

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 774 549**

51 Int. Cl.:

C07K 14/79 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **13.03.2014 PCT/US2014/026620**

87 Fecha y número de publicación internacional: **02.10.2014 WO14160438**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **13.03.2014 E 14716493 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **18.09.2019 EP 2970433**

54 Título: **Fragmentos de P97 y usos de los mismos**

30 Prioridad:

13.03.2013 US 201361780170 P
01.10.2013 US 201361885387 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
21.07.2020

73 Titular/es:

BIOASIS TECHNOLOGIES INC. (100.0%)
Suite 125-10551 Shellbridge Way
Richmond, British Columbia V6X 2W9, CA

72 Inventor/es:

VITALIS, TIMOTHY y
GABATHULER, REINHARD

74 Agente/Representante:

UNGRÍA LÓPEZ, Javier

ES 2 774 549 T3

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

DESCRIPCIÓN

Fragmentos de P97 y usos de los mismos

5 Antecedentes*Campo técnico*

10 La presente invención se refiere en general a fragmentos de polipéptidos de p97 (melanotransferrina) humana que tienen actividad de transporte, incluidas variantes y combinaciones de los mismos, conjugados que comprenden dichos fragmentos de p97 y procedimientos de uso de los mismos relacionados, por ejemplo, para facilitar el suministro de agentes terapéuticos y/o diagnósticos a través de la barrera hematoencefálica (BHE) y hacia el sistema nervioso central.

15 Descripción de la Técnica Relacionada

Superar las dificultades de suministrar agentes terapéuticos o de diagnóstico a regiones específicas del cerebro representa un desafío importante para el tratamiento o diagnóstico de muchos trastornos del sistema nervioso central (SNC), incluidos los del cerebro. En su función neuroprotectora, la barrera hematoencefálica (BHE) funciona para dificultar el suministro al cerebro de muchos agentes diagnósticos y terapéuticos potencialmente importantes.

25 Las moléculas y genes terapéuticos que de otra manera podrían ser eficaces en el diagnóstico y la terapia no cruzan la BHE en cantidades adecuadas. Se informa que más del 95 % de la totalidad de las moléculas terapéuticas no cruzan la barrera hematoencefálica.

Por consiguiente, existe la necesidad de composiciones y procedimientos que faciliten el suministro de agentes terapéuticos y otras moléculas a través de la barrera hematoencefálica, por ejemplo, para tratar eficazmente determinadas enfermedades del sistema nervioso central (SNC), tales como cánceres, particularmente aquellos que han metastatizado al SNC. La presente invención aborda estas necesidades y ofrece otras ventajas relacionadas.

30 Los documentos WO0050636 y US2011093962 se refieren al polipéptido p97. El documento WO 201322738 se refiere a fragmentos de p97 unidos a un agente terapéutico.

Breve resumen de la invención

35 La invención se define en las reivindicaciones.

Se describen polipéptidos de p97 (melanotransferrina) aislados de hasta aproximadamente 300, 400, 500, 600 o 700 aminoácidos de longitud, donde el polipéptido comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a la SEQ ID NO: 13, o un fragmento activo o variante del mismo. El polipéptido de p97 comprende la SEQ ID NO: 13, incluyendo, opcionalmente, secuencias C-terminal y/o N-terminal adyacentes como se define en la SEQ ID NO: 1. El polipéptido puede comprender 2, 3, 4 o 5 de la SEQ ID NO: 13, incluyendo, opcionalmente, cualquier secuencia intermedia definida por la SEQ ID NO: 1.

45 El polipéptido de p97 puede comprender una o ambos de las SEQ ID NO: 13 y/o 14, incluyendo, opcionalmente, secuencias intermedias como se define por la SEQ ID NO: 1. En determinadas realizaciones, el polipéptido de p97 es de aproximadamente o hasta aproximadamente 250, 240, 230, 220, 210, 200, 190, 180, 170, 160, 150, 140, 130, 120, 110, 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 o 10 aminoácidos de longitud.

50 El polipéptido de p97 puede fusionarse con una proteína heteróloga.

También se incluyen conjugados, que comprenden el polipéptido de p97 descrito en el presente documento, donde el polipéptido de p97 está unido covalente u operativamente a un agente, para formar un conjugado p97-agente. En determinadas realizaciones, el agente es una molécula pequeña, un polipéptido, un péptido mimético, un peptido, un aptámero o una entidad detectable.

55 En determinadas realizaciones, la molécula pequeña es un agente citotóxico o quimioterapéutico o antiangiogénico seleccionado de uno o más agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, antibióticos antitumorales, platinos, inhibidores de topoisomerasa tipo I, inhibidores de topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca y taxanos. En determinadas realizaciones, la molécula pequeña se selecciona entre uno o más de clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalán, procarbazona, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfán, daunorrubicina, doxorubicina, gefitinib, erlotinib, idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecinas, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus, everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, paclitaxel, imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudilo, SB-681323, semaxanib, donepezilo, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasigilina, naltrexona,

lubiprostona, safinamida, istradefilina, pimavanserina, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina, bexaroteno, acetato de glatirámero, fingolimod y mitoxantrona, incluyendo sales y ácidos farmacéuticamente aceptables de los mismos.

- 5 En determinadas realizaciones, el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo o una molécula tipo inmunoglobulina.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno asociado con cáncer. En determinadas realizaciones, el antígeno asociado con cáncer es uno o más de
 10 Her2/neu, Her1/receptor de EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23(Receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (p. ej., VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R),
 15 alfafetoproteína, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_5\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteína EpCAM (17-1A), Muerte Programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano-3 (GPC3) o mesotelina humanos.

- 25 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno asociado con el dolor. En determinadas realizaciones, el antígeno asociado con el dolor es uno o más del factor de crecimiento nervioso (NGF) o la cinasa A relacionada con tropomiosina (TrkA).

- 30 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo o molécula tipo inmunoglobulina se une específicamente a una molécula proinflamatoria, opcionalmente, una citocina o quimiocina proinflamatoria.

En determinadas realizaciones, la molécula proinflamatoria es una o más de TNF- α , TNF- β , FasL, CD27L, CD30L, CD40L, Ox40L, 4-1BBL, TRAIL, TWEAK, y Apo3L, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, interferón- γ (IFN- γ), IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, CCL5, GRO α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , factor estimulante de colonias de macrófagos (M-CSF) o factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF). En determinadas realizaciones, la molécula proinflamatoria es TNF- α , y el anticuerpo o la molécula tipo inmunoglobulina es adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab, D2E7, CDP 571, o CDP 870, o un fragmento de unión a antígeno o una variante de los mismos.

- 40 En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más de Her2/neu, Her1/EGFR, TNF- α , antígeno B7H3, CD20, VEGF, CD52, CD33, CTLA-4, tenascina, alfa-4 (α 4) integrina, IL-23, amiloide- β , Huntingtina, CD25, factor de crecimiento nervioso (NGF), TrkA o α -sinucleína humanos.

- 45 En determinadas realizaciones, el anticuerpo se selecciona entre uno o más de trastuzumab, cetuximab, daclizumab, tanezumab, 3F8, 8H9, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatumumab (mertansina), brentuximab vedotina, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, citatumumab (bogatox),
 50 cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetán), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicina), girentuximab, glembatumumab (vedotina), ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, intetumumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab,
 55 lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radiactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilatumumab, rituximab,
 60 robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, tucotuzumab (celmoleucina), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab y zalutumumab, incluyendo fragmentos de unión a antígeno de los mismos.

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

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

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

En determinadas realizaciones, el agente es un agente cardiotoxico en su forma conjugada. En determinadas realizaciones, el agente cardiotoxico es una antraciclina/antraquinolona, ciclofosfamida, antimetabolito, agente antimicrotúbulos, inhibidor de tirosina cinasa, bevacizumab o trastuzumab. En determinadas realizaciones, el agente cardiotoxico es ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docataxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfán, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona, o mitoxantrona.

Algunas realizaciones incluyen composiciones (p.ej., composiciones farmacéuticas, composiciones terapéuticas o composiciones diagnósticas), que comprenden un conjugado descrito en el presente documento, y un vehículo farmacéuticamente aceptable o de calidad farmacológica.

También se incluyen en la divulgación procedimientos para tratar a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar al sujeto un conjugado o composición de p97 descritos en el presente documento.

Se divulgan procedimientos para tratar un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente del cerebro. Se divulgan procedimientos para tratar un cáncer primario del SNC, opcionalmente del cerebro. Se divulgan procedimientos para tratar un cáncer metastásico del SNC, opcionalmente del cerebro. Se divulgan procedimientos para tratar un glioma, meningioma, adenoma hipofisario, schwannoma vestibular, linfoma primario del SNC, neuroblastoma, o tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma). El glioma puede ser un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma o un papiloma del plexo coroideo. Se describen procedimientos para tratar el glioblastoma multiforme. El glioblastoma multiforme puede ser un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma.

Se divulgan procedimientos para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico. La enfermedad por almacenamiento lisosómico puede seleccionarse de una o más de aspartilglucosaminuria, enfermedad por almacenamiento de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, Enfermedad de Krabbe, enfermedad por almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α -manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolisacárido tipo I, sialidosis tipos I/II, mucopolisacárido tipo II/III enfermedad de la célula I, mucopolisacárido tipo III pseudopolidistrofia de Hurler, mucopolisacárido tipo I, mucopolisacárido tipo II (síndrome de Hunter), mucopolisacárido tipo IIIA, Síndrome de Sanfilippo, mucopolisacárido tipo IIIB, mucopolisacárido tipo IIIC, mucopolisacárido tipo IIID, mucopolisacárido tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacárido tipo IVB, mucopolisacárido tipo VI, mucopolisacárido tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacárido tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler y enfermedad por almacenamiento de ácido siálico.

Se divulgan procedimientos para tratar un trastorno degenerativo o autoinmunitario del sistema nervioso central (SNC). El trastorno degenerativo o autoinmunitario del SNC puede ser enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple (EM).

El sujeto puede estar recibiendo terapia con un agente cardiotoxico de otra manera. El agente cardiotoxico puede ser una antraciclina/antraquinolona, ciclofosfamida, antimetabolito, agente antimicrotúbulos, inhibidor de tirosina cinasa, bevacizumab o trastuzumab. El agente cardiotoxico puede ser ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docataxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfán, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona, o mitoxantrona.

El sujeto puede tener cáncer. El cáncer puede ser uno o más de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer

gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, cáncer del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, un tumor epitelial, cáncer de hueso o un cáncer hematopoyético.

5 La administración del conjugado puede reducir la cardiotoxicidad del agente, en relación con una forma no conjugada del agente.

10 Se divulgan procedimientos para tratar dolor. El dolor puede ser dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático y/o dolor central.

15 Se divulgan procedimientos para tratar una afección inflamatoria. La afección inflamatoria puede tener un componente del sistema nervioso central. La afección inflamatoria puede ser una o más de meningitis, mielitis, encefalomielitis, aracnoiditis, sarcoidosis, granuloma, inflamación inducida por fármacos, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, demencia por VIH, encefalitis, infección parasitaria, un trastorno desmielinizante inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria del SNC mediada por linfocitos T CD8+, enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmunitaria, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmunitaria, neuropatía disimunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis espinal, lesión aguda de la médula espinal y compresión de la médula espinal.

25 La afección inflamatoria puede estar asociada con una infección del sistema nervioso central. La infección puede ser una infección bacteriana causada por uno o más de los *estreptococos del grupo B* (por ejemplo, subtipos III), *Streptococcus pneumoniae* (p.ej., serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), *Escherichia coli* (p.ej., que porta el antígeno K1), *Listeria monocytogenes* (p.ej., serotipo IVb), infección por neisseria tal como *Neisseria meningitidis* (meningococo), infección por estafilococos, infección por *Haemophilus* tal como *Haemophilus influenzae* tipo B, *Klebsiella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum*, o *Borrelia burgdorferi*. La infección puede ser una infección viral causada por uno o más de un enterovirus, virus del herpes simple tipo 1 o 2, virus linfotrófico humano de linfocitos T, virus varicela zoster, virus de las paperas, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV).

35 La afección inflamatoria puede estar asociada con un cáncer del sistema nervioso central, opcionalmente una meningitis maligna.

40 También se divulgan procedimientos para obtener imágenes de un órgano o componente de tejido en un sujeto, que comprende (a) administrar al sujeto un polipéptido de p97 humana descrito en el presente documento, donde el polipéptido se conjuga con una entidad detectable, y (b) visualizar la entidad detectable en el sujeto. El compartimento de órganos o tejidos puede comprender el sistema nervioso central. El compartimento de órganos o tejidos puede comprender el cerebro. La visualización de la entidad detectable puede comprender una o más de fluoroscopia, radiografía de proyección, exploración por tomografía computarizada de rayos X, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) u obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

45 Estos y otros aspectos serán evidentes con referencia a la siguiente descripción detallada y los dibujos adjuntos.

Breve descripción de los dibujos

50 La **Figura 1** muestra un análisis SDS-PAGE de melanotransferrina humana (p97) digerida con CNBr. Las **Figuras 2A-2D** muestran una lista de fragmentos de p97 identificados por análisis MS/MS de un producto de digestión con tripsina en solución de p97 humana, y la **Figura 2E** muestra el mapa de cobertura de secuencia de ese análisis.

55 La **Figura 3** muestra los mapas de cobertura de secuencia de los fragmentos de p97 identificados por análisis MS/MS de un producto de digestión con CNBr de p97 humana. Las 3 bandas identificadas en la SDS-PAGE de la Figura 1 se sometieron a digestión con tripsina y análisis LC-MS/MS; La **Figura 3A** muestra los resultados para la banda 1, La **Figura 3B** muestra los resultados para la banda 2, y la **Figura 3C** muestra los resultados para la banda 3.

60 La **Figura 4A** muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 1 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La **Figura 4B** enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas.

La **Figura 5A** muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 2 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La **Figura 5B** enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas.

65 La **Figura 6A** muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 3 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La **Figura 6B**

enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas.

La **Figura 7** ilustra el modelo *in vitro* de la barrera hematoencefálica (BHE), con células endoteliales en un filtro (ya sea un filtro de 3 o 4 μm) en el compartimento luminal para simular la barrera desde la sangre al sistema nervioso central, y las células gliales en el compartimento abluminal para simular el sistema nervioso central.

La **Figura 8** muestra un esquema de los protocolos de prueba que utilizan el modelo *in vitro* de la BHE.

La **Figura 9** muestra una predicción de estructura secundaria por YASPIN (véase Yin et al., Bioinformatics. 21:152-159, 2005) de p97 soluble humana (SEQ ID NO: 91; restos 20-709 de la SEQ ID NO: 1) junto con algunos de los fragmentos del péptido p97 identificados como que tienen una actividad de transporte significativa en el modelo *in vitro* de la BHE. La **Figura 9A** muestra algunos de los fragmentos de péptidos por digestión trípptica que cruzan la BHE (subrayados), y la **Figura 9B** muestra tres de los fragmentos de péptidos por digestión con CNBr que cruzan la BHE (subrayados).

La **Figura 10** muestra la ruta de síntesis para los conjugados p97 (MTf)-anticuerpo (véase el Ejemplo 3).

La **Figura 11** muestra la distribución cerebral de conjugados MTf-anticuerpo y proteínas de control después de la administración a ratones (véase el Ejemplo 3).

La **Figura 12** muestra la ruta de síntesis para los conjugados p97 (MTf)-HRP (12B) (véase el Ejemplo 4).

Las **Figuras 13A-13C** muestran los resultados de la microscopía confocal tridimensional (3D) que se realizó para evaluar la biodistribución cerebral de las proteínas de prueba. La **Figura 13A** muestra los resultados para la PBS, la **Figura 13B** muestra los resultados para HRP marcado con AF680, y la **Figura 13C** muestra los resultados para el conjugado MTf_{PEP}-HRP marcado con AF680. Las flechas en la **Figura 13C** resaltan la fluorescencia de AF680 del conjugado MTf_{PEP}-HRP marcado con AF680 en los tejidos cerebrales.

Descripción detallada de la invención

Las realizaciones de la presente invención se basan en parte en el descubrimiento de fragmentos mínimos de p97 humana (melanotransferrina) que tienen la capacidad de transportar a través de la barrera hematoencefálica (BHE).

Por lo tanto, las realizaciones de la presente invención se refieren a conjugados de fragmentos polipeptídicos particulares de p97 humana y variantes de los mismos, composiciones que comprenden los fragmentos polipeptídicos, conjugados o mezclas de fragmentos de p97 que tienen un agente de interés fijado o unido operativamente, y esos conjugados para su uso, en procedimientos de tratamiento, diagnóstico y pruebas, tal como obtención de imágenes médicas.

