNFGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDITVFA
LVNYIFFKKGWERPFVEVKDTEEEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIIITKFLNEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGG
LGITKVF SNGADLSGVTEEAPLKL SKAVHKAVLT IDEKGT EAGAMFLEAIPMSIPPEVKE
NKPFVFLMIEQNTKSP LFMGKVVNPTQKASTGS DAHKSEVAHRFKDLGEENFKALVLI AFA
QYLQQCPFEDHVKLVNEVTEFAKTCVADESAENC DKSLHTLFGDKLCTVATLRETYGEMAD
CCAQEPERNECFLQHKDDNPNL PRLVRPEVDVMCTAFHDNEETFLKKYLYE IARRHPYFY
APELLFFAKRYKAAFT ECCCQAADKAA CLLPKLDEL RDEGKASSAKQRLK CASLQKFG ERAF
KAWAVARLSQRFPKAEFAEVSKLVTDLTKVHTECCHGDLLECADDRADLAKY ICENQDSIS
SKLKECCEKPLLEKSHCIAEVENDEMPADLPSLAADFVESKDVCKNYAEAKDVFLGMFLYE
YARRHPDYSVLLLLRLAKTYETTLEKCCAAADPHECYAKVFDEFKPLVEEPQNLIKQNC EL
FEQLGEYKFQNALLVRYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMP CAEDYLSV
VLNQLCVLHEKTPVSDRVT KCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTL
SEKERQIKKQTALVELVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFAEEGKKLVA
ASQAALGL (SEQ ID NO:30)

Una proteína de fusión AAT-Albúmina de ejemplo es el dominio 3 de AAT-HSA, descrito en este documento. Como se muestra a continuación, la porción de polipéptido de AAT de la proteína de fusión está subrayada (SEQ ID NO: 2), y el polipéptido de albúmina está en cursiva (SEQ ID NO: 15)

Dominio 3 de AAT-HSA

EDPOGDAAQKTDTSHHQDHPFTFNKITPNLAEFASFSLYRQLAHQSNSTNIFFSPVSIATAF
AMLSLGTKADTHDEILEGLNFNLTETPEAQIHEGFQELLRTLNPDSQLQLTTGNGLFLSE

GLKLVDFKLEDVKKLYHSEAFVNFVGDTEEAKKQINDYVEKGTQGKIVDLVKELDRDITVFA
LVNYIFFKKGWERPFVVDTEEDFHVDQVTTVKVPMKRLGMFNIQHCKKLSVWVLLMKY
LGNATAIFFLPDEGKLQHLENELTHDIIITKFLENEDRRSASLHLPKLSITGTYDLKSVLGO
LGITKVF SNGADLSGVTEEAPLKLSKAVHKAVLTIDEKGTAAAGAMFLEAIPMSIPPEVKF
NKPFVFLMIEQNTKSPFLMGKVVNPTQKASTGSEEPQNLIKQNCLEFELGQYKFNALLV
RYTKKVPQVSTPTLVEVSRNLGKVGSKCKHPEAKRMPCAEDYLSVVLNQLCVLHEKTPVS
DRVTKCCTESLVNRRPCFSALEVDETYVPKEFNAETFTFHADICTLSEKERQIKKQTALVE
LVKHKPKATKEQLKAVMDDFAAFVEKCKADDKETCFEEGKLLVA (SEQ ID NO:31)

5 El gen que codifica la albúmina de suero humano (HSA) se amplificó por PCR a partir de ADNc de hígado humano (Zyagen). Se generó un vector de expresión de mamífero, en el que el gen que codifica HSA o el dominio 3 de HSA, se clonó en marco al extremo 3' del gen que codifica AAT, que contiene una secuencia de señal de secreción de mamífero en dirección ascendente de AAT.

10 Estos vectores de expresión se transfectaron en células de mamífero (específicamente células HEK293 o CHO) y se cultivaron durante varios días en CO₂ al 8% a 37°C. Las proteínas de fusión AAT-HSA recombinantes se purificaron del sobrenadante de la célula de expresión utilizando Matriz de afinidad CaptureSelect® Alpha-1-Antitrypsin (BAC BV), en la que el tampón de unión consistía en Tris 20 mM, NaCl 150 mM, pH 7.4 y el tampón de elución consistía en Tris 20 mM, MgCl₂ 2 M pH 7.4.