Los fragmentos polipeptídicos de p97 humana descritos en el presente documento pueden encontrar una variedad de usos en las técnicas terapéuticas y de diagnóstico, por ejemplo, para mejorar la transferencia de agentes a través de la BHE. Además, al identificar los fragmentos mínimos necesarios para la actividad de transporte de la BHE, determinados aspectos de la presente invención permiten el uso de polipéptidos de p97 más pequeños, reduciendo así algunas de las dificultades asociadas con la síntesis/producción, purificación y formulación farmacéutica de polipéptidos más grandes.

Otras ventajas y beneficios serán evidentes para los expertos en la materia.

Definiciones

A menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos usados en el presente documento tienen el mismo significado entendido normalmente por los expertos habituales en la materia a la que pertenece la presente invención. Aunque puede usarse cualquier procedimiento y material similar o equivalente a los descritos en el presente documento en la práctica o ensayo de la presente invención, se describen los procedimientos y materiales preferidos. Para los fines de la presente invención, se definen los siguientes términos a continuación.

Los artículos "**un**" y "**una**" se usan en el presente documento para hacer referencia a uno o más de uno (*es decir*, al menos uno) del objeto gramatical del artículo. A modo de ejemplo, "un elemento" significa un elemento o más de un elemento.

Por "**aproximadamente**" se entiende cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, pero o longitud que puede variar tanto como un 30, 25, 20, 15, 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 o 1 % de una cantidad, nivel, valor, número, frecuencia, porcentaje, dimensión, tamaño, cantidad, peso o longitud de referencia.

Como se usa en el presente documento, el término "**aminoácido**" pretende significar tanto aminoácidos de origen natural como de origen no natural, así como análogos y miméticos de aminoácidos. Los aminoácidos de origen natural incluyen los 20 (L)-aminoácidos utilizados durante la biosíntesis de proteínas, así como otros, como 4-hidroxiprolina, hidroxilisina, desmosina, isodesmosina, homocisteína, citrulina y ornitina, por ejemplo. Los aminoácidos de origen no natural incluyen, por ejemplo, (D)-aminoácidos, norleucina, norvalina, p-fluorofenilalanina, etionina y similares, que son bien conocidos por un experto en la materia. Los análogos de aminoácidos incluyen formas modificadas de aminoácidos de origen natural y no natural. Dichas modificaciones pueden incluir, por ejemplo, sustitución o reemplazo de grupos y restos químicos en el aminoácido o mediante derivatización del aminoácido. Los miméticos de aminoácidos incluyen, por ejemplo, estructuras orgánicas que muestran propiedades

funcionalmente similares, tales como la carga y la distancia de carga característicos del aminoácido de referencia. Por ejemplo, una estructura orgánica que imita a la Arginina (Arg o R) tendría una fracción de carga positiva ubicada en un espacio molecular similar y que tendría el mismo grado de movilidad que el grupo e-amino de la cadena lateral del aminoácido Arg de origen natural. Los miméticos también incluyen estructuras restringidas para mantener una distancia óptima y las interacciones de carga del aminoácido o de los grupos funcionales del aminoácido. Los expertos en la materia conocen o pueden determinar qué estructuras constituyen análogos de aminoácidos y miméticos de aminoácidos funcionalmente equivalentes.

A lo largo de la presente memoria descriptiva, a no ser que el contexto requiera lo contrario, las palabras "**comprenden**", "**comprende**", y "**que comprende**" se entenderá que implica la inclusión de una etapa o elemento o grupo de etapas o elementos establecidos, pero no la exclusión de cualquier otra etapa o elemento o grupo de etapas o elementos. Por "**que consiste en**" se entiende que incluye, y se limita a, lo que sea que sigue a la frase "**que consiste en**". Por lo tanto, la frase "**que consiste en**" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios y que no pueden estar presentes otros elementos. Por "**que consiste esencialmente en**" se entiende que incluye cualquier elemento enumerado después de la frase, y se limita a otros elementos que no interfieran con o que no contribuyan a la actividad o acción especificada en la divulgación de los elementos enumerados. Por lo tanto, la frase "**que consiste esencialmente en**" indica que los elementos enumerados son necesarios u obligatorios, pero que otros elementos son opcionales y pueden o no estar presentes dependiendo de si afectan o no materialmente a la actividad o acción de los elementos enumerados.

El término "**conjugado**" pretende referirse a la entidad formada como resultado de la unión o enlace covalente o no covalente de un agente u otra molécula, *por ejemplo*, una molécula biológicamente activa, a un polipéptido de p97. Un ejemplo de un polipéptido conjugado es una "**proteína de fusión**" o "**polipéptido de fusión**", es decir, un polipéptido que se crea mediante la unión de dos o más secuencias codificantes, que originalmente codifica para polipéptidos separados; la traducción de las secuencias codificantes unidas da como resultado un único polipéptido de fusión, generalmente con propiedades funcionales derivadas de cada uno de los polipéptidos separados.

Como se usa en el presente documento, los términos "**función**" y "**funcional**" y similares se refieren a una función biológica, enzimática o terapéutica.

"**Homología**" se refiere al número porcentual de aminoácidos que son idénticos o constituyen sustituciones conservativas. La homología se puede determinar utilizando programas de comparación de secuencias como GAP (Deveraux et al., Nucleic Acids Research. 12, 387-395, 1984). De esta manera, las secuencias de una longitud similar o sustancialmente diferente a las citadas en el presente documento podrían compararse mediante la inserción de huecos en la alineación, determinándose dichos espacios, por ejemplo, mediante el algoritmo de comparación utilizado por GAP.

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

El término "**enlace**", "**enlazador**", "**resto enlazador**", o "**L**" se usa en el presente documento para referirse a un enlazador que se puede usar para separar un fragmento polipeptídico de p97 de un agente de interés, o para separar un primer agente de otro agente, por ejemplo, donde dos o más agentes están unidos para formar un conjugado de p97. El enlazador puede ser fisiológicamente estable o puede incluir un enlazador liberable tal como un enlazador degradable enzimáticamente (por ejemplo, enlazadores escindibles proteolíticamente). En determinados aspectos, el enlazador puede ser un enlazador peptídico, por ejemplo, como parte de una proteína de fusión de p97. En algunos aspectos, el enlazador puede ser un enlazador no peptídico o un enlazador no de proteína. En algunos aspectos, el enlazador puede ser una partícula, tal como una nanopartícula.

Los términos "**que modular**" y "**alterar**" incluyen "**augmentar**", "**potenciar**" o "**estimular**", así como "**disminuir**" o "**reducir**", generalmente en una cantidad o grado estadísticamente significativo o fisiológicamente significativo en relación con un control. Una cantidad "aumentada", "estimulada" o "potenciada" es generalmente una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir un aumento que es 1,1, 1,2, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15, 20, 30 o más veces (p. Ej., 500, 1000 veces) (incluidos todos los números enteros y decimales entre y por encima de 1, por ejemplo, 1,5, 1,6, 1,7, 1,8, etc.) la cantidad producida por ninguna composición (por ejemplo, la ausencia de polipéptido de conjugado de la invención) o una composición, muestra o sujeto de prueba de control. Una cantidad "disminuida" o "reducida" es, generalmente, una cantidad "estadísticamente significativa" y puede incluir una disminución que es un 1 %, 2 %, 3 %, 4 %, 5 %, 6 %, 7 %, 8 %, 9 %, 10 %, 11 %, 12 %, 13 %, 14 %, 15 %, 16 %, 17 %, 18 %, 19 %, 20 %, 25 %, 30 %, 35 %, 40 %, 45 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, o 100 % en la cantidad producida por ninguna composición o una composición de control, incluyendo todos los números enteros entre ellos. Como un ejemplo no limitante, un control podría comparar la actividad, como la cantidad o velocidad de transporte/suministro a través de la barrera hematoencefálica, la velocidad y/o los niveles de distribución al tejido del sistema nervioso central, y/o la C_{max} para plasma, tejidos del sistema nervioso central, o

cualquier otro tejido sistémico o periférico del sistema nervioso no central, de un conjugado de p97-agente en relación con el agente solo. En el presente documento se describen otros ejemplos de comparaciones y cantidades "estadísticamente significativas".

- 5 En determinadas realizaciones, la "**pureza**" de cualquier agente dado (por ejemplo, un conjugado de p97 tal como una proteína de fusión) en una composición puede definirse específicamente. Por ejemplo, determinadas composiciones pueden comprender un agente que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 91 %, 92 %, 93 %, 94 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 %, 99 %, o 100 % puro, incluyendo todos los números decimales entre ellos, tal como se mide, por ejemplo y de ninguna manera limitante, mediante cromatografía de líquidos de alta presión (HPLC), una forma bien conocida de cromatografía en columna utilizada con frecuencia en bioquímica y química analítica para separar, identificar y cuantificar compuestos.

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

- 25 Un enlace "**fisiológicamente escindible**" o "**hidrolizable**" o "**degradable**" es un enlace que reacciona con el agua (es decir, se hidroliza) en condiciones fisiológicas. La tendencia de un enlace a hidrolizarse en agua dependerá no solo del tipo general de enlace que conecta dos átomos centrales sino también de los sustituyentes fijados a estos átomos centrales. Los enlaces hidrolíticamente inestables o débiles apropiados incluyen, pero sin limitación: éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídrido, acetal, cetal, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, tioéster, éster tiol, carbonato e hidrazona, péptidos y oligonucleótidos.

- Un "**enlazador liberable**" incluye, pero sin limitación, un enlazador fisiológicamente escindible y un enlazador enzimáticamente degradable. Por lo tanto, un "enlazador liberable" es un enlazador que puede sufrir bien hidrólisis espontánea o escisión por algún otro mecanismo (por ejemplo, catalizado por enzimas, catalizado por ácidos, catalizado por bases y así, sucesivamente) en condiciones fisiológicas. Por ejemplo, un "enlazador liberable" puede implicar una reacción de eliminación que tiene una abstracción de un protón por una base, por ejemplo, un átomo de hidrógeno ionizable, H α), como fuerza impulsora. Para fines del presente documento, un "enlazador liberable" es sinónimo de un "enlazador degradable". Un "enlace enzimáticamente degradable" incluye un enlace, por ejemplo, una secuencia de aminoácidos que está sujeta a degradación por una o más enzimas, *por ejemplo*, peptidasas o proteasas. En realizaciones particulares, un enlazador liberable tiene una semivida a pH 7,4, 25 °C, por ejemplo, a un pH fisiológico, temperatura del cuerpo humano (por ejemplo, *in vivo*), de aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 2 hora, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 36 horas, aproximadamente 48 horas, aproximadamente 72 horas o aproximadamente 96 horas o menos.

- La expresión "**secuencia de referencia**" se refiere generalmente a una secuencia codificante de ácido nucleico, o secuencia de aminoácidos, con la que se compara otra secuencia. Todas las secuencias de polipéptidos y polinucleótidos descritas en el presente documento se incluyen como secuencias de referencia, incluidas las descritas por nombre y las descritas en las Tablas y el Listado de Secuencias.

- Las expresiones "**identidad de secuencia**" o, por ejemplo, que comprenden una "secuencia un 50 % idéntica a", como se usa en el presente documento, se refieren al grado en que las secuencias son idénticas basándose en nucleótido por nucleótido o basándose en aminoácido por aminoácido sobre una ventana de comparación. Por lo tanto, un "porcentaje de identidad de secuencia" se puede calcular comparando dos secuencias alineadas de manera óptima sobre una ventana de comparación, determinando el número de posiciones en las que se produce la base de ácido nucleico idéntica (por ejemplo, A, T, C, G, I) o el resto de aminoácido idéntico (por ejemplo, Ala, Pro, Ser, Thr, Gly, Val, Leu, Ile, Phe, Tyr, Trp, Lys, Arg, His, Asp, Glu, Asn, Gln, Cys y Met) en ambas secuencias para producir el número de posiciones coincidentes, dividiendo el número de posiciones coincidentes entre el número total de posiciones en la ventana de comparación (es decir, el tamaño de la ventana) y multiplicando el resultado por 100 para obtener el porcentaje de identidad de secuencia. Se incluyen nucleótidos y polipéptidos que tienen al menos aproximadamente un 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100% de identidad de secuencia con cualquiera de las secuencias de referencia descritas en el presente documento (véase, por ejemplo, Listado de Secuencias), donde generalmente la variante de polipéptido mantiene al menos una actividad biológica del polipéptido de referencia.

Las expresiones utilizadas para describir las relaciones de secuencia entre dos o más polinucleótidos o polipéptidos incluyen "secuencia de referencia", "ventana de comparación", "identidad de secuencia", "porcentaje de identidad de secuencia" e "identidad sustancial". Una "secuencia de referencia" tiene una longitud de al menos 12 pero con frecuencia de 15 a 18 y, a menudo, de al menos 25 unidades monoméricas, incluidos nucleótidos y restos de aminoácidos. Debido a que dos polinucleótidos pueden comprender cada uno (1) una secuencia (es decir, solo una parte de la secuencia polinucleotídica completa) que es similar entre los dos polinucleótidos, y (2) una secuencia que es divergente entre los dos polinucleótidos, las comparaciones de secuencias entre dos (o más) polinucleótidos se realizan generalmente comparando secuencias de los dos polinucleótidos sobre una "ventana de comparación" para identificar y comparar regiones locales de similitud de secuencia. Una "ventana de comparación" se refiere a un segmento conceptual de al menos 6 posiciones contiguas, habitualmente de aproximadamente 50 a aproximadamente 100, más habitualmente, de aproximadamente 100 a aproximadamente 150 en el que se compara con una secuencia de referencia del mismo número de posiciones contiguas una vez alineadas las dos secuencias de manera óptima. La ventana de comparación puede comprender adiciones o supresiones (es decir, huecos) de aproximadamente el 20 % o menos en comparación con la secuencia de referencia (que no comprende adiciones o supresiones) para la alineación óptima de las dos secuencias. La alineación óptima de secuencias para alinear una ventana de comparación puede llevarse a cabo mediante implementaciones informatizadas de algoritmos (GAP, BESTFIT, FASTA y TFASTA en Wisconsin Genetics Software Package Release 7.0, Genetics Computer Group, 575 Science Drive Madison, WI, EE. UU.) o por inspección y la mejor alineación (es decir, que da como resultado el mayor porcentaje de homología sobre la ventana de comparación) generada por cualquiera de los diversos procedimientos seleccionados. También se puede hacer referencia a la familia de programas BLAST como se divulga por ejemplo por Altschul et al., Nucl. Acidos Res. 25:3389, 1997. Se puede encontrar un estudio detallado del análisis de secuencia en la Unidad 19.3 de Ausubel et al., "Current Protocols in Molecular Biology", John Wiley & Sons Inc, 1994-1998, Capítulo 15.

Por "**estadísticamente significativo**", se entiende que era improbable que el resultado se hubiera producido por casualidad. La significación estadística puede determinarse mediante cualquier procedimiento conocido en la técnica. Las medidas de significación comúnmente utilizadas incluyen el valor de p, que es la frecuencia o probabilidad con la que se produciría el evento observado, si la hipótesis nula fuera cierta. Si el valor de p obtenido es menor que el nivel de significación, entonces se rechaza la hipótesis nula. En casos simples, el nivel de significación se define en un valor de p de 0,05 o menos.

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

Un "**sujeto**", como se usa en el presente documento, incluye cualquier animal que muestre un síntoma, o esté en riesgo de mostrar un síntoma, que pueda ser tratado o diagnosticado con un conjugado de p97 de la invención. Los sujetos adecuados (pacientes) incluyen animales de laboratorio (tales como ratones, ratas, conejos o cobayas), animales de granja y animales domésticos o mascotas (tal como gatos o perros). Se incluyen primates no humanos y, preferentemente, pacientes humanos.

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

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

"**Tratamiento**" o "**tratar**", como se usa en el presente documento, incluye cualquier efecto deseable sobre los síntomas o la patología de una enfermedad o afección, y puede incluir incluso cambios o mejoras mínimas en uno o más marcadores medibles de la enfermedad o afección que se está tratando. "Tratamiento" o "tratar" no necesariamente indica la erradicación o cura completa de la enfermedad o afección, o los síntomas asociados de las

mismas. El sujeto que recibe el presente tratamiento es cualquier sujeto que lo necesite. Los marcadores ejemplares de la mejora clínica serán evidentes para los expertos en la materia.

La expresión "**tipo silvestre**" se refiere a un gen o producto génico que tiene las características de ese gen o producto génico cuando se aísla de una fuente de origen natural. Un gen o producto génico de tipo silvestre (*por ejemplo*, un polipéptido) es el que se observa con mayor frecuencia en una población y, por lo tanto, se diseña arbitrariamente la forma "normal" o "de tipo silvestre" del gen.

Secuencias Polipeptídicas de p97 y Conjugados de las Mismas

Las realizaciones de la presente invención se refieren generalmente a fragmentos polipeptídicos de p97 humana (melanotransferrina; MTF), composiciones que comprenden dichos fragmentos y conjugados de los mismos. En determinados casos, los fragmentos polipeptídicos de p97 descritos en el presente documento tienen actividad de transporte, es decir, son capaces de transportar a través de la barrera hematoencefálica (BHE). En realizaciones particulares, los fragmentos de p97 se acoplan de manera covalente, no covalente u operativamente a un agente de interés, tal como un agente terapéutico, de diagnóstico o detectable, para formar un conjugado p97-agente. Ejemplos específicos de agentes incluyen moléculas pequeñas y polipéptidos, tales como anticuerpos, entre otros agentes descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Se describen a continuación secuencias polipeptídicas de p97 y agentes ejemplares. También se describen procedimientos y componentes ejemplares, tales como grupos enlazadores, para acoplar un polipéptido de p97 a un agente de interés.

Secuencias de p97. Un polipéptido de p97 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en al menos uno de los fragmentos de p97 humana identificados en las Tablas 1-7, o en las Figuras 2-6 o 9. En realizaciones específicas, un polipéptido de p97 comprende, consiste esencialmente en, o consiste en al menos una de las secuencias de p97 humana expuestas en las SEQ ID NO: 2-18.

Una secuencia polipeptídica de p97 comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad u homología, a lo largo de su longitud, con al menos uno de los fragmentos de p97 humana identificados en las Tablas 1-7, o en las Figuras 2-6 o 9. Una variante de una secuencia polipeptídica de p97 comprende una secuencia que tiene al menos un 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 96 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad u homología, a lo largo de su longitud, con al menos una de las secuencias de p97 humana expuestas en las SEQ ID NO: 2-18.

El polipéptido de p97 puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en 2, 3, 4 o 5 de los fragmentos de p97 identificados en las Tablas 1-7, o en las Figuras 2-6 o 9, incluyendo opcionalmente cualquier secuencia intermedia de p97 (es decir, secuencias de p97 de SEQ ID NO: 1 que se encuentran entre los fragmentos, si están presentes). El polipéptido de p97 puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en 2, 3, 4 o 5 de las secuencias de p97 expuestas en las SEQ ID NO: 2-18, incluyendo opcionalmente cualquier secuencia intermedia de p97 (es decir, secuencias de p97 de SEQ ID NO: 1 que se encuentran entre las SEQ ID NO: 2-18, si están presente (véanse también las Figuras 9A y 9B para las relaciones entre SEQ ID NOS: 2-18 en la estructura primaria de p97 humana). Como un ejemplo, un polipéptido de p97 podría comprender la SEQ ID NO: 13 y 14, incluyendo opcionalmente cualquier secuencia intermedia de p97 de SEQ ID NO: 1, o variantes de la misma.

Un fragmento polipeptídico de p97 tiene aproximadamente, al menos aproximadamente, o hasta aproximadamente 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730 o más aminoácidos de longitud, incluyendo todos los números enteros e intervalos intermedios, y que pueden comprender la totalidad o una parte de la secuencia de una secuencia de p97 de referencia (véanse, por ejemplo, Listado de Secuencias, Tablas 1-7, Tabla B, Figuras 2-6 y 9), incluyendo cualquier secuencia adyacente N-terminal y/o C-terminal de un fragmento de p97 de referencia, como se define por la SEQ ID NO: 1.

Un fragmento polipeptídico de p97 tiene aproximadamente 5-700, 5-600, 5-500, 5-400, 5-300, 5-200, 5-100, 5-50, 5-40, 5-30, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-700, 10-600, 10-500, 10-400, 10-300, 10-200, 10-100, 10-50, 10-40, 10-30, 10-25, 10-20, 10-15, 20-700, 20-600, 20-500, 20-400, 20-300, 20-200, 20-100, 20-50, 20-40, 20-30, 20-25, 30-700, 30-600, 30-500, 30-400, 30-300, 30-200, 30-100, 30-50, 30-40, 40-700, 40-600, 40-500, 40-400, 40-300, 40-200, 40-100, 40-50, 50-700, 50-600, 50-500, 50-400, 50-300, 50-200, 50-100, 60-700, 60-600, 60-500, 60-400, 60-300, 60-200, 60-100, 60-70, 70-700, 70-600, 70-500, 70-400, 70-300, 70-200, 70-100, 70-80, 80-700, 80-600, 80-500, 80-400, 80-300, 80-200, 80-100, 80-90, 90-700, 90-600, 90-500, 90-400, 90-300, 90-200, 90-100, 100-700, 100-600, 100-500, 100-400, 100-300, 100-250, 100-200, 100-150, 200-700, 200-600, 200-500, 200-400, 200-300, o 200-250 aminoácidos de longitud, y comprende la totalidad o una parte de una secuencia de p97 de referencia (véanse, por ejemplo, Listado de Secuencias, Tablas 1-7, Tabla B, Figuras 2-6 y 9), incluyendo cualquier secuencia adyacente N-

terminal y/o C-terminal de un fragmento de p97 de referencia, como se define por la SEQ ID NO: 1.

Determinados ejemplos comprenden uno o más fragmentos de p97, por ejemplo, 2, 3, 4 o 5 fragmentos, tal como se ilustra por la fórmula $[X]_n$, donde X es un fragmento de p97 descrito en el presente documento y n es un número entero de 1-5. En la invención, X es DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13).

El fragmento de p97 o variante del mismo tiene la capacidad de cruzar la BHE, y opcionalmente transportar un agente de interés a través de la BHE y hacia el sistema nervioso central. En determinadas realizaciones, el fragmento de p97 o variante del mismo es capaz de unirse específicamente a un receptor de p97, un receptor LRP1 y/o un receptor LRP1B.

En algunas realizaciones, el fragmento de p97 tiene una o más cisteínas y/o tirosinas terminales (por ejemplo, N-terminal, C-terminal), que se pueden añadir para conjugación y yodación, respectivamente.

Las variantes y fragmentos de polipéptidos de p97 de referencia y otros polipéptidos de referencia se describen con mayor detalle a continuación.

Conjugados de p97. La invención comprende un polipéptido de p97 que está unido a un agente de interés, por ejemplo, una molécula pequeña, un polipéptido (por ejemplo, péptido, anticuerpo), un péptido mimético, un peptoide, un aptámero, una entidad detectable o cualquier combinación de los mismos. También se incluyen conjugados que comprenden más de un agente de interés, por ejemplo, un fragmento de p97 conjugado con un anticuerpo y una molécula pequeña.

Se prefieren enlaces covalentes, sin embargo, también se pueden emplear enlaces no covalentes, incluidos los que utilizan interacciones proteína-ligando no covalentes relativamente fuertes, tales como la interacción entre biotina y avidina. También se incluyen enlaces operativos, que no necesitan necesariamente una interacción directamente covalente o no covalente entre el fragmento de p97 y el agente de interés; ejemplos de tales enlaces incluyen mezclas de liposomas que comprenden un polipéptido de p97 y un agente de interés. En el presente documento se describen procedimientos ejemplares para generar conjugados de proteínas, y otros procedimientos son bien conocidos en la técnica.

Moléculas Pequeñas. En realizaciones particulares, el fragmento de p97 se conjuga con una molécula pequeña. Una "molécula pequeña" se refiere a un compuesto orgánico que es de origen sintético o biológico (biomolécula), pero no es generalmente un polímero. Los compuestos orgánicos se refieren a una gran clase de compuestos químicos cuyas moléculas contienen carbono, excluyendo generalmente aquellos que contienen solamente carbonatos, óxidos simples de carbono o cianuros. Una "biomolécula" se refiere generalmente a una molécula orgánica que es producida por un organismo vivo, incluidas grandes moléculas poliméricas (biopolímeros) tales como péptidos, polisacáridos y también ácidos nucleicos, y moléculas pequeñas tales como metabolitos secundarios primarios, lípidos, fosfolípidos, glucolípidos, esteroides, glicerolípidos, vitaminas y hormonas. Un "polímero" se refiere generalmente a una molécula grande o macromolécula compuesta de unidades estructurales repetitivas, que están generalmente enlazadas por enlace químico covalente.

En determinadas realizaciones, una molécula pequeña tiene un peso molecular de menos de aproximadamente 1000-2000 Daltons, generalmente entre aproximadamente 300 y 700 Daltons, e incluyendo aproximadamente 50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450, 500, 550, 600, 650, 700, 750, 800, 850, 900, 950, 1000 o 2000 Daltons.

Determinadas moléculas pequeñas pueden tener las características de "unión específica" descritas para anticuerpos (*infra*). Por ejemplo, una molécula pequeña puede unirse específicamente a una diana descrita en el presente documento con una afinidad de unión (K_d) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 o 50 nM. En determinadas realizaciones, una molécula pequeña se une específicamente a un receptor de la superficie celular o a otra proteína de la superficie celular. En algunas realizaciones, la molécula pequeña se une específicamente a al menos un antígeno asociado con cáncer descrito en el presente documento. En realizaciones particulares, la molécula pequeña se une específicamente a al menos un antígeno asociado con el sistema nervioso, asociado con el dolor y/o asociado con la autoinmunidad descrito en el presente documento.

Moléculas pequeñas ejemplares incluyen agentes citotóxicos, quimioterapéuticos y antiangiogénicos, por ejemplo, aquellos que se han considerado útiles en el tratamiento de diversos cánceres, incluyendo cánceres del sistema nervioso central y cánceres que han metastatizado al sistema nervioso central. Las clases particulares de moléculas pequeñas incluyen, sin limitación, agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, antibióticos antitumorales, platinos, inhibidores de topoisomerasa tipo I, inhibidores de topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca y taxanos.

Ejemplos específicos de moléculas pequeñas incluyen clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalán, procarbazona, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfán, daunorrubicina, doxorubicina, gefitinib, erlotinib, idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecinas, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus,

everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, y paclitaxel y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

5 Ejemplos adicionales de moléculas pequeñas incluyen aquellas que se dirigen a las proteínas cinasas para el tratamiento de trastornos del sistema nervioso (por ejemplo, SNC), incluyendo imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudilo, SB-681323 y semaxanib (SU5416) (véase Chico et al., Nat Rev Drug Discov. 8:829-909, 2009). Ejemplos de moléculas pequeñas también incluyen donepezil, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasigilina, naltrexona, lubiprostone, safinamida, istradefilina, pimavanserina, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina y bexaroteno (p. 10 ej., para tratar la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington); y acetato de glatirámico, fingolimod, mitoxantrona (p.ej., para tratar la EM). También se incluyen sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

15 Ejemplos adicionales de moléculas pequeñas incluyen agentes alquilantes tales como tiotepa, ciclofosfamida (CYTOXAN™); alquilsulfonatos tales como busulfán, improsulfán y piposulfán; aziridinas tales como benzodopa, carbocouona, meturedopa, y uredopa; etileniminas y metilmelaminas incluyendo altretamina, trietilenmelamina, trietilenfosforamida, trietilentiofosforamida y trimetilolmelamina; mostazas de nitrógeno tales como clorambucilo, clornafazina, colofosfamida, estramustina, ifosfamida, mecloretamina, clorhidrato de óxido de mecloretamina, melfalán, novembiquina, fenesterina, prednimustina, trofosfamida, mostaza de uracilo; nitrosoureas, tales como 20 carmustina, clorozotocina, fotemustina, lomustina, nimustina, ranimustina; antibióticos, tales como aclacinomisin, actinomicina, autramicina, azaserina, bleomicinas, cactinomicina, calicamicina, carabicina, carminomicina, carcinofilina, cromomicinas, dactinomicina, daunorubicina, detorubicina, 6-diazo-5-oxo-L-norleucina, doxorubicina, epirubicina, esorubicina, idarubicina, marcelomicina, mitomicinas, ácido micofenólico, nogalamicina, olivomicinas, peplomycin, potfiromicina, puromicina, quelamicina, rodorubicina, estreptonigrina, estreptozocina, tubercidina, 25 ubenimex, zinostatina, zorrubicina; antimetabolitos tales como metotrexato y 5-fluorouracilo (5-FU); análogos del ácido fólico tales como denopterina, metotrexato, pteropterina, trimetrexato; análogos de purina tales como fludarabina, 6-mercaptopurina, tiampirina, tioguanina; análogos de pirimidina tales como ancitabina, azacitidina, 6-azauridina, carmofur, citarabina, didesoxiuridina, doxilfluridina, encitabina, floxuridina, 5-FU; andrógenos, tales como calusterona, propionato de dromostanolona, epitioestano, mepitioestano, testolactona; antiadrenales tales como aminoglutetimida, mitotano, trilostano; reabastecedor del ácido fólico tal como ácido frolinico; aceglatona; glucósido de aldofosfamida; ácido aminolevulínico; amsacrina; bestabucilo; bisantreno; edatraxato; defofamina; demecolcina; diazicuona; elformitina; acetato de eliptinio; etoglúcido; nitrato de galio; hidroxurea; lentinano; lonidamina; mitoguazona; mitoxantrona; mopidamol; nitracrina; pentostatina; fenamet; pirarubicina; ácido podofilínico; 2- 35 etilhidrazida; procarbazona; PSK; razoxana; sizofirán; espirogermanio; ácido tenuazónico; triazicuona; 2,2',2"-triclortrietilamina; uretano; vindesina; dacarbazina; manomustina; mitobronitol; mitolactol; pipobromano; gacitosina; arabinósido ("Ara-C"); ciclofosfamida; tiotepa; taxoides, p.ej. paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) y doxetaxel (TAXOTERE®, Rhne-Poulenc Rorer, Antony, Francia); clorambucilo; gemcitabina; 6-tioguanina; mercaptopurina; metotrexato; análogos de platino tales como cisplatino y carboplatino; vinblastina; platino; etopósido (VP-16); ifosfamida; mitomicina C; mitoxantrona; vincristina; vinorelbina; navelbina; novantrona; 40 tenipósido; daunomicina; aminopterina; xeloda; ibandronato; CPT-11; inhibidor de la topoisomerasa RFS 2000; difluorometilornitina (DMFO); derivados de ácido retinoico tales como Targretin™ (bexaroteno), Panretin™ (alitretinoína); ONTAK™ (denileucina difitox); esperamicinas; capecitabina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

45 También se incluyen agentes antihormonales que actúan para regular o inhibir la acción hormonal sobre tumores tales como antiestrógenos, incluyendo, por ejemplo, tamoxifeno, raloxifeno, 4(5)-imidazoles que inhiben la aromatasa, 4-hidroxitamoxifeno, trioxifeno, keoxifeno, LY117018, onapristona y toremifeno (Fareston); y antiandrógenos tales como flutamida, nilutamida, bicalutamida, leuprolida, y goserelina; y sales, ácidos o derivados farmacéuticamente aceptables de cualquiera de los anteriores.

50 Como se señala anteriormente, en determinados aspectos, la molécula pequeña es un agente cardiotóxico de otra manera. Ejemplos particulares de moléculas pequeñas cardiotóxicas incluyen, sin limitación, antraciclinas/antraquinolonas, ciclofosfamidas, antimetabolitos, agentes antimicrotúbulos e inhibidores de tirosinas cinasa. Ejemplos específicos de agentes cardiotóxicos incluyen ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, 55 paclitaxel, docataxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfán, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona y mitoxantrona, entre otras moléculas pequeñas descritos en el presente documento y conocidas en la técnica.

60 Agentes Polipeptídicos. En realizaciones particulares, el agente de interés es un péptido o polipéptido. Los "péptido" y "polipéptido" se usan indistintamente en el presente documento, sin embargo, en determinados casos, el término "péptido" puede referirse a polipéptidos más cortos, por ejemplo, polipéptidos que consisten en aproximadamente 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 aminoácidos, incluidos todos los 65 números enteros e intervalos (p. ej., 5-10, 8-12, 10-15) entre ellos. Los polipéptidos y péptidos pueden estar compuestos de aminoácidos de origen natural y/o aminoácidos de origen no natural, tal como se describe en el presente documento. Los anticuerpos también se incluyen como polipéptidos.

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

Determinadas realizaciones incluyen polipéptidos tales como polipéptidos de interferón- β , tales como interferón- β 1a (por ejemplo, AVONEX, REBIF) e interferón- β 1b (por ejemplo, Betaseron), que con frecuencia se usan para el tratamiento de la esclerosis múltiple (EM).