15 La Figura 4B muestra un gel SDS-PAGE de la proteína de fusión AAT-HSA. Las proteínas se visualizaron mediante tinción con azul de coomassie. Las proteínas de fusión AAT-HSA purificadas se probaron para determinar su actividad al determinar su capacidad para inhibir la elastasa de neutrófilos. Los ensayos inhibitorios de NE se realizaron como se describió anteriormente. Se utilizó AAT derivada de suero humano (sdAAT) como control positivo en estos ensayos. En relación con sdAAT, la proteína de fusión AAT-HS muestra una potencia similar de inhibición de NE, lo que demuestra que la fusión a albúmina no disminuye la capacidad de AAT para inhibir NE (Figura 4C).

20

REIVINDICACIONES

1. Una proteína de fusión aislada que comprende al menos un polipéptido de alfa-1 antitripsina humana (AAT) que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO:1, SEQ ID NO: 2, SEQ ID NO: 32, y SEQ ID NO: 33, en la que el polipéptido de AAT se une de forma operable a un polipéptido Fc de inmunoglobulina, en el que la proteína de fusión aislada exhibe actividad inhibidora de la serina proteasa y es para uso en un método para tratar una enfermedad o trastorno en un sujeto seleccionado de deficiencia de AAT, enfisema, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), síndrome de dificultad respiratoria aguda (ARDS), asma alérgica, fibrosis quística, cánceres de pulmón, isquemia- lesión por reperfusión, isquemia/lesión por reperfusión después de trasplante cardíaco, infarto de miocardio, artritis reumatoide, artritis séptica, artritis psoriásica, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, psoriasis, diabetes tipo I y/o tipo II, neumonía, septicemia, enfermedad de injerto contra anfitrión (GVHD), cicatrización de herida, lupus eritematoso sistémico, y esclerosis múltiple.
2. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que la enfermedad o trastorno es deficiencia de AAT.
3. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que la enfermedad o trastorno es fibrosis quística, ARDS, enfisema inducido por fumar o COPD.
4. La proteína de fusión aislada para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que el sujeto es humano.
5. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido Fc de inmunoglobulina comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
6. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de AAT y el polipéptido Fc de inmunoglobulina se une de forma operable a través de una región bisagra, una región ligadora, o ambas una región bisagra y región ligadora, opcionalmente en la que la región bisagra, la región ligadora o ambas la región bisagra y la región ligadora comprenden una secuencia de péptidos.
7. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de AAT humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1, en la que el polipéptido se une de forma operable a un polipéptido Fc de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
8. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de AAT humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:2, en la que el polipéptido se une a un polipéptido Fc de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
9. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de AAT humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 32, en la que el polipéptido se une a un polipéptido Fc de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
10. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que el polipéptido de AAT humano comprende la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 33, en la que el polipéptido se une a un polipéptido Fc de inmunoglobulina que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos 98% idéntica a la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO: 6.
11. La proteína de fusión aislada para el uso de la reivindicación 1, en la que la proteína de fusión comprende adicionalmente una secuencia de polipéptidos que contienen dominio WAP, opcionalmente en la que:
- a. la secuencia de polipéptidos que contienen dominio WAP comprende una secuencia de polipéptidos de SLPI que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 10, 9 y 8; o
- b. la secuencia de polipéptidos que contienen dominio WAP comprende una secuencia de polipéptidos de elafina que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de la SEQ ID NO: 13, 12 y 11.
12. La proteína de fusión aislada para el uso de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que:
- a. el polipéptido Fc de inmunoglobulina se modifica para mejorar la unión de FcRn;

b. el polipéptido Fc de inmunoglobulina comprende al menos una de las siguientes mutaciones: Met252Tyr, Ser254Thr, Thr256Glu, Met428Leu o Asn434Ser.

FIGURA 1A

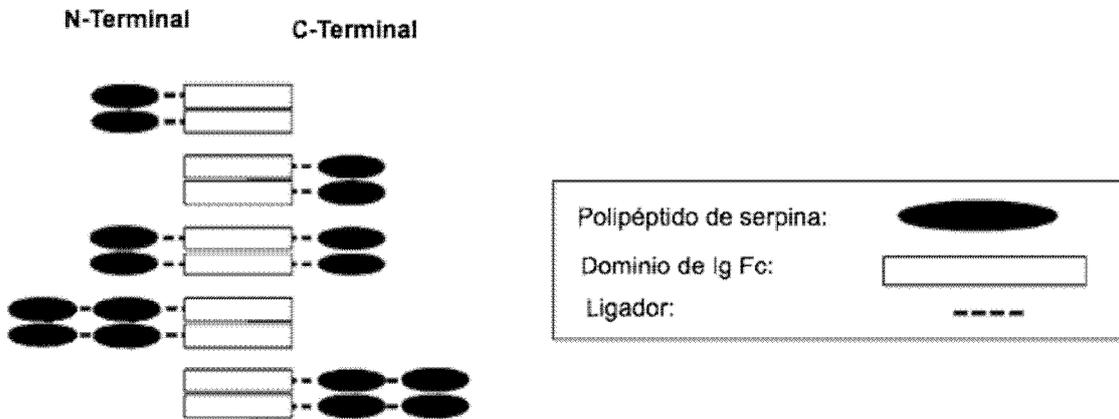


FIGURA B

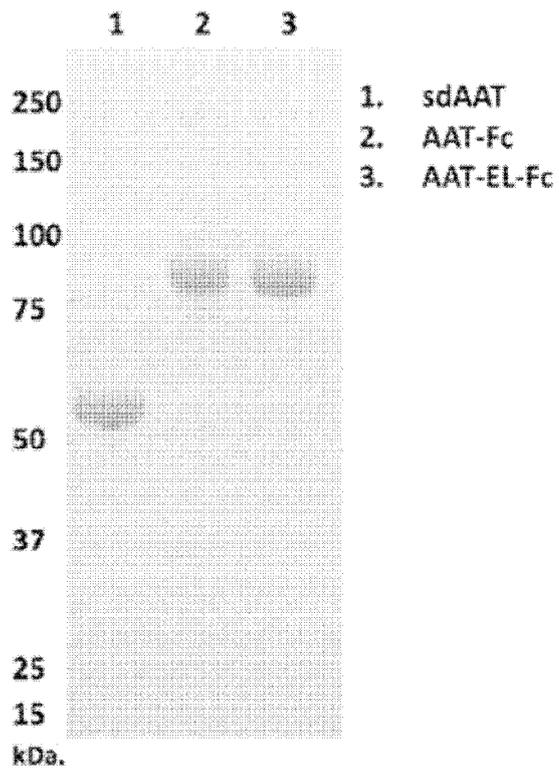


FIGURA 1C