En algunas realizaciones, como se señala anteriormente, el agente polipeptídico es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo. El anticuerpo o fragmento de unión a antígeno usado en los conjugados o composiciones de la presente invención puede ser esencialmente de cualquier tipo. Ejemplos particulares incluyen anticuerpos terapéuticos y de diagnóstico. Como es bien conocido en la técnica, un anticuerpo es una molécula de inmunoglobulina capaz de unirse de forma específica a una diana, tal como un hidrato de carbono, polinucleótido, lípido, polipéptido, etc., a través de al menos un sitio de reconocimiento de epítomos, ubicado en la región variable de la molécula de inmunoglobulina.

Como se usa en el presente documento, el término "anticuerpo" abarca no solamente anticuerpos policlonales o monoclonales intactos, sino también fragmentos de los mismos (tales como dAb, Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (ScFv), variantes sintéticas de los mismos, variantes de origen natural, proteínas de fusión que comprenden una parte de anticuerpo con un fragmento de unión a antígeno de la especificidad requerida, anticuerpos humanizados, anticuerpos quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un sitio o fragmento (sitio de reconocimiento de epítomo) de unión a antígeno de la especificidad requerida.

La expresión "fragmento de unión a antígeno" como se usa en el presente documento se refiere a un fragmento polipeptídico que contiene al menos una CDR de una cadena pesada y/o ligera de inmunoglobulina que se une al antígeno de interés. En este sentido, un fragmento de unión a antígeno de los anticuerpos descritos en el presente documento puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o las 6 CDR de una secuencia VH y VL de anticuerpos que se unen a una diana terapéutica o de diagnóstico.

El término "antígeno" se refiere a una molécula o una parte de una molécula capaz de unirse por un agente de unión selectiva, tal como un anticuerpo, y adicionalmente capaz de usarse en un animal para producir anticuerpos capaces de unirse a un epítomo de ese antígeno. Un antígeno puede tener uno o más epítomos.

El término "epítomo" incluye cualquier determinante, preferentemente un determinante polipeptídico, capaz de unirse específicamente a una inmunoglobulina o receptor de linfocitos T. Un epítomo es una región de un antígeno a la que se une un anticuerpo. En determinadas realizaciones, los determinantes del epítomo pueden incluir agrupaciones superficiales químicamente activas de moléculas tales como aminoácidos, cadenas laterales de azúcar, grupos fosforilo o sulfonilo, y pueden, en determinadas realizaciones, tener características estructurales tridimensionales específicas y/o características de carga específicas. Los epítomos pueden ser contiguos o no contiguos en relación con la estructura primaria del antígeno.

Se dice que una molécula tal como un anticuerpo muestra "unión específica" o "unión preferente" si reacciona o se asocia más frecuentemente, más rápidamente, con mayor duración y/o con mayor afinidad con una célula o sustancia particular que con células o sustancias alternativas. Un anticuerpo "se une específicamente" o "se une preferentemente" a una diana si se une con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otras sustancias. Por ejemplo, un anticuerpo que se une específica o preferentemente a un epítomo específico es un anticuerpo que se une a ese epítomo específico con mayor afinidad, avidez, más fácilmente y/o con mayor duración de lo que se une a otros epítomos. También se entiende al leer esta definición que, por ejemplo, un anticuerpo (o resto o epítomo) que se une específica o preferentemente a una primera diana puede o no unirse específica o preferentemente a una segunda diana. Como tal, la "unión específica" o la "unión preferente" no necesariamente requieren (aunque puede incluir) una unión exclusiva. Por lo general, pero no necesariamente, preferencia a la unión significa unión preferente.

La unión inmunitaria generalmente se refiere a las interacciones no covalentes del tipo que se producen entre una molécula de inmunoglobulina y un antígeno para el cual la inmunoglobulina es específica, por ejemplo, a modo de ilustración y no de limitación, como resultado de atracciones o repulsiones electrostáticas, iónicas, hidrófilas y/o hidrófobas, iónicas, fuerzas estéricas, enlaces de hidrógeno, fuerzas de van der Waals y otras interacciones. La fuerza o afinidad de las interacciones de unión inmunitaria se puede expresar en términos de la constante de

disociación (K_d) de la interacción, en donde una K_d más pequeño representa una mayor afinidad. Las propiedades de unión inmunitaria de los polipéptidos seleccionados se pueden cuantificar usando procedimientos bien conocidos en la técnica. Uno de estos procedimientos implica medir las tasas de formación y disociación del complejo sitio de unión a antígeno/antígeno, en donde esas tasas dependen de las concentraciones de los compañeros de complejo, de la afinidad de la interacción y de los parámetros geométricos que influyen igualmente en la tasa en ambas direcciones. Por lo tanto, tanto la "constante de asociación" (K_{on}) como la "constante de disociación" (K_{off}) se pueden determinar mediante el cálculo de las concentraciones y las tasas reales de asociación y disociación. La relación de K_{off}/K_{on} permite la cancelación de todos los parámetros no relacionados con la afinidad y, por lo tanto, es igual a la constante de disociación K_d .

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

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

En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado con cáncer o antígeno de cáncer. Antígenos de cáncer ejemplares incluyen proteínas de la superficie celular tales como receptores de la superficie celular. También se incluyen como antígenos asociados a cáncer los ligandos que se unen a dichas proteínas o receptores de la superficie celular. En realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a un antígeno de cáncer intracelular. En algunas realizaciones, el cáncer que se asocia con el antígeno de cáncer es uno o más de cáncer de mama, cáncer cerebral metastásico, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, cáncer del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, tumor epitelial, cáncer de hueso o un cáncer hematopoyético.

En realizaciones particulares, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido se une específicamente a, al menos, un antígeno asociado con cáncer o antígeno de cáncer, tal como HER2/neu, Her1/receptor de EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23(Receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (p. ej., VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R), alfafetoproteína, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteína EpCAM (17-1A), Muerte Programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano-3 (GPC3) y/o mesotelina humanos.

En realizaciones específicas, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo u otro polipéptido se une específicamente a la proteína Her2/neu humana. Esencialmente, puede usarse cualquier anticuerpo fragmento de unión a antígeno anti-Her2/neu, u otro agente de unión específica de Her2/neu en la producción de los conjugados p97-anticuerpo de la presente invención. Se describen anticuerpos anti-Her2/neu ilustrativos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Números 5.677.171; 5.720.937; 5.720.954; 5.725.856; 5.770.195; 5.772.997; 6.165.464; 6.387.371; y 6.399.063.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo u otro polipéptido se une específicamente a Her1/EGFR humano (receptor del factor de crecimiento epidérmico). Esencialmente, se puede usar cualquier anticuerpo, fragmento de unión a antígeno anti-Her1/EGFR, u otro agente de unión específica de Her1-EGFR en la producción de los conjugados p97-anticuerpo de la presente invención. Se describen anticuerpos anti-Her1-EGFR ilustrativos, por ejemplo, en las patentes de Estados Unidos Números 5.844.093; 7.132.511;

7.247.301; 7.595.378; 7.723.484; 7.939.072; y 7.960.516.

En determinadas realizaciones, el anticuerpo es un anticuerpo terapéutico, tal como un anticuerpo terapéutico anticanceroso, incluyendo anticuerpos tales como 3F8, 8H9, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, 5 alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatuzumab (mertansina), brentuximab vedotina, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, cetuximab, citatuzumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetán), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, 10 flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicina), girentuximab, glembatumumab (vedotina), ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, intetumumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatuzumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, 15 nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radiactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pemtumomab, pertuzumab, pritumumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, trastuzumab, tucotuzumab (celmoleucina), 20 ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab y zalutumumab. También se incluyen fragmentos, variantes y derivados de estos anticuerpos.

En realizaciones particulares, el anticuerpo es un anticuerpo cardiotoxico, es decir, un anticuerpo que presenta 25 cardiotoxicidad cuando se administra en forma sin conjugar. Ejemplos específicos de anticuerpos que muestran cardiotoxicidad incluyen trastuzumab y bevacizumab.

En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-Her2/neu usado en un conjugado de p97 es trastuzumab (Herceptin®), o un fragmento, variante o derivado del mismo. Herceptin® es un anticuerpo monoclonal específico de 30 Her2/neu aprobado para el tratamiento del cáncer de mama humano. En determinadas realizaciones, un fragmento de unión a antígeno de unión a Her2/neu comprende una o más de las CDR de un anticuerpo de Her2/neu. En este sentido, se ha demostrado en algunos casos que puede realizarse la transferencia de solo la CDR3 de VH de un anticuerpo conservándose mientras la unión específica deseada (Barbas et al., PNAS. 92: 2529-2533, 1995). Véase también, McLane et al., PNAS EE.UU. 92:5214-5218, 1995; y Barbas et al., J. Am. Chem. Soc. 116:2161-2162, 1994.

En otras realizaciones específicas, el anticuerpo anti-Her1/EGFR usado en un conjugado de la invención es cetuximab (Erbix®), o un fragmento o derivado del mismo. En determinadas realizaciones, un fragmento de unión 35 anti-Her1/EGFR comprende una o más de las CDR de un anticuerpo de Her1/EGFR tal como cetuximab. Cetuximab está aprobado para el tratamiento del cáncer de cabeza y cuello y cáncer colorrectal. Cetuximab está compuesto por las regiones Fv (variable; unión a antígeno) de los 225 anticuerpos monoclonales EGFR murinos específicos para la porción N-terminal de EGFR humano con regiones constantes (marco) de la cadena pesada de IgG1 y ligera kappa humanas.

En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido se une específicamente a 45 un antígeno asociado con (por ejemplo, el tratamiento de) al menos un trastorno del sistema nervioso, incluidos trastornos del trastorno del sistema nervioso periférico y/o central (SNC). En determinadas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un antígeno asociado con (por ejemplo, el tratamiento de) dolor, incluyendo dolor agudo, dolor crónico y dolor neuropático. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido se une específicamente a un 50 antígeno asociado con (*por ejemplo*, el tratamiento de) un trastorno autoinmunitario, incluyendo trastornos autoinmunitarios del sistema nervioso o SNC.

Ejemplos de antígenos asociados con el sistema nervioso, con el dolor y/o con la autoinmunidad incluyen, sin limitación, alfa-4 ($\alpha 4$) integrina, CD20, CD52, IL-12, IL-23, la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, y los inhibidores del rebrote axonal y de remielinización Nogo-A y LINGO, IL-23, amiloide- β (e.g. $A\beta_{(1-42)}$), Huntingtina, CD25 (es decir, la 55 cadena alfa del receptor de IL-2), factor de crecimiento nervioso (NGF), receptor de tirosina cinasa neurotrófico tipo 1 (TrkA; el receptor catalítico de alta afinidad para NGF) y α -sinucleína. Estas y otras dianas se han considerado útiles en el tratamiento de una variedad de trastornos del sistema nervioso, del dolor y/o autoinmunitarios, tal como la esclerosis múltiple (integrina $\alpha 4$, IL-23, CD25, CD20, CD52, IL-12, IL-23, la subunidad p40 de IL-12 e IL-23, y los inhibidores del rebrote axonal y de remielinización Nogo-A y LINGO), la enfermedad de Alzheimer ($A\beta$), la enfermedad de Huntington (Huntingtina), la enfermedad de Parkinson (α -sinucleína) y el dolor (NGF y TrkA).

En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-CD25 usado en un conjugado de p97 es daclizumab (es decir, Zenapax™), o un fragmento, variante o derivado del mismo. Daclizumab es un anticuerpo monoclonal humanizado 65 que se une específicamente a CD25, la subunidad alfa del receptor de IL-2. En otras realizaciones, el anticuerpo es rituximab, ocrelizumab, ofatumumab, o una variante o fragmento de los mismos que se une específicamente a

CD20. En realizaciones particulares, el anticuerpo es alemtuzumab, o una variante o fragmento del mismo que se une específicamente a CD52. En determinadas realizaciones, el anticuerpo es ustekinumab (CNTO 1275), o una variante o fragmento del mismo que se une específicamente a la subunidad p40 de IL-12 e IL-23.

5 En realizaciones específicas, el anticuerpo anti-NGF usado en un conjugado es tanezumab, o un fragmento, variante o derivado del mismo. Tanezumab se une específicamente a NGF y evita que el NGF se una a su cinasa A (TrkA) relacionada con el receptor catalítico de la tropomiosina de alta afinidad, unido a la membrana, que está presente en las neuronas simpáticas y sensoriales; se cree que la estimulación reducida de TrkA por NGF inhibe las actividades de transmisión del dolor de tales neuronas.

10 En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo u otro polipéptido (por ejemplo, molécula tipo inmunoglobulina, receptor soluble, ligando) se une específicamente a una molécula proinflamatoria, por ejemplo, una citocina o quimiocina proinflamatoria. En estas y otras realizaciones relacionadas, el conjugado de p97 puede usarse para tratar una variedad de afecciones inflamatorias, tal como se describe en el presente documento. Ejemplos de moléculas proinflamatorias incluyen factores de necrosis tumoral (TNF) tales como TNF- α y TNF- β , moléculas de la superfamilia de TNF como FasL, CD27L, CD30L, CD40L, Ox40L, 4-1BBL, TRAIL, TWEAK, y Apo3L, interleucina-1 (IL-1) incluyendo IL-1 α e IL-1 β , IL-2, interferón- γ (IFN- γ), IFN- α/β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, CCL5, GRO α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , factor estimulante de colonias de macrófagos (MCSF), factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), CXCL2, CCL2, entre otros. En algunas realizaciones, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un receptor de una o más de las moléculas proinflamatorias anteriores, tal como el receptor de TNF (TNFR), un receptor de IL-1 (IL-1R) o un receptor de IL-6 (IL-6R), entre otros.

25 En realizaciones específicas, como se señala anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno u otro polipéptido se une específicamente a TNF- α o TNF- β . En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-TNF u otro polipéptido de unión a TNF es adalimumab (Humira®), certolizumab pegol (Cimzia®), etanercept (Enbrel®), golimumab (Cimzia®) o infliximab (Remicade®), D2E7, CDP 571, o CDP 870, o un fragmento de unión a antígeno o una variante de los mismos. En algunas realizaciones, el polipéptido de unión a TNF es un receptor o ligando soluble, tal como TNFRSF10B, TRAIL (es decir, CD253), TNFSF10, TRADD (proteína del dominio DEATH asociado con el receptor del factor de necrosis tumoral tipo 1), TRAF (factores asociados al receptor de TNF, incluidos TRAF 1-7) o RIP (proteínas de inactivación de ribosomas). Los conjugados que comprenden un anticuerpo anti-TNF o un polipéptido de unión a TNF pueden usarse, por ejemplo, en el tratamiento de diversas afecciones inflamatorias, tal como se describe en el presente documento. Dichos conjugados de p97 también pueden usarse en el tratamiento de diversas afecciones o trastornos neurológicos tales como la enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis espinal, lesión aguda de la médula espinal y compresión de la médula espinal (véanse las Patentes de Estados Unidos Números 6.015.557; 6.177.077; 6.419.934; 6.419.944; 6.537.549; 6.982.089; y 7.214.658).

40 En realizaciones específicas, como se señala anteriormente, el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno se une específicamente a IL-1 α o IL-1 β . En realizaciones particulares, el anticuerpo anti-IL-1 es canakinumab o gevokizumab, o una variante o fragmento de los mismos que se une específicamente a IL-1 β . Entre otras afecciones inflamatorias descritas en el presente documento, los conjugados de p97 que comprenden un anticuerpo anti-IL-1 se pueden usar para tratar síndromes periódicos asociados a la criopirina (CAPS por sus siglas en inglés), incluido el síndrome autoinflamatorio familiar por frío, el síndrome de Muckle-Wells y la enfermedad inflamatoria multisistémica de inicio neonatal.

50 Los anticuerpos pueden prepararse mediante cualquiera de una variedad de técnicas conocidas por los expertos en la materia. Véase, por ejemplo, Harlow y Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1988. Los anticuerpos monoclonales específicos para un polipéptido de interés pueden prepararse, por ejemplo, usando la técnica de Kohler y Milstein, *Eur. J. Immunol.* 6:511-519, 1976, y mejoras de las mismas. También se incluyen procedimientos que utilizan animales transgénicos no humanos tales como ratones para expresar anticuerpos humanos. Véase, por ejemplo, Neuberger et al., *Nature Biotechnology* 14:826, 1996; Lonberg et al., *Handbook of Experimental Pharmacology* 113:49-101, 1994; y Lonberg et al., *Internal Review of Immunology* 13:65-93, 1995. Ejemplos particulares incluyen la plataforma VELOCIMMUNE® de REGENEREX® (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 6.596.541).

60 Los anticuerpos también se pueden generar o identificar mediante el uso de bibliotecas de presentación en fagos o de presentación en levaduras (véase, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 7.244.592; Chao et al., *Nature Protocols*. 1:755-768, 2006). Ejemplos no limitantes de bibliotecas disponibles incluyen bibliotecas clonadas o sintéticas, tal como la Biblioteca de Anticuerpos Combinatorios Humanos (HuCAL por sus siglas en inglés, Human Combinatorial Antibody Library), en la que la diversidad estructural del repertorio de anticuerpos humanos está representada por siete genes de región variable de cadena pesada y siete de cadena ligera. La combinación de estos genes da lugar a 49 regiones marco en la biblioteca maestra. Al superponer casetes genéticos altamente variables (CDR = regiones determinantes de la complementariedad) en estas regiones marco, se puede reproducir el inmenso repertorio de anticuerpos humanos. También se incluyen bibliotecas humanas diseñadas con fragmentos de origen donante humano que codifican una región variable de cadena ligera, una CDR-3 de cadena pesada, ADN

sintético que codifica la diversidad en CDR-1 de cadena pesada y ADN sintético que codifica la diversidad en CDR-2 de cadena pesada. Otras bibliotecas adecuadas para su uso serán evidentes para los expertos en la materia. Los polipéptidos de p97 descritos en el presente documento y conocidos en la técnica pueden usarse en el proceso de purificación, por ejemplo, en una etapa de cromatografía por afinidad.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos y los fragmentos de unión a antígeno de los mismos, tal como se describe en el presente documento, incluyen un conjunto de CDR de cadena pesada y de cadena ligera, respectivamente intercaladas entre un conjunto de región marco (FR) de cadena pesada y de cadena ligera que proporciona soporte a las CDR y que define la relación espacial de las CDR unas respecto de otras. Como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de CDR" se refiere a las tres regiones hipervariables de una región V de cadena pesada o ligera. Desde el extremo N de una cadena pesada o ligera, estas regiones se denominan "CDR1", "CDR2", y "CDR3" respectivamente. Un sitio de unión a antígeno, por lo tanto, incluye seis CDR, que comprenden el conjunto de CDR procedente de cada región V de cadena pesada y ligera. Un polipéptido que comprende una sola CDR, (por ejemplo, una CDR1, CDR2 o CDR3) en el presente documento se denomina "unidad de reconocimiento molecular". El análisis cristalográfico de varios complejos antígeno-anticuerpo ha demostrado que los restos de aminoácidos de las CDR forman un contacto extenso con el antígeno unido, en donde el contacto con el antígeno más extenso es con la CDR3 de cadena pesada. Por lo tanto, las unidades de reconocimiento molecular son las principales responsables de la especificidad de un sitio de unión a antígeno.

20 Como se usa en el presente documento, la expresión "conjunto de FR" se refiere a las cuatro secuencias de aminoácidos flanqueantes que enmarcan las CDR de un conjunto de CDR de una región V de cadena pesada o ligera. Algunos restos de las FR pueden estar en contacto con el antígeno unido; sin embargo, las FR son principalmente responsables del plegamiento de la región V dentro del sitio de unión a antígeno, especialmente los restos de las FR directamente adyacentes a las CDR. Dentro de las FR, determinados restos de aminoácidos y algunas características estructurales están muy fuertemente conservadas. En este sentido, todas las secuencias de regiones V contienen un bucle disulfuro interno de aproximadamente 90 restos de aminoácidos. Cuando las regiones V se pliegan en un sitio de unión, las CDR se presentan como motivos de bucle sobresalientes que forman una superficie de unión a antígeno. Se reconoce generalmente que existen regiones estructurales conservadas de FR que afectan el estado de plegamiento de los bucles de las CDR en determinadas estructuras "canónicas", independientemente de la secuencia precisa de aminoácidos de las CDR. Además, se sabe que determinados restos de las FR participan en contactos interdominio no covalentes que estabilizan la interacción de las cadenas pesada y ligera de los anticuerpos.

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

40 Un "anticuerpo monoclonal" se refiere a una población de anticuerpos homogénea en donde el anticuerpo monoclonal comprende aminoácidos (de origen natural, y de origen no natural) que están implicados en la unión selectiva de un epítipo. Los anticuerpos monoclonales son muy específicos, estando dirigidos contra un solo epítipo. La expresión "anticuerpo monoclonal" abarca no solo anticuerpos monoclonales intactos y anticuerpos monoclonales de longitud completa, sino también fragmentos de los mismos (tales como Fab, Fab', F(ab')₂, Fv), monocatenarios (ScFv), sus variantes, proteínas de fusión que comprenden una porción de unión a antígeno, anticuerpos monoclonales humanizados, anticuerpos monoclonales quiméricos, y cualquier otra configuración modificada de la molécula de inmunoglobulina que comprende un fragmento de unión a antígeno (sitio de reconocimiento de epítipo) de la especificidad y la capacidad de unión a un epítipo requeridas. No se pretende que esté limitado con respecto a la fuente del anticuerpo o la forma en que este se fabrica (por ejemplo, mediante hibridoma, selección de fagos, expresión recombinante, animales transgénicos no humanos). La expresión incluye inmunoglobulinas completas, así como los fragmentos, etc., descritos anteriormente en la definición de "anticuerpo".

50 La enzima proteolítica papaína escinde preferentemente moléculas de IgG para producir varios fragmentos, dos de los cuales (los fragmentos F(ab)) comprenden cada uno un heterodímero covalente que incluye un sitio de unión a antígeno intacto. La enzima pepsina es capaz de escindir moléculas de IgG para proporcionar varios fragmentos, incluido el fragmento F(ab')₂ que comprende ambos sitios de unión a antígeno. Se puede producir un fragmento Fv para su uso de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención por escisión proteolítica preferente de una IgM, y en raras ocasiones de una molécula de inmunoglobulina IgG o IgA. Sin embargo, los fragmentos Fv se obtienen más comúnmente usando técnicas recombinantes conocidas en la técnica. El fragmento Fv incluye un heterodímero V_H::V_L no covalente que incluye un sitio de unión a antígeno que conserva gran parte del reconocimiento del antígeno y las capacidades de unión de la molécula de anticuerpo natural. Véanse Inbar et al., PNAS EE.UU. 69:2659-2662, 1972; Hochman et al., Biochem. 15:2706-2710, 1976; y Ehrlich et al., Biochem. 19:4091-4096, 1980.

65 En determinadas realizaciones, se contemplan los anticuerpos de cadena sencilla Fv o scFV. Por ejemplo, pueden prepararse cuerpos Kappa (Ill et al., Prot. Eng. 10:949-57, 1997); minicuerpos (Martin et al., EMBO J 13:5305-9, 1994); diacuerpos (Holliger et al., PNAS 90: 6444-8, 1993); o Janusinas (Traunecker et al., EMBO J 10: 3655-59, 1991; y Traunecker et al., Int. J. Cancer Suppl. 7:51-52, 1992), usando técnicas convencionales de biología

molecular siguiendo las enseñanzas de la presente solicitud con respecto a la selección de anticuerpos que tengan la especificidad deseada.

5 Un polipéptido Fv de cadena sencilla ("scFv") es un heterodímero $V_H::V_L$ unido covalentemente que se expresa a partir de una fusión de genes incluyendo genes que codifican V_H y V_L unidos por un enlazador que codifica el péptido. Huston et al. (PNAS USA. 85(16):5879-5883, 1988). Se han descrito varios procedimientos para discernir estructuras químicas para convertir las cadenas polipeptídicas ligera y pesada naturalmente agregadas pero químicamente separadas de una región V de anticuerpo en una molécula de scFv que se plegará en una estructura tridimensional sustancialmente similar a la estructura de un sitio de unión a antígeno. Véase, por ejemplo, las
10 patente de EE.UU. N.º 5.091.513 y 5.132.405, de Huston et al.; y la patente de EE.UU. N.º 4.946.778, de Ladner et al.

En determinadas realizaciones, un anticuerpo como se describe en el presente documento está en forma de un "diacuerpo". Los diacuerpos son multímeros de polipéptidos, comprendiendo cada polipéptido un primer dominio que comprende una región de unión de una cadena ligera de inmunoglobulina y un segundo dominio que comprende una
15 región de unión de una cadena pesada de inmunoglobulina, estando los dos dominios unidos (por ejemplo, mediante un enlazador peptídico) pero no pueden asociarse entre sí para formar un sitio de unión a antígeno: los sitios de unión a antígeno se forman mediante la asociación del primer dominio de un polipéptido dentro del multímero con el segundo dominio de otro polipéptido dentro del multímero (documento WO94/13804). Un fragmento de dAb de un anticuerpo consiste en un dominio VH (Ward et al., Nature 341:544-546, 1989). Los diacuerpos y otros fragmentos multivalentes o multispecíficos pueden construirse, por ejemplo, mediante fusión génica (véanse el documento WO94/13804; y Holliger et al., PNAS EE.UU. 90:6444-6448, 1993)).

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

30 Cuando se van a usar anticuerpos biespecíficos, estos pueden ser anticuerpos biespecíficos convencionales, que se pueden fabricar de diversas maneras (Holliger y Winter, Current Opinion Biotechnol. 4:446-449, 1993), por ejemplo, preparados químicamente o a partir de hibridomas híbridos, o pueden ser cualquiera de los fragmentos de anticuerpos biespecíficos mencionados anteriormente. Los diacuerpos y scFv pueden construirse sin una región Fc, usando solo dominios variables, reduciendo potencialmente los efectos de reacción antiidiotípica.

35 Los diacuerpos biespecíficos, a diferencia de los anticuerpos biespecíficos completos, también pueden ser particularmente útiles porque pueden construirse y expresarse fácilmente en *E. coli*. Los diacuerpos (y muchos otros polipéptidos tales como fragmentos de anticuerpos) de especificidades de unión adecuadas se pueden seleccionar fácilmente usando la presentación en fagos (documento WO94/13804) a partir de bibliotecas. Si un brazo del diacuerpo debe mantenerse constante, por ejemplo, con una especificidad dirigida contra el antígeno X, entonces se
40 puede fabricar una biblioteca en la que se varíe el otro brazo y se selecciona un anticuerpo de especificidad adecuada. Los anticuerpos biespecíficos completos pueden prepararse por ingeniería de botón en ojal (Ridgeway et al., Protein Eng., 9:616-621, 1996).

En determinadas realizaciones, los anticuerpos descritos en el presente documento pueden proporcionarse en forma de UniBody®. UniBody® es un anticuerpo IgG4 con la región bisagra eliminada (véase GenMab Utrecht, Países Bajos; véase también, por ejemplo, el documento US20090226421). Esta tecnología de anticuerpos crea un formato de anticuerpos más pequeños y estable s con una ventana terapéutica anticipada más larga que los formatos de anticuerpos pequeños actuales. Los anticuerpos IgG4 se consideran inertes y, por lo tanto, no interactúan con el sistema inmunitario. Los anticuerpos IgG4 completamente humanos pueden modificarse eliminando la región bisagra del anticuerpo para obtener fragmentos de media molécula que tienen propiedades de estabilidad distintas con respecto a los IgG4 intactos correspondientes (GenMab, Utrecht). Reducir a la mitad la molécula de IgG4 deja solo un área en el UniBody® que puede unirse a antígenos afines (por ejemplo, dianas de enfermedades) y, por lo tanto, el UniBody® se une de manera univalente a un solo sitio en las células diana. Para determinados antígenos de la superficie de células cancerosas, esta unión univalente puede no estimular el crecimiento de las células cancerosas como se puede ver usando anticuerpos bivalentes que tienen la misma especificidad de antígeno, y por lo tanto, la tecnología UniBody® puede ofrecer opciones de tratamiento para algunos tipos de cáncer que pueden ser refractarios a tratamiento con anticuerpos convencionales. El pequeño tamaño de UniBody® puede ser un gran beneficio cuando se tratan algunas formas de cáncer, permitiendo una mejor distribución de la molécula sobre tumores sólidos más grandes y una eficacia potencialmente creciente.

60 En determinadas realizaciones, los anticuerpos proporcionados en el presente documento pueden tomar la forma de un nanocuerpo. Los minicuerpos están codificados por genes únicos y se producen de manera eficaz en casi todos los hospedadores procariontes y eucariotes, por ejemplo, *E. coli* (véase la Patente de Estados Unidos N.º 6.765.087), mohos (por ejemplo, *Aspergillus* o *Trichoderma*) y levaduras (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Kluyvermyces*, *Hansenula* o *Pichia* (véase la Patente de Estados Unidos N.º 6.838.254). El proceso de producción se puede hacer a escala y se han producido cantidades de varios kilogramos de nanocuerpos. Los nanocuerpos pueden formularse

como una solución lista para usar que tenga una larga vida útil. El procedimiento Nanoclone (véase el documento WO 06/079372) es un procedimiento patentado para generar Nanocuerpos contra una diana deseada, basado en la selección automatizada de alto rendimiento de linfocitos B.

5 En determinadas realizaciones, los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno de los mismos son humanizados. Estas realizaciones se refieren a una molécula quimérica, preparada de forma general usando técnicas recombinantes, que tiene un sitio de unión a antígeno derivado de una inmunoglobulina procedente de una especie no humana, y la estructura de inmunoglobulina restante de la molécula basada en la estructura y/o secuencia de una inmunoglobulina humana. El sitio de unión a antígeno puede comprender tanto dominios variables completos
10 fusionados en dominios constantes, o bien solamente las CDR injertadas en regiones marco adecuadas en los dominios variables. Los sitios de unión a epítipo pueden ser de tipo salvaje o estar modificados mediante una o más sustituciones de aminoácidos. Esto elimina la región constante como inmunógeno en individuos humanos, pero conserva la posibilidad de una respuesta inmunitaria a la región variable extraña (LoBuglio et al., PNAS USA 86:4220-4224, 1989; Queen et al., PNAS EE.UU. 86:10029-10033, 1988; Riechmann et al., Nature. 332:323-327,
15 1988). Los procedimientos ilustrativos para la humanización de anticuerpos incluyen los procedimientos descritos en la Patente de Estados Unidos N.º 7.462.697.

Otro enfoque se centra no solamente en proporcionar regiones constantes derivadas de regiones humanas, sino en la modificación de las regiones variables, así como en reconfigurarlas tan estrechamente como sea posible a la forma humana. Se sabe que las regiones variables de las cadenas tanto pesada como ligera contienen tres regiones determinantes de la complementariedad (CDR) que varían en respuesta a los epítopos en cuestión y determinan la capacidad de unión, flanqueadas por cuatro regiones marco (FR) que están relativamente conservadas en una especie dada y que supuestamente proporcionan un armazón para las CDR. Cuando se preparan anticuerpos no humanos con respecto a un epítipo particular, las regiones variables se pueden "reconfigurar" o "humanizar"
20 injertando CDR derivadas de anticuerpo no humano en las FR presentes en el anticuerpo humano a modificar. La aplicación de este enfoque a varios anticuerpos ha sido informada por Sato et al., Cancer Res. 53:851-856, 1993; Riechmann et al., Nature 332:323-327, 1988; Verhoeyen et al., Science 239:1534-1536, 1988; Kettleborough et al., Protein Engineering. 4:773-3783, 1991; Maeda et al., Human Antibodies Hybridoma 2:124-134, 1991; Gorman et al., PNAS EE.UU. 88:4181-4185, 1991; Tempest et al., Bio/Technology 9:266-271, 1991; Co et al., PNAS EE.UU. 88:2869-2873, 1991; Carter et al., PNAS EE.UU. 89:4285-4289, 1992; y Co et al., J Immunol. 148:1149-1154, 1992. En algunas realizaciones, los anticuerpos humanos conservan todas las secuencias de CDR (por ejemplo, un anticuerpo de ratón humanizado que contiene las seis CDR procedentes de anticuerpos de ratón). En otras realizaciones, los anticuerpos humanizados tienen una o más CDR (una, dos, tres, cuatro, cinco, seis) que se han alterado con respecto al anticuerpo original, que también se denominan una o más CDR "derivadas de" una o más
30 CDR del anticuerpo original.

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

Péptido Mimético. Determinadas realizaciones emplean "péptidos miméticos". Los análogos peptídicos se usan comúnmente en la industria farmacéutica como fármacos no peptídicos con propiedades análogas a las del péptido
50 plantilla. Estos tipos de compuestos no peptídicos se denominan "péptidos miméticos" o "peptidomiméticos" (Luthman et al., A Textbook of Drug Design and Development, 14:386-406, 2ª Ed., Harwood Academic Publishers, 1996; Joachim Grante, Angew. Chem. Int. Ed. Engl., 33:1699-1720, 1994; Fauchere, Adv. Drug Res., 15:29, 1986; Veber y Freidinger TINS, p. 392 (1985); y Evans et al., J. Med. Chem. 30:229, 1987). Un peptidomimético es una molécula que imita la actividad biológica de un péptido pero ya no es de naturaleza química peptídica. Los compuestos peptidomiméticos son bien conocidos en la técnica, y se describen, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 6.245.886.