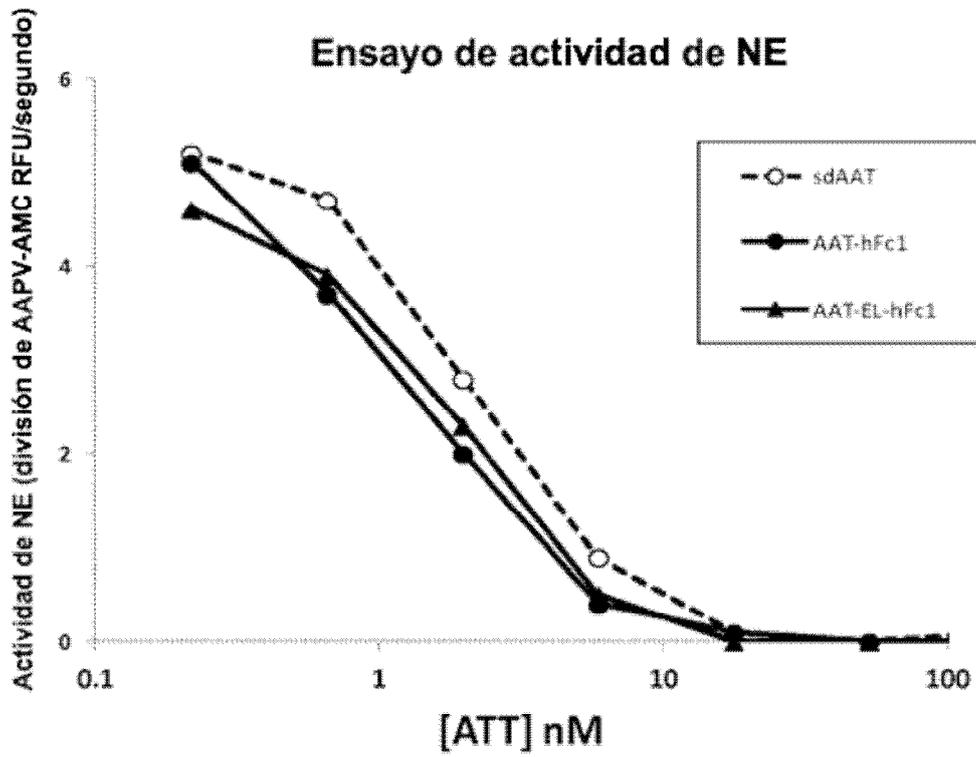


FIGURA 1D

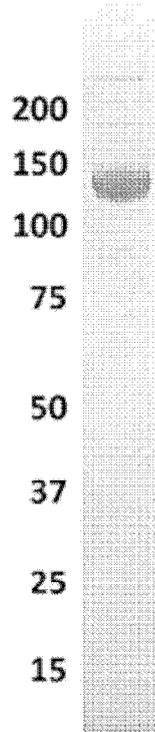


FIGURA 1E

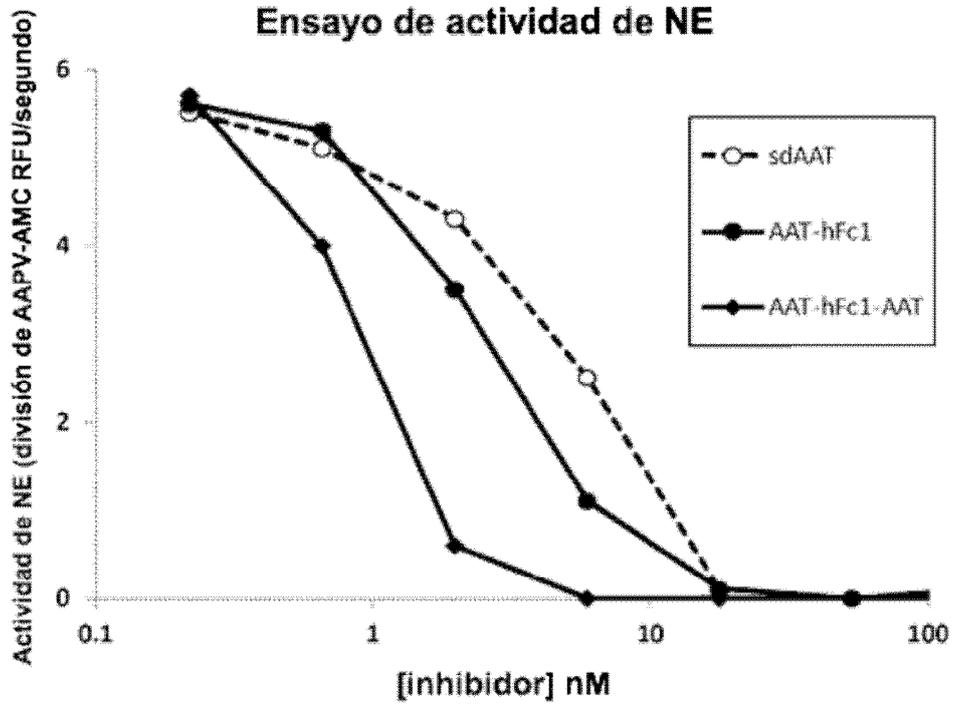