Un péptido mimético puede tener las características de "unión específica" descritas para anticuerpos (*supra*). Por ejemplo, un péptido mimético puede unirse específicamente a una diana descrita en el presente documento con una afinidad de unión (K_d) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 o 50 nM. En determinadas realizaciones, un péptido mimético se une específicamente a un receptor de la superficie celular o a otra proteína de la superficie celular. En algunas realizaciones, el péptido mimético se une específicamente a al menos un antígeno asociado con cáncer descrito en el presente documento. En realizaciones particulares, el péptido mimético se une específicamente a al menos un antígeno asociado con el sistema nervioso, asociado con el dolor
65

y/o asociado con la autoinmunidad descrito en el presente documento.

Peptoides. Los conjugados de la presente invención también incluyen "peptoides". Los derivados peptoides de los péptidos representan otra forma de péptidos modificados que conservan los determinantes estructurales importantes para la actividad biológica, pero eliminan los enlaces peptídicos, confiriendo, así, resistencia a la proteólisis (Simon, et al., PNAS EE.UU. 89:9367-9371, 1992). Los peptoides son oligómeros de glicinas N-sustituidas. Se han descrito varios grupos N-alquilo, correspondiendo cada uno a la cadena lateral de un aminoácido natural. Los peptidomiméticos de la presente invención incluyen compuestos en los que al menos un aminoácido, algunos aminoácidos o todos los restos de aminoácidos se reemplazan por las correspondientes glicinas N-sustituidas. Se describen bibliotecas de peptoides, por ejemplo, en la Patente de Estados Unidos N.º 5.811.387.

Un peptoide puede tener las características de "unión específica" descritas para anticuerpos (*supra*). Por ejemplo, un peptoide puede unirse específicamente a una diana descrita en el presente documento con una afinidad de unión (K_d) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 o 50 nM. En determinadas realizaciones, un peptoide se une específicamente a un receptor de la superficie celular o a otra proteína de la superficie celular. En algunas realizaciones, el peptoides se une específicamente a al menos un antígeno asociado con cáncer descrito en el presente documento. En realizaciones particulares, el peptoide se une específicamente a al menos un antígeno asociado con el sistema nervioso, asociado con el dolor y/o asociado con la autoinmunidad descrito en el presente documento.

Aptámeros. Los conjugados de p97 de la presente invención también incluyen aptámeros (véase, por ejemplo, Ellington et al., Nature. 346, 818-22, 1990; y Tuerk et al., Science. 249, 505-10, 1990). Ejemplos de aptámeros incluyen aptámeros de ácidos nucleicos (*por ejemplo*, aptámeros de ADN, aptámeros de ARN) y aptámeros peptídicos. Los aptámeros de ácidos nucleicos se refieren generalmente a especies de ácidos nucleicos que han sido modificadas por ingeniería mediante rondas repetidas de selección *in vitro* o un procedimiento equivalente, tal como SELEX (evolución sistemática de ligandos por enriquecimiento exponencial), para unirse a varias dianas moleculares, tal como moléculas pequeñas, proteínas, ácidos nucleicos e incluso células, tejidos y organismos. Véanse, por ejemplo, las patentes de Estados Unidos números 6.376.190; y 6.387.620.

Los aptámeros peptídicos generalmente incluyen un bucle peptídico variable unido en ambos extremos a un armazón proteico, una restricción estructural doble que generalmente aumenta la afinidad de unión del aptámero peptídico a niveles comparables a los de un anticuerpo (por ejemplo, en el intervalo nanomolar). En determinadas realizaciones, la longitud variable del bucle puede estar compuesta de aproximadamente 10-20 aminoácidos (incluidos todos los números enteros entre ellos), y el armazón puede incluir cualquier proteína que tenga buenas propiedades de solubilidad y compatibilidad. Determinadas realizaciones ejemplares pueden utilizar la proteína bacteriana Tiorredoxina-A como proteína de armazón, insertándose el bucle variable dentro del sitio activo reductor (-Cys-Gly-Pro-Cys-bucle en la proteína silvestre), siendo las dos cadenas laterales de cisteínas capaces de formar un puente disulfuro. Los procedimientos para identificar aptámeros peptídicos se describen, por ejemplo, en la Solicitud de Estados Unidos N.º 2003/0108532.

Un aptámero puede tener las características de "unión específica" descritas para anticuerpos (*supra*). Por ejemplo, un aptámero puede unirse específicamente a una diana descrita en el presente documento con una afinidad de unión (K_d) de al menos aproximadamente 0,01, 0,05, 0,1, 0,2, 0,3, 0,4, 0,5, 0,6, 0,7, 0,8, 0,9, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 40 o 50 nM. En realizaciones particulares, un aptámero se une específicamente a un receptor de la superficie celular o a otra proteína de la superficie celular. En algunas realizaciones, el aptámero se une específicamente a al menos un antígeno asociado con cáncer descrito en el presente documento. En realizaciones particulares, el aptámero se une específicamente a al menos un antígeno asociado con el sistema nervioso, asociado con el dolor y/o asociado con la autoinmunidad descrito en el presente documento.

Entidades Detectables. En algunas realizaciones, el fragmento de p97 se conjuga con una "entidad detectable". Entidades detectables ejemplares incluyen, sin limitación, marcadores basados en yodo, radioisótopos, fluoróforos/tintes fluorescente y nanopartículas.

Ejemplos de marcadores basados en yodo incluyen ácido diatrizoico (Hypaque®, GE Healthcare) y su forma aniónica, diatrizoato. El ácido diatrizoico es un agente de contraste radiológico utilizado en técnicas avanzadas de rayos X, tal como la exploración por TC. También se incluyen radioisótopos de yodo, descritos a continuación.

Radioisótopos ejemplares que pueden usarse como entidades detectables incluyen ^{32}P , ^{33}P , ^{35}S , ^3H , ^{18}F , ^{11}C , ^{13}N , ^{15}O , ^{111}In , ^{169}Yb , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{59}Fe , e isótopos de yodo tales como ^{123}I , ^{124}I , ^{125}I e ^{131}I . Estos radioisótopos tienen diferentes semividas, tipos de descomposición y niveles de energía que se pueden adaptar para satisfacer las necesidades de un protocolo en particular. Ciertos de estos radioisótopos pueden dirigirse selectivamente o dirigirse mejor a los tejidos del SNC mediante la conjugación con polipéptidos de p97, por ejemplo, para mejorar la obtención de imágenes médicas de dichos tejidos.

Ejemplos de fluoróforos o fluorocromos que se pueden usar como entidades directamente detectables incluyen fluoresceína, tetrametilrodamina, Texas Red, Oregon Green® y otros distintos (por ejemplo, Haugland, Handbook of Fluorescent Probes - 9ª Ed., 2002, Molec. Probes, Inc., Eugene OR; Haugland, The Handbook: A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies-10ª Ed., 2005, Invitrogen, Carlsbad, CA). También se incluyen tintes emisores de luz o detectables de otra manera. La luz emitida por los tintes puede ser luz visible o luz invisible, tal como la luz ultravioleta o infrarroja. En realizaciones ejemplares, el tinte puede ser un tinte de transferencia de energía de resonancia de fluorescencia (FRET); un tinte de xanteno, tal como fluoresceína y rodamina; un tinte que tiene un grupo amino en la posición alfa o beta (tal como un tinte de naftilamina, 1-dimetilaminonaftil-5-sulfonato, 1-anilino-8-naftaleno sulfonato y 2-p-touidil-6-naftaleno sulfonato); un tinte que tiene 3-fenil-7-isocianatocoumarina; una acridina, tal como 9-isotiocianatoacridina y naranja de acridina; un pireno, un bensoxadiazol y un estilbeno; un tinte que tiene 3-(ε-carboxipentil)-3'-etil-5,5'-dimetiloxacarbocianina (CYA); 6-carboxifluoresceína (FAM); 5 y 6-carboxirrodamina-110 (R110); 6-carboxirrodamina-6G (R6G); N,N,N',N'-tetrametil-6-carboxirrodamina (TAMRA); 6-carboxi-X-rodamina (ROX); 6-carboxi-4',5'-dicloro-2', 7'-dimetoxifluoresceína (JOE); ALEXA FLUOR™; Cy2; Texas Red y Rojo Rodamina; 6-carboxi-2',4,7,7'-tetraclorofluoresceína (TET); 6-carboxi-2',4,4',5',7,7'-hexaclorofluoresceína (HEX); 5-carboxi-2',4', 5',7'-tetraclorofluoresceína (ZOE); NAN; NED; Cy3; Cy3.5; Cy5; Cy5.5; Cy7; y Cy7.5; IR800CW, ICG, Alexa Fluor 350; Alexa Fluor 488; Alexa Fluor 532; Alexa Fluor 546; Alexa Fluor 568; Alexa Fluor 594; Alexa Fluor 647; Alexa Fluor 680 o Alexa Fluor 750. Determinadas realizaciones incluyen conjugación con agentes quimioterapéuticos (por ejemplo, paclitaxel, adriamicina) que están marcados con una entidad detectable, tal como un fluoróforo (por ejemplo, Oregon Green®, Alexa Fluor 488).

Las nanopartículas suelen tener un tamaño de aproximadamente 1-1000 nm e incluyen diversas estructuras químicas, tales como partículas de oro y plata y puntos cuánticos. Cuando se irradian con luz blanca incidente en ángulo, las nanopartículas de plata u oro que varían de aproximadamente 40-120 nm dispersarán la luz monocromática con alta intensidad. La longitud de onda de la luz dispersada depende del tamaño de la partícula. De cuatro a cinco partículas diferentes en las proximidades dispersarán cada una luz monocromática, que cuando se superpone dará un color específico y único. Las nanopartículas derivadas tal como las partículas de plata u oro se pueden unir a una amplia gama de moléculas que incluyen, proteínas, anticuerpos, moléculas pequeñas, ligandos receptores y ácidos nucleicos. Ejemplos específicos de nanopartículas incluyen nanopartículas metálicas y nanocubiertas metálicas tal como partículas de oro, partículas de plata, partículas de cobre, partículas de platino, partículas de cadmio, partículas compuestas, esferas huecas de oro, nanocubiertas de sílice recubiertas de oro y cubiertas de oro recubiertas de sílice. También se incluyen nanopartículas de sílice, látex, poliestireno, policarbonato, poliacrilato, PVDF y partículas coloreadas de cualquiera de estos materiales.

Los puntos cuánticos son cristales fluorescentes de aproximadamente 1-5 nm de diámetro que son excitables por la luz en un amplio intervalo de longitudes de onda. Tras la excitación por la luz que tiene una longitud de onda apropiada, estos cristales emiten luz, tal como luz monocromática, con una longitud de onda que depende de su composición química y tamaño. Los puntos cuánticos tales como CdSe, ZnSe, InP o InAs poseen propiedades ópticas únicas; estos y otros puntos cuánticos similares están disponibles de varias fuentes comerciales (por ejemplo, NN-Labs, Fayetteville, AR; Ocean Nanotech, Fayetteville, AR; Nanoco Technologies, Manchester, RU; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Variantes y Fragmentos de Polipéptidos. Determinadas realizaciones incluyen variantes y/o fragmentos de los polipéptidos de referencia descritos en el presente documento, ya sea descritos por nombre o por referencia a un identificador de secuencia, que incluye polipéptidos de p97 y agentes basados en polipéptidos tales como anticuerpos. Las secuencias de tipo silvestre o más prevalentes de estos polipéptidos son conocidas en la técnica, y pueden usarse como una comparación para las variantes y fragmentos descritos en el presente documento.

Una "variante" de polipéptido, como se usa el término en el presente documento, es un polipéptido que generalmente difiere de un polipéptido específicamente divulgado en el presente documento por una o más sustituciones, supresiones, adiciones y/o inserciones. Los polipéptidos variantes son biológicamente activos, es decir, continúan poseyendo la actividad enzimática o de unión de un polipéptido de referencia. Dichas variantes pueden ser el resultado de, por ejemplo, polimorfismo genético y/o manipulación humana.

En muchos casos, una variante biológicamente activa contendrá una o más sustituciones conservativas. Una "sustitución conservativa" es aquella en la que un aminoácido se sustituye por otro aminoácido que tiene propiedades similares, de modo que un experto en la materia de la química de péptidos esperaría que la estructura secundaria y la naturaleza hidropática del polipéptido no cambian sustancialmente. Tal como se ha descrito anteriormente, se pueden realizar modificaciones en la estructura de los polinucleótidos y polipéptidos de la presente invención y todavía obtener una molécula funcional que codifique un polipéptido variante o derivado con características deseables. Cuando se desea alterar la secuencia de aminoácidos de un polipéptido para crear una variante o porción equivalente, o incluso mejorada, de un polipéptido de la invención, un experto en la materia generalmente cambiará uno o más de los codones de la secuencia de ADN codificante de acuerdo con la Tabla A a continuación.

Aminoácidos		Tabla A				Codones			
Alanina	Ala	A	GCA	GCC	GCG	GCU			
Cisteína	Cys	C	UGC	UGU					
Acido aspártico	Asp	D	GAC	GAU					
Acido glutámico	Glu	E	GAA	GAG					
Fenilalanina	Phe	F	UUC	UUU					
Glicina	Gly	G	GGA	GGC	GGG	GGU			
Histidina	His	H	CAC	CAU					
Isoleucina	Ile	I	AUA	AUC	AUU				
Lisina	Lys	K	AAA	AAG					
Leucina	Leu	L	UUA	UUG	CUA	CUC	CUG	CUU	
Metionina	Met	M	AUG						
Asparagina	Asn	N	AAC	AAU					
Prolina	Pro	P	CCA	CCC	CCG	CCU			
Glutamina	Gln	Q	CAA	CAG					
Arginina	Arg	R	AGA	AGG	CGA	CGC	CGG	CGU	
Serina	Ser	S	AGC	AGU	UCA	UCC	UCG	UCU	
Treonina	Thr	T	ACA	ACC	ACG	ACU			
Valina	Val	V	GUA	GUC	GUG	GUU			
Triptófano	Trp	W	UGG						
Tirosina	Tyr	Y	UAC	UAU					

Por ejemplo, determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos en una estructura de proteína sin una pérdida apreciable de la capacidad de unión interactiva con estructuras tales como, por ejemplo, regiones de unión a antígeno de anticuerpos o sitios de unión en moléculas de sustrato. Debido a que es la capacidad interactiva y la naturaleza de una proteína lo que define la actividad biológica de esa proteína, determinadas sustituciones de secuencia de aminoácidos se pueden realizar en una secuencia de proteína y, por supuesto, en su secuencia codificante del ADN subyacente, y sin embargo obtener una proteína con propiedades similares. Por lo tanto, se contempla que se puedan realizar varios cambios en las secuencias peptídicas de las composiciones divulgadas, o en las secuencias de ADN correspondientes que codifican dichos péptidos sin pérdida apreciable de su utilidad.

Al hacer tales cambios, puede considerarse el índice hidropático de los aminoácidos. La importancia del índice de aminoácidos hidropáticos para conferir una función biológica interactiva a una proteína se entiende generalmente en la técnica (Kyte y Doolittle, 1982). Se acepta que el carácter hidropático relativo del aminoácido contribuye a la estructura secundaria de la proteína resultante, que a su vez define la interacción de la proteína con otras moléculas, por ejemplo, enzimas, sustratos, receptores, ADN, anticuerpos, antígenos y similares. A cada aminoácido se le ha asignado un índice hidropático en función de sus características de hidrofobicidad y carga (Kyte y Doolittle, 1982). Estos valores son: isoleucina (+4,5); valina (+4,2); leucina (+3,8); fenilalanina (+2,8); cisteína (+2,5); metionina (+1,9); alanina (+1,8); glicina (-0,4); treonina (-0,7); serina (-0,8); triptófano (-0,9); tirosina (-1,3); prolina (-1,6); histidina (-3,2); glutamato (-3,5); glutamina (-3,5); aspartato (-3,5); asparagina (-3,5); lisina (-3,9); y arginina (-4,5). Se sabe en la técnica que determinados aminoácidos pueden sustituirse por otros aminoácidos que tengan un índice o puntuación hidropática similar y todavía dan como resultado en una proteína con actividad biológica similar, es decir, todavía obtener una proteína funcionalmente biológica equivalente. Al hacer tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos índices hidropáticos están dentro de ± 2 , los que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de $\pm 0,5$ son aún más particularmente preferidos.

También se entiende en la técnica que la sustitución de aminoácidos similares puede hacerse de forma eficaz basándose en la hidrofiliidad. La Patente 4.554.101, establece que la mayor hidrofiliidad promedio local de una proteína, según lo regido por la hidrofiliidad de sus aminoácidos adyacentes, se correlaciona con una propiedad biológica de la proteína. Como se detalla en la Patente de los EE.UU. N.º 4.554.101, se han asignado a los restos de aminoácido los siguientes valores de hidrofiliidad: arginina (+3,0); lisina (+3,0); aspartato (+3,0 ± 1); glutamato (+3,0 ± 1); serina (+0,3); asparagina (+0,2); glutamina (+0,2); glicina (0); treonina (-0,4); prolina (-0,5 ± 1); alanina (-0,5); histidina (-0,5); cisteína (-1,0); metionina (-1,3); valina (-1,5); leucina (-1,8); isoleucina (-1,8); tirosina (-2,3); fenilalanina (-2,5); triptófano (-3,4). Se entiende que un aminoácido puede sustituirse por otro que tenga un valor de hidrofiliidad similar y aún así obtener una proteína biológicamente equivalente y, en particular, una proteína inmunológicamente equivalente. En tales cambios, se prefiere la sustitución de aminoácidos cuyos valores de hidrofiliidad están dentro de ± 2 , los que están dentro de ± 1 son particularmente preferidos, y aquellos dentro de $\pm 0,5$ son aún más particularmente preferidos.

Como se ha comentado anteriormente, por lo tanto, las sustituciones de aminoácidos se basan generalmente en la similitud relativa de los sustituyentes de la cadena lateral de los aminoácidos, por ejemplo, su hidrofobicidad, hidrofiliidad, carga, tamaño y similares. Sustituciones ejemplares que toman en consideración varias de las

características anteriores son bien conocidas por los expertos en la materia e incluyen: arginina y lisina; glutamato y aspartato; serina y treonina; glutamina y asparagina; y valina, leucina e isoleucina.

5 Las sustituciones de aminoácidos pueden realizarse generalmente basándose en la similitud de polaridad, carga, solubilidad, hidrofobicidad, hidrofiliidad y/o en la naturaleza anfipática de los restos. Por ejemplo, los aminoácidos cargados negativamente incluyen ácido aspártico y ácido glutámico; los aminoácidos cargados positivamente incluyen lisina y arginina; y los aminoácidos con grupos de cabeza polar sin carga que tienen valores de hidrofiliidad similares incluyen leucina, isoleucina y valina; glicina y alanina; asparagina y glutamina; y serina, treonina, fenilalanina y tirosina. Otros grupos de aminoácidos que pueden representar cambios conservativos incluyen: (1) ala, 10 pro, gly, glu, asp, gln, asn, ser, thr; (2) cys, ser, tyr, thr; (3) val, ile, leu, met, ala, phe; (4) lys, arg, his; y (5) phe, tyr, trp, his.

15 Una variante puede también o alternativamente, contener cambios no conservativos. En una realización preferida, los polipéptidos variantes difieren de una secuencia natural por la sustitución, supresión o adición de menos de aproximadamente 10, 9, 8, 7, 6, 5, 4, 3, 2 aminoácidos, o incluso 1 aminoácido. Las variantes también (o alternativamente) pueden modificarse mediante, por ejemplo, la supresión o adición de aminoácidos que tienen una influencia mínima en la inmunogenicidad, estructura secundaria, actividad enzimática y/o naturaleza hidropática del polipéptido.

20 Las variantes de DSSHAFTLDEL R (SEQ ID NO: 13) pueden basarse en la secuencia de secuencias de p97 de otros organismos, tal como se muestra en la Tabla B a continuación. Los aminoácidos variantes con respecto a la secuencia humana están subrayados.

Tabla B					
Nombre Común	Especie	Nombre de la Proteína	% de Identidad	Secuencia	SEQ ID NO:
Ser Humano	Homo Sapien	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Mono ardilla de capa negra	Saimiri boliviensis boliviensis	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Bonobo	Pan paniscus	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Chimpancé	Pan troglodytes	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Macaco cangrejero	Macaca fascicularis	proteína hipotética	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Gibón de mejillas blancas norteno	Nomascus leucogenys	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Papión oliva	Papio anubis	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Macaco Rhesus	Macaca mulatta	proteína hipotética	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Macaco Rhesus	Macaca mulatta	proteína hipotética	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Gorila occidental de llanura	Gorilla gorilla gorilla	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Titi de orejas de pelo blanco	Callithrix jacchus	Melanotransferrina	100 %	DSSHAFTLDEL R	13
Jerbo Egipcio Menor	Jaculus jaculus	Melanotransferrina	92 %	DSSDAFTLDEL R	93
Gran Galago del Norte	Otolemur garnettii	Melanotransferrina	92 %	DSSHSFTLDEL R	94
Orangután de Sumatra	Pongo abelii	Melanotransferrina	92 %	DSSDAFTLDEL R	95
Ardilla de tierra de trece franjas	Ictidomys tridecemlineatus	Melanotransferrina	92 %	DSSYAFTLDEL R	96
Rinoceronte blanco	Ceratotherium simum simum	Melanotransferrina	92 %	NSSHAFTLDEL R	97
Alpaca	Vicugna pacos	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	98
Pika americana	Ochotona princeps	Melanotransferrina	83 %	DSSYAFPLDEL R	99
zorro volador negro	Pteropus alecto	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	100
delfín nariz de botella	Tursiops truncatus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	101
Musaraña de árbol chino	Tupaia chinensis	Melanotransferrina	83 %	DSTHAFTYDEL R	102
Chirú	Pantholops hodgsonii	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	103
Gato doméstico	Felis catus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	104
Ganado doméstico	Bos taurus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	105
Hurón doméstico	Mustela putorius furo	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	106
Panda Gigante	Ailuropoda Melanoleuca	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	107
Cabra	Capra hircus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDEL R	108
Ratón común	Mus musculus	Melanotransferrina	83 %	DSSYSFTLDEL R	109
Orca	Orcinus orca	Melanotransferrina	83 %	NSSNAFTLDEL R	110
Chichilla de cola larga	Chinchilla lanigera	Melanotransferrina	83 %	DSSSAFTL_NEL R	111

Tabla B

(continuación)

Nombre Común	Especie	Nombre de la Proteína	% de Identidad	Secuencia	SEQ ID NO:
Armadillo de nueve bandas	Dasyopus novemcinctus	Melanotransferrina	83 %	DSSYAFTLDELW	112
Rata noruega	Rattus norvegicus	Melanotransferrina	83 %	DSSYSFTLDELRL	113
Morsa del Pacífico	Odobenus rosmarus divergens	Melanotransferrina	83 %	NSSSAFTLDELRL	114
Topillo de la pradera	Microtus ochrogaster	Melanotransferrina	83 %	DSSYSFTLDELRL	115
Oveja	Ovis aries	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDELRL	116
Foca de Weddell	Leptonychotes weddellii	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDELRL	117
Camello bactriano salvaje	Camelus ferus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDELRL	118
Jabalí	Sus scrofa	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDELRL	119
Yak	Bos mutus	Melanotransferrina	83 %	NSSYAFTLDELRL	120
(Hongo)	Cyphellophora europaea	proteína hipotética	75 %	ATSHAITLDELRL	121
Elefante africano de sabana	Loxodonta africana	Melanotransferrina	75 %	NSSYAFTMDELRL	122
Hamster chino	Cricetulus griseus	Melanotransferrina	75 %	DRSYSFTLDELRL	123
Conejo común	Oryctolagus cuniculus	Melanotransferrina	75 %	DSAYAFTVDELRL	124
Degú	Octodon degus	Melanotransferrina	75 %	DSSSAFNLNELRL	125
Perro doméstico	Canis lupus familiaris	Melanotransferrina	75 %	NSSDAFSLDELRL	126
Cobaya doméstica	Cavia porcellus	Melanotransferrina	75 %	DSSSAFSLNELRL	127
Musaraña bicolor	Sorex araneus	Melanotransferrina	75 %	NSSDAFSLDELRL	128
Manatí de Florida	Trichechus manatus latirostris	Melanotransferrina	75 %	NSSYAFTMDELRL	129
Hámster dorado	Mesocricetus auratus	Melanotransferrina	75 %	DRSYSFTLDELRL	130
Zarigüeya gris de cola corta	Monodelphis domestica	Melanotransferrina	75 %	NSSYSFTLDELRL	131
Caballo	Equus caballus	Melanotransferrina	75 %	NSSYAFTVDELRL	132
Pequeño erizo de Madagascar	Echinops telfairi	Melanotransferrina	75 %	NSSYAFTVDELRL	133
Topo de nariz estrellada	Condylura cristata	Melanotransferrina	75 %	NSSYAFSLDELRL	134
Ser Humano	Homo Sapien	Transferrina	33 %	SASD_LTWDNLK	135
Ser Humano	Homo Sapien	Lactoferrina	17 %	_SDTSLTWNSVK	136

5 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, el péptido de p97 comprende, consiste, o consiste esencialmente en una secuencia en la Tabla B. En aspectos específicos, el péptido de p97 conserva la hélice alfa corta (LDEL) en el extremo C del péptido DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO: 13).

10 Una secuencia polipeptídica es aproximadamente, al menos aproximadamente, o hasta aproximadamente de 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100 aminoácidos contiguos de longitud, incluidos todos los números enteros entre ellos, y que pueden comprender la totalidad o una parte de una secuencia de referencia (véanse, por ejemplo, Listado de Secuencias, Tablas 1-7, Tabla B, Figuras 2-6 y 9).

15 Los cálculos de similitud de secuencia o identidad de secuencia entre secuencias (los términos se usan indistintamente en el presente documento) se efectúan del siguiente modo. Para determinar el porcentaje de identidad de dos secuencias de aminoácidos, o de dos secuencias de un ácido nucleico, las secuencias se alinean para fines de comparación óptimos (*por ejemplo*, se pueden introducir huecos en una o ambas de una primera y segunda secuencia de aminoácidos o de un ácido nucleico para una alineación óptima y las secuencias no homólogas se pueden descartar para fines de comparación). En determinadas realizaciones, la longitud de una secuencia de referencia alineada con fines comparativos es al menos un 30 %, preferentemente al menos un 40 %, más preferentemente al menos un 50 %, 60 %, e incluso más preferentemente al menos un 70 %, 80 %, 90 %, 100 % de la longitud de la secuencia de referencia. Después se comparan los restos de aminoácidos o nucleótidos en posiciones de aminoácidos o posiciones de nucleótidos correspondientes. Cuando una posición en la primera secuencia está ocupada por el mismo resto de aminoácido o nucleótido que la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición.

25 El porcentaje de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, teniendo en cuenta el número de huecos, y la longitud de cada hueco, que necesita introducirse para una alineación óptima de las dos secuencias.

Puede realizarse la comparación de secuencias y la determinación del porcentaje de identidad entre dos secuencias usando un algoritmo matemático. En una realización preferida, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos se determina usando el algoritmo de Needleman y Wunsch, (J. Mol. Biol. 48: 444-453, 1970) que se ha incorporado al programa GAP en el paquete de software GCG, usando bien una matriz Blossum 62 o una matriz PAM250, y un peso de hueco de 16, 14, 12, 10, 8, 6 o 4 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. En otra realización preferida más, el porcentaje de identidad entre dos secuencias de nucleótidos se determina usando el programa GAP en el paquete de software GCG, usando una matriz NWSgapdna.CMP y un peso de hueco de 40, 50, 60, 70 u 80 y un peso de longitud de 1, 2, 3, 4, 5 o 6. Un conjunto de parámetros particularmente preferidos (y el que debe usarse a menos que se especifique lo contrario) es una matriz de puntuación Blossum 62 con una penalización por hueco de 12, una penalización por hueco extendido de 4 y una penalización por hueco de desplazamiento de fase de 5.

El porcentaje de identidad entre dos secuencias de aminoácidos o de nucleótidos se puede determinar usando el algoritmo de E. Meyers y W. Miller (Cabios. 4:11-17, 1989) que se ha incorporado al programa ALIGN (versión 2.0), usando un Tabla de restos de peso PAM120, una penalización por longitud de hueco de 12 y una penalización por hueco de 4.

Las secuencias de los ácidos nucleicos y proteínas descritos en el presente documento puede usarse como una "secuencia de consulta" para realizar una búsqueda frente a bases de datos públicas para, por ejemplo, identificar otros miembros de la familia o secuencias relacionadas. Estas búsquedas pueden realizarse usando los programas NBLAST y XBLAST (versión 2.0) de Altschul, et al., (1990, J. Mol. Biol. 215: 403-10). Pueden realizarse búsquedas de nucleótidos BLAST con el programa NBLAST, puntuación = 100, longitud de palabra = 12 para obtener secuencias de nucleótidos homólogas a moléculas de ácidos nucleicos de la invención. Las búsquedas de proteínas BLAST pueden realizarse con el programa XBLAST, puntuación = 50, longitud de palabra = 3 para obtener secuencias de aminoácidos homólogas a moléculas de proteína de la invención. Para obtener alineaciones con huecos con fines de comparación, puede utilizarse Gapped BLAST como se describe en Altschul et al, (Nucleic Acids Res. 25: 3389-3402, 1997). Cuando se utilizan los programas BLAST y Gapped BLAST, pueden usarse los parámetros por defecto de los respectivos programas (por ejemplo, XBLAST y NBLAST).

En una realización, como se señala anteriormente, los polinucleótidos y/o polipéptidos se pueden evaluar utilizando una herramienta de alineación BLAST. Una alineación local consiste simplemente en un par de segmentos de secuencia, uno de cada una de las secuencias que se comparan. Una modificación de los algoritmos Smith-Waterman o Sellers encontrará todos los pares de segmentos cuyas puntuaciones no pueden mejorarse mediante extensión o recorte, llamados pares de segmentos de alta puntuación (HSP). Los resultados de las alineaciones BLAST incluyen medidas estadísticas para indicar la probabilidad de que la puntuación BLAST se pueda esperar solo por probabilidad.

La puntuación sin procesar, S , se calcula a partir del número de huecos y sustituciones asociadas con cada secuencia alineada en donde las puntuaciones de similitud más altas indican una alineación más significativa. Las puntuaciones de sustitución ese dan mediante una tabla de consulta (véanse PAM, BLOSUM).

Las puntuaciones por hueco generalmente se calculan como la suma de G , la penalización por apertura de hueco y L , la penalización por extensión de hueco. Para un hueco de longitud n , el coste de hueco sería $G+Ln$. La elección de los costes de hueco, G y L es empírica, pero es habitual elegir un valor alto para G (10-15), por ejemplo, 11, y un valor bajo para L (1-2), por ejemplo, 1.

La puntuación de bits, S' , deriva de la puntuación de alineación sin procesar S en la que se han tenido en cuenta las propiedades estadísticas del sistema de puntuación utilizado. Las puntuaciones de bits se normalizan con respecto al sistema de puntuación, por lo tanto, se pueden usar para comparar puntuaciones de alineación de diferentes búsquedas. Las expresiones "puntuación de bits" y "puntuación de similitud" se usan indistintamente. La puntuación de bits da una indicación de cómo de buena es la alineación; cuanto mayor sea la puntuación, mejor será la alineación.

El valor E , o valor esperado, describe la probabilidad de que una secuencia con una puntuación similar se produzca en la base de datos por casualidad. Es una predicción del número de alineaciones diferentes con puntuaciones equivalentes o mejores que S que se espera que se produzcan en una búsqueda en la base de datos por casualidad. Cuanto más pequeño es el valor E , más significativa es la alineación. Por ejemplo, una alineación con un valor E de e^{-117} significa que es muy poco probable que una secuencia con una puntuación similar se produzca simplemente por casualidad. Además, la puntuación esperada para alinear un par aleatorio de aminoácidos debe ser negativa, de lo contrario, las alineaciones largas tenderían a tener una puntuación alta independientemente de si los segmentos alineados estaban relacionados. Además, el algoritmo BLAST usa una matriz, nucleótido o aminoácido de sustitución apropiados y para las alineaciones con huecos utiliza penalizaciones por creación y extensión de huecos. Por ejemplo, la alineación BLAST y la comparación de secuencias polipeptídicas se realizan generalmente usando la matriz BLOSUM62, una penalización por existencia de hueco de 11 y una penalización por extensión de hueco de 1.

En una realización, las puntuaciones de similitud de secuencia se informan de los análisis BLAST realizados con la matriz BLOSUM62, una penalización por existencia de hueco de 11 y una penalización por extensión de hueco de 1.

5 En una realización particular, las puntuaciones de identidad/similitud de secuencia proporcionados en el presente documento se refieren al valor obtenido usando GAP Versión 10 (GCG, Accelrys, San Diego, Calif.) utilizando los siguientes parámetros: % de identidad y % de similitud para una secuencia de nucleótidos utilizando una ponderación de GAP de 50 y una ponderación de la longitud de 3 y la matriz de puntuación nwsgapdna.cmp; % de identidad y % de similitud de una secuencia de aminoácidos utilizando una ponderación de GAP de 8 y una ponderación de la longitud de 2 y la matriz de puntuación BLOSUM62 (Henikoff y Henikoff, PNAS EEUU. 89:10915-10919, 1992). GAP usa el algoritmo de Needleman y Wunsch (J Mol Biol. 48:443-453, 1970) para hallar una alineación de dos secuencias completas que maximiza el número de coincidencias y minimiza el número de huecos.