FIGURA 1F

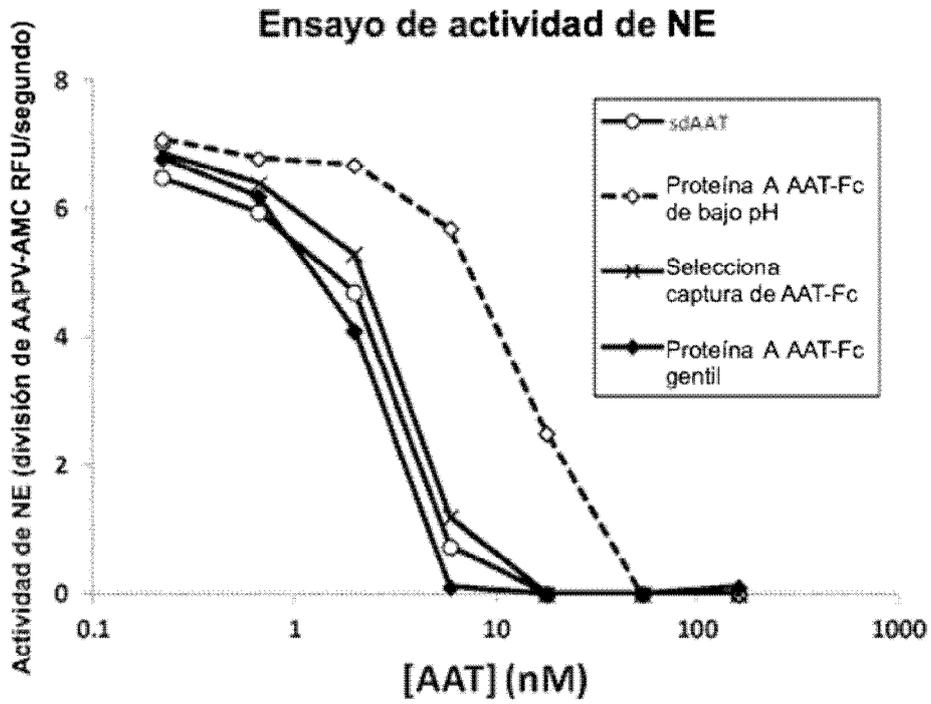


FIGURA 1G

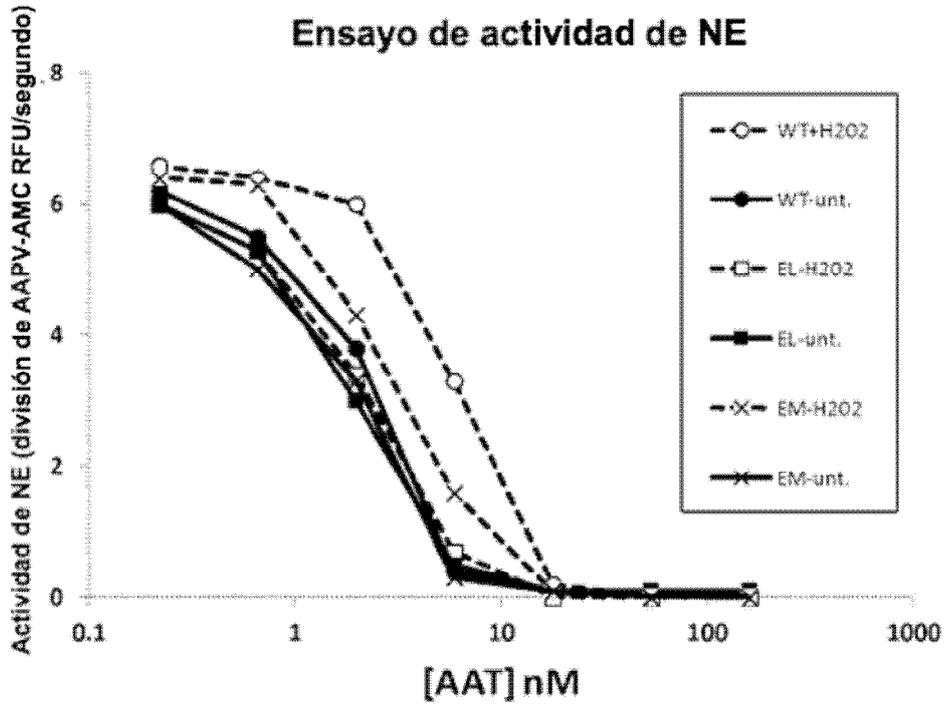


FIGURA 1H

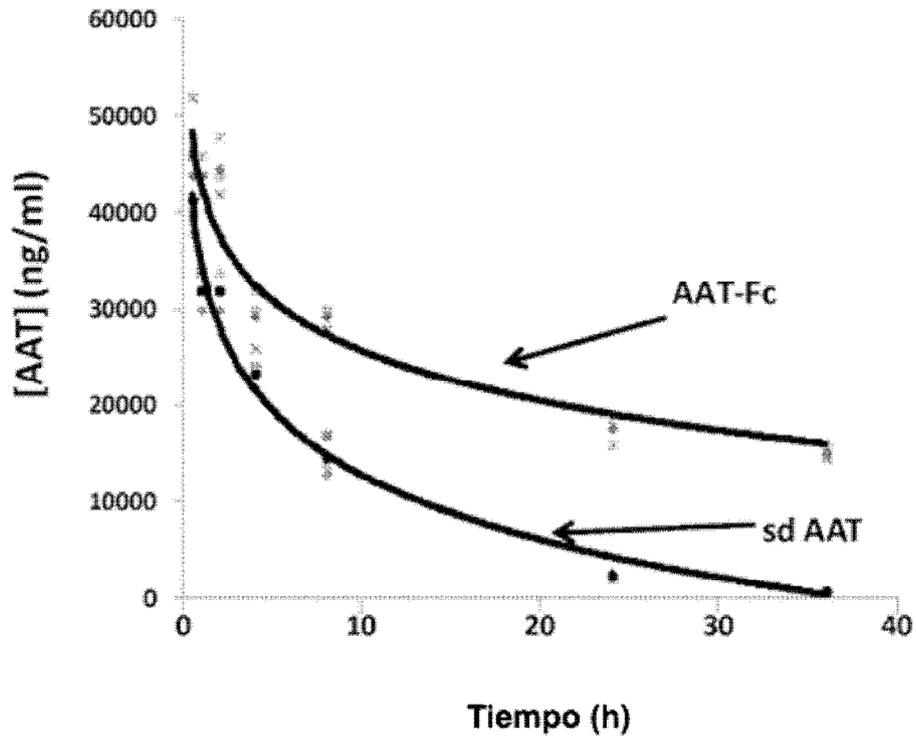


FIGURA 2A

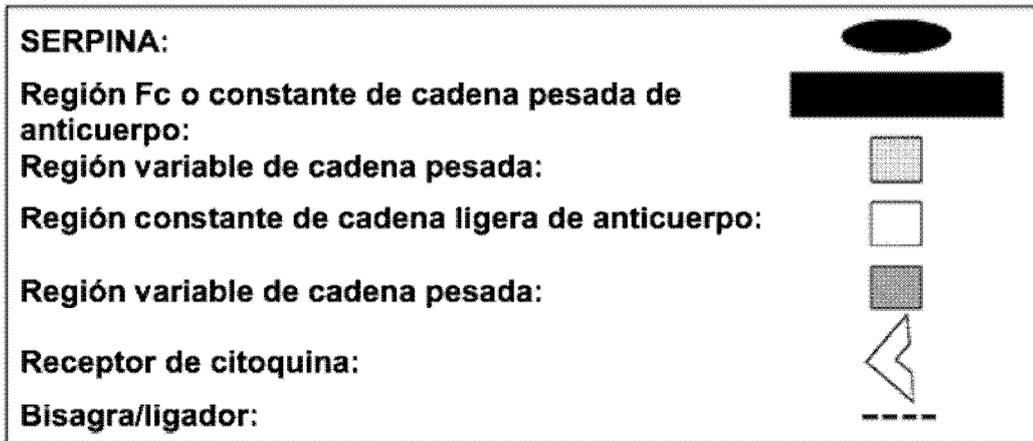
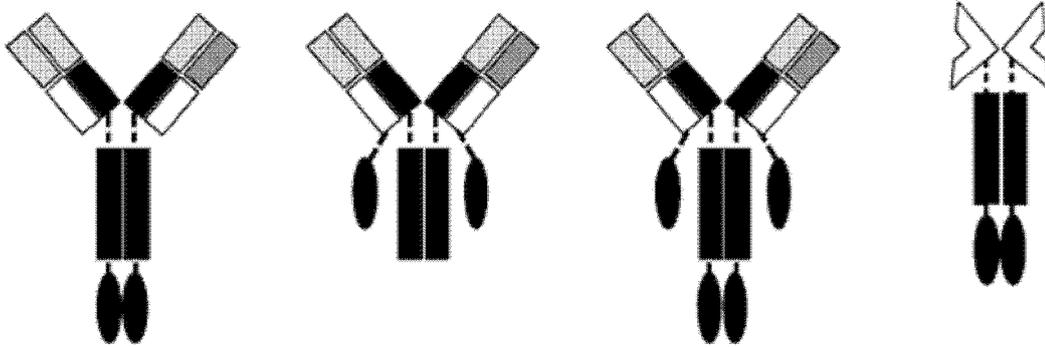


FIGURA 2B

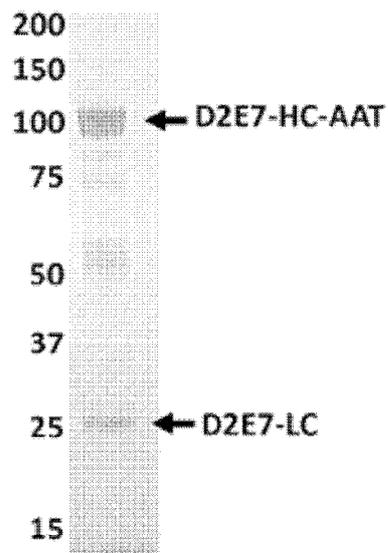


FIGURA 2C

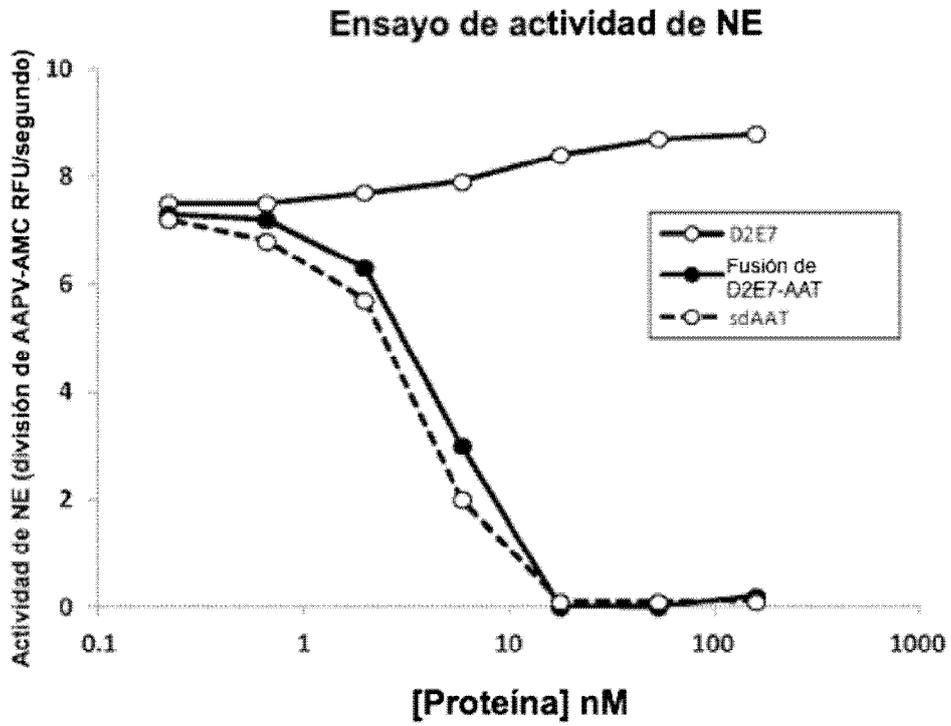


FIGURA 3A

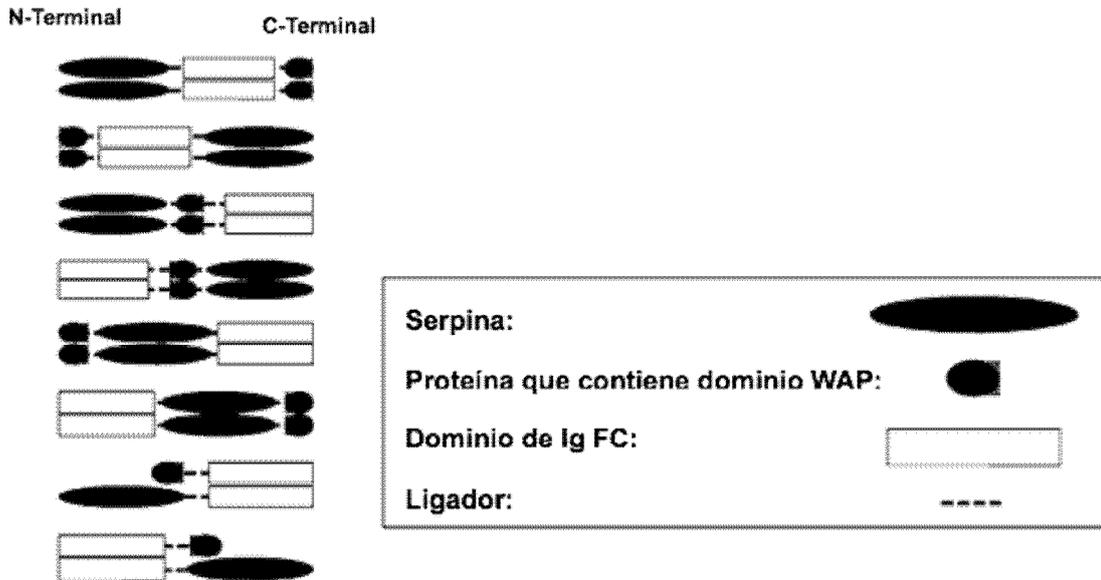


FIGURA 3B

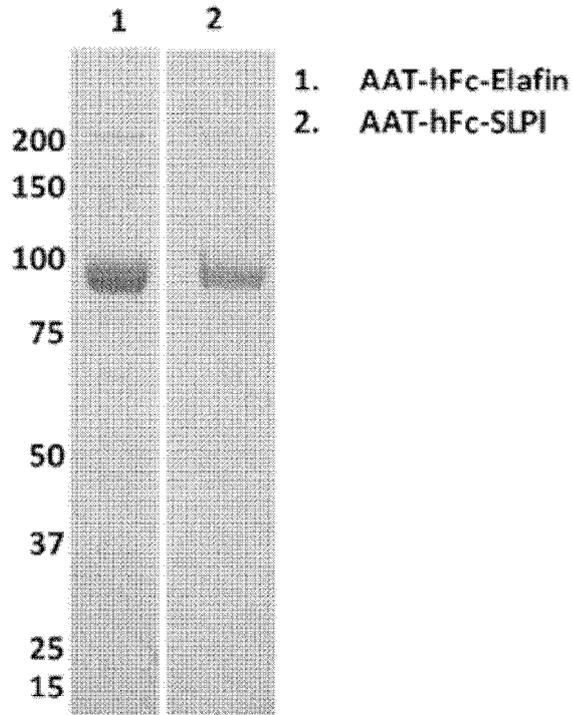


FIGURA 3C

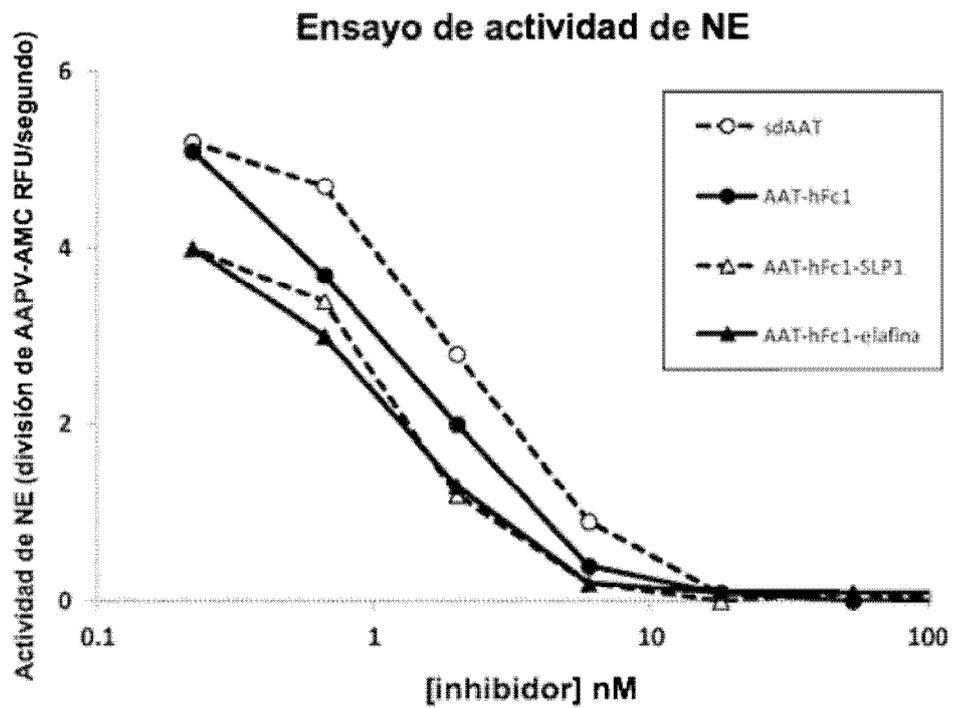


FIGURA 4A

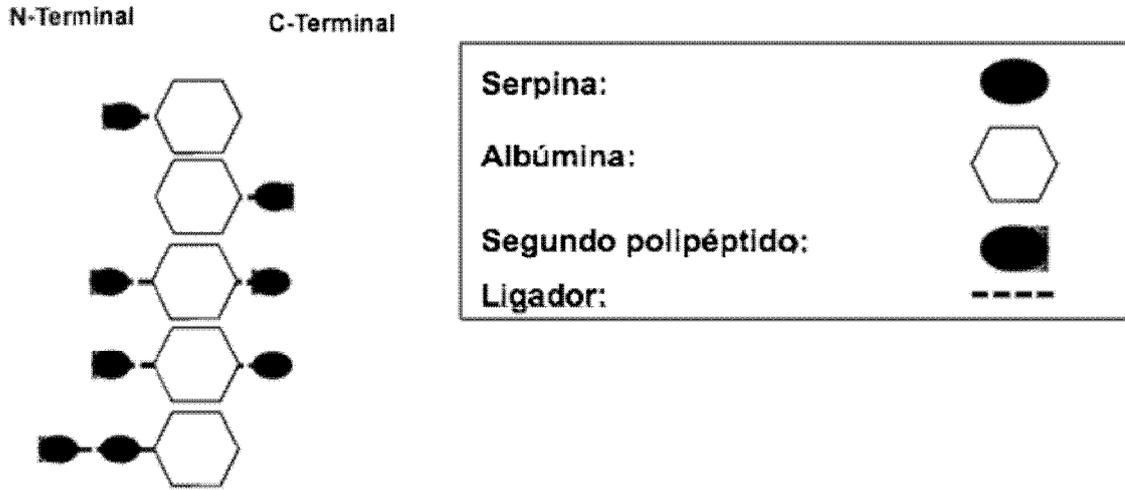


FIGURA 4B

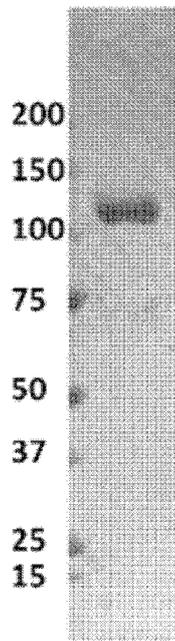


FIGURA 4C