15 En una realización particular, el polipéptido variante comprende una secuencia de aminoácidos que puede alinearse de manera óptima con una secuencia polipeptídica de referencia (véase, por ejemplo, Listado de secuencias) para generar puntuaciones de bits BLAST o puntuaciones de similitud de secuencia de al menos aproximadamente 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, 1000 o más, incluyendo todos los números enteros e intervalos entre ellos, en donde la alineación BLAST utilizó la matriz BLOSUM62, una penalización por existencia de hueco de 11 y una penalización por extensión de hueco de 1.

25 Como se señala anteriormente, un polipéptido de referencia puede alterarse de diversas maneras incluyendo sustituciones, supresiones, truncamientos, adiciones e inserciones de aminoácidos. Los procedimientos para dichas manipulaciones son generalmente conocidos en la técnica. Por ejemplo, pueden prepararse variantes de secuencias de aminoácidos de las proteínas mediante mutaciones en el ADN. Son bien conocidos en la técnica los procedimientos para las mutagénesis y alteraciones en las secuencias de nucleótidos. Véase, por ejemplo, Kunkel (PNAS EE.UU. 82: 488-492, 1985); Kunkel et al., (Methods in Enzymol. 154: 367-382, 1987), la patente de EE.UU. n.º 4.873.192, Watson, J. D. et al., ("Molecular Biology of the Gene", cuarta edición, Benjamin/Cummings, Menlo Park, Calif., 1987) y las referencias citadas en los mismos. Se puede encontrar directrices sobre las sustituciones de aminoácidos apropiadas que no afectan la actividad biológica de la proteína de interés en el modelo de Dayhoff et al., (1978) Atlas of Protein Sequence and Structure (Natl. Biomed. Res. Found., Washington, D.C.).

35 Los procedimientos para explorar productos génicos de bibliotecas combinatorias realizadas mediante tales modificaciones, y para explorar bibliotecas de ADNc para productos génicos que tienen una propiedad seleccionada son conocidos en la técnica. Dichos procedimientos son adaptables para la exploración rápida de las bibliotecas de genes generadas por mutagénesis combinatoria de polipéptidos de referencia. Como un ejemplo, la mutagénesis recursiva en conjunto (REM), una técnica que potencia la frecuencia de mutantes funcionales en las bibliotecas, se puede usar en combinación con los ensayos de exploración para identificar variantes de polipéptidos (Arkin y Yourvan, PNAS EE.UU 89: 7811-7815, 1992; Delgrave et al., Protein Engineering. 6: 327-331, 1993).

45 Procedimientos Ejemplares para Conjugación. La conjugación o el acoplamiento de una secuencia polipeptídica de p97 a un agente de interés se puede llevar a cabo utilizando técnicas químicas, bioquímicas y/o moleculares convencionales. De hecho, será evidente cómo hacer un conjugado de p97 a la luz de la presente divulgación usando procedimientos disponibles reconocidos en la técnica. Como es evidente, en general, se preferirá al acoplar los componentes primarios de un conjugado de p97 de la presente invención que las técnicas empleadas y las químicas de enlace resultantes no perturben sustancialmente la funcionalidad o actividad deseada de los componentes individuales del conjugado.

50 La química de acoplamiento particular empleada dependerá de la estructura del agente biológicamente activo (por ejemplo, molécula pequeña, polipéptido), la posible presencia de múltiples grupos funcionales dentro del agente biológicamente activo, la necesidad de etapas de protección/desprotección, la estabilidad química del agente y similares y será determinado fácilmente por un experto en la materia. Se puede encontrar una química de acoplamiento ilustrativa útil para preparar los conjugados de p97 de la invención, por ejemplo, en Wong (1991), "Chemistry of Protein Conjugation and Crosslinking", CRC Press, Boca Ratón, Fla.; y Brinkley "A Brief Survey of Methods for Preparing Protein Conjugates with Dyes, Haptens, and Crosslinking Reagents", en Bioconjug. Chem., 3:2013, 1992. Preferentemente, la capacidad y/o actividad de unión del conjugado no se reduce sustancialmente como resultado de la técnica de conjugación empleada, por ejemplo, en relación con el agente no conjugado o el polipéptido de p97 no conjugado.

65 En determinadas realizaciones, una secuencia polipeptídica de p97 se puede acoplar a un agente de interés, ya sea directa o indirectamente. Es posible una reacción directa entre una secuencia polipeptídica de p97 y un agente de interés cuando cada uno posee un sustituyente capaz de reaccionar con el otro. Por ejemplo, un grupo nucleófilo, tal como un grupo amino o sulfhidrilo, en uno puede ser capaz de reaccionar con un grupo que contiene carbonilo, tal como un anhídrido o un haluro de ácido, o con un grupo alquilo que contiene un buen grupo saliente (por ejemplo, un

haluro) en el otro.

Como alternativa, puede ser deseable acoplar indirectamente una secuencia polipeptídica de p97 y un agente de interés a través de un grupo enlazador, que incluye enlaces no peptídicos y enlaces peptídicos. Un grupo enlazador también puede funcionar como un espaciador para distanciar un agente de interés de la secuencia polipeptídica de p97 con el fin de evitar interferencias con las capacidades de unión, capacidades de direccionamiento u otras funcionalidades. Un grupo enlazador también puede servir para aumentar la reactividad química de un sustituyente en un agente, y así aumentar la eficacia de acoplamiento. Un aumento en la reactividad química también puede facilitar el uso de agentes, o grupos funcionales en agentes, que de otra manera no sería posible. La selección de enlazadores liberables o estables también puede emplearse para alterar la farmacocinética de un conjugado de p97 y un agente de interés fijado. Los grupos de enlace ilustrativos incluyen, por ejemplo, grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles a ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles a peptidasas y grupos lábiles a esterases. En otras realizaciones ilustrativas, los conjugados incluyen grupos de enlace tales como los divulgados en la patente de EE.UU. N.º 5.208.020 o en la Patente EP 0 425 235 B1, y en Chari et al., Cancer Research. 52: 127-131, 1992. A continuación se describen enlazadores ejemplares adicionales.

En algunas realizaciones, puede ser deseable acoplar más de una secuencia polipeptídica de p97 a un agente, o viceversa. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, múltiples secuencias polipeptídicas de p97 se acoplan a un agente, o alternativamente, uno o más polipéptidos de p97 se conjugan a múltiples agentes. Las secuencias polipeptídicas de p97 pueden ser iguales o diferentes. Independientemente de la realización particular, los conjugados que contienen múltiples secuencias polipeptídicas de p97 se pueden preparar de varias maneras. Por ejemplo, se puede acoplar más de un polipéptido directamente a un agente, o se pueden usar enlaces que proporcionan múltiples sitios para la unión. Se puede emplear cualquiera de una variedad de estrategias de reticulación heterobifuncionales conocidas para preparar conjugados de la invención. Se entenderá que muchas de estas realizaciones se pueden lograr controlando las estequiometrías de los materiales usados durante el procedimiento de conjugación/reticulación.

En determinadas realizaciones ejemplares, una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional de éster succinimidílico y un polipéptido de p97 que comprende un grupo amino forma un enlace amida; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional oxicarbonilimidazol y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace carbamato; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional carbonato de p-nitrofenilo y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace carbamato; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional carbonato de triclorofenilo y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace carbamato; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional tioéster y un polipéptido de p97 que comprende un grupo amino n-terminal forma un enlace amida; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional propionaldehído y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario.

En algunas realizaciones ejemplares, una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional butiraldehído y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional acetal y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional piperidona y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional metilcetona y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional tresilato y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional maleimida y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional aldehído y un polipéptido de P97 que comprende un grupo amino forma un enlace amina secundario; y una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional hidrazina y un polipéptido de P97 que comprende un grupo ácido carboxílico forma un enlace amina secundario.

En realizaciones ejemplares particulares, una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional maleimida y un polipéptido de P97 que comprende un grupo tiol forma un enlace tioéter; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional vinil sulfona y un polipéptido de P97 que comprende un grupo tiol forma un enlace tioéter; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional tiol y un polipéptido de P97 que comprende un grupo tiol forma un enlace disulfuro; una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional disulfuro de ortopiridilo y un polipéptido de P97 que comprende un grupo tiol forma un enlace disulfuro; y una reacción entre un agente que comprende un grupo funcional yodoacetamida y un polipéptido de P97 que comprende un grupo tiol forma un enlace tioéter.

En una realización específica, se usa un reticulante de amina a sulfhidrilo para preparar un conjugado. En una realización preferida, por ejemplo, el agente de reticulación es succinimidil-4-(*N*-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato (SMCC) (Thermo Scientific), que es un agente de reticulación de sulfhidrilo que contiene grupos reactivos de NHS-éster y maleimida en los extremos opuestos de un brazo espaciador estabilizado con ciclohexano de longitud media (8,3 angstroms). SMCC es un reticulante no escindible y permeable a la membrana que se puede

5 usar para crear agentes reactivos con sulfhidrilo, agentes activados con maleimida (por ejemplo, polipéptidos, anticuerpos) para la reacción posterior con secuencias polipeptídicas de p97. Los ésteres NHS reaccionan con aminas primarias a pH 7-9 para formar enlaces amida estables. Las maleimidias reaccionan con grupos sulfhidrilo a pH 6,5-7,5 para formar enlaces tioéter estables. Por lo tanto, el éster NHS reactivo con amina de SMCC se reticula rápidamente con aminas primarias de un agente y el grupo maleimida reactivo con sulfhidrilo resultante está entonces disponible para reaccionar con restos de cisteína de p97 para producir conjugados específicos de interés.

10 En determinadas realizaciones específicas, la secuencia polipeptídica de p97 se modifica para contener grupos sulfhidrilo expuestos para facilitar la reticulación, *por ejemplo*, para facilitar la reticulación a un agente activado por maleimida. En una realización más específica, la secuencia polipeptídica de p97 se modifica con un reactivo que modifica las aminas primarias para agregar grupos tiol sulfhidrilo protegidos. En una realización incluso más específica, el reactivo N-succinimidil-S-acetiltioacetato (SATA) (Thermo Scientific) se usa para producir polipéptidos de p97 tiolados.

15 En otras realizaciones específicas, un agente activado con maleimida se hace reaccionar en condiciones adecuadas con polipéptidos de p97 tiolados para producir un conjugado de la presente invención. Se entenderá que al manipular las proporciones de SMCC, SATA, agente y polipéptido de p97 en estas reacciones, es posible producir conjugados que tengan diferentes estequiometrías, pesos moleculares y propiedades.

20 En aún otras realizaciones ilustrativas, los conjugados se realizan usando agentes de acoplamiento de proteínas bifuncionales tales como N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP), succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato, iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidioésteres (tales como dimetil adipimidato HCL), ésteres activos (tales como disuccinimidil suberato), aldehídos (tales como glutaraldehído), compuestos de bis-azido (tales como bis (p-azidobenzoil)hexanodiamina), derivados de bis-diazonio (tales como bis-(p-diazoniobenzoil)-etilenodiamina), diisocianatos (tales como tolueno 2,6-diisocianato) y compuestos de bis-activo fluorina (tales como 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzeno). Los agentes de acoplamiento particulares incluyen N-succinimidil-3-(2-piridilditio)propionato (SPDP) (Carlsson et al., Biochem. J. 173:723-737 [1978]) y N-succinimidil-4-(2-piridiltio) pentanoato (SPP) para proporcionar un enlace disulfuro.

30 Las estrategias de reticulación específicas analizadas en el presente documento son solo algunos de los muchos ejemplos de estrategias de conjugación adecuadas que pueden emplearse en la producción de conjugados de la invención. Será evidente para los expertos en la materia que se pueden emplear una variedad de otros reactivos bifuncionales o polifuncionales, tanto homo como heterofuncionales (tal como los descritos en el catálogo de Pierce Chemical Co., Rockford, IL) como el grupo de enlazadores. El acoplamiento puede efectuarse, por ejemplo, a través de grupos amino, grupos carboxilo, grupos sulfhidrilo o restos de carbohidratos oxidados. Existen numerosas referencias que describen dicho procedimiento, por ejemplo, la Patente de EE.UU. N.º 4.671.958, de Rodwell et al.

40 Las realizaciones particulares pueden emplear una o más etiquetas de aldehído para facilitar la conjugación entre un polipéptido de p97 y un agente (véanse las patentes de EE.UU. números 8.097.701 y 7.985.783). En este caso, la modificación enzimática en un motivo de sulfatasa de la etiqueta de aldehído a través de la acción de una enzima generadora de formilglicina (FGE por sus siglas en inglés) genera un resto de formilglicina (FGly). El resto de aldehído del resto de FGly puede entonces explotarse como un mango químico para la unión específica del sitio de un resto de interés al polipéptido. En algunos aspectos, el resto de interés es una molécula pequeña, peptido, aptámero o péptido mimético. En algunos aspectos, el resto de interés es otro polipéptido, tal como un anticuerpo.

45 Las realizaciones particulares, por lo tanto, incluyen un polipéptido de p97 o un agente polipéptido que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos de sulfatasa heteróloga, donde el motivo comprende la siguiente estructura: $X_1Z_1X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO:19) donde Z_1 es cisteína o serina; Z_2 es un resto de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando está presente, es cualquier aminoácido, donde X , está preferentemente presente cuando el motivo de sulfatasa heteróloga está en un extremo N del polipéptido marcado con aldehído; y X_2 y X_3 son cada uno independientemente cualquier aminoácido.

55 Los polipéptidos con el motivo descrito anteriormente pueden modificarse mediante una enzima FGE para generar un motivo que tiene un resto de FGly, que, como se señala anteriormente, puede usarse para la unión específica de sitio de un agente, tal como un segundo polipéptido, por ejemplo, a través de un resto enlazador. Dichas modificaciones se pueden realizar, por ejemplo, expresando el polipéptido que contiene motivo de sulfatasa (*p. ej.*, P97, anticuerpo) en una célula de mamífero, de levaduras o bacteriana que expresa una enzima FGE o mediante modificación *in vitro* del polipéptido aislado con una enzima FGE aislada (véase Wu et al., PNAS. 106:3000-3005, 2009; Rush y Bertozzi, J. Am Chem Soc. 130:12240-1, 2008; y Carlson et al., J Biol Chem. 283:20117-25, 2008).

60 Por lo tanto, algunas realizaciones incluyen un polipéptido de p97 o agente polipeptídico (por ejemplo, anticuerpo) que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más motivos de sulfatasa heteróloga que tienen un resto de formilglicina, donde el motivo comprende la siguiente estructura:

65 $X_1(FGly)X_2Z_2X_3$ (SEQ ID NO:20) donde FGly es un resto de formilglicina; Z_2 es un resto de prolina o alanina; X_1 está presente o ausente y, cuando

está presente, es cualquier aminoácido, donde X_1 está preferentemente presente cuando el motivo de sulfatasa heteróloga está en un extremo N del polipéptido marcado con aldehído; y X_2 y X_3 son cada uno independientemente cualquier aminoácido.

- 5 En realizaciones particulares, X_1 , X_2 y X_3 son cada uno independientemente un aminoácido alifático, un aminoácido que contiene azufre o un aminoácido polar no cargado. Por ejemplo, X_1 puede ser L, M, V, S o T; y X_2 , y/o X_3 pueden ser independientemente S, T, A, V, G o C.

- 10 En algunas realizaciones, los motivos de sulfatasa heteróloga pueden (a) tener menos de 16 restos de aminoácidos de longitud, incluyendo aproximadamente 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14 o 15 restos de longitud, (b) estar posicionado en el extremo N del polipéptido, (c) estar posicionado en el extremo C del polipéptido, (d) estar posicionado en un sitio interno de una secuencia de aminoácidos natural del polipéptido, (e) estar posicionado en un bucle terminal del polipéptido, (f) estar posicionado en un sitio de modificación postraduccional del polipéptido (por ejemplo, sitio de glicosilación), o cualquier combinación de los mismos.

- 15 Algunas realizaciones se refieren a conjugados de (i) un polipéptido de p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído) y (ii) un agente (A) tal como una molécula pequeña que se funcionaliza con un grupo reactivo con aldehído, donde (i) y (ii) están unidos covalentemente a través del resto de FGly del motivo de sulfatasa y el grupo reactivo con aldehído. Dichos conjugados pueden tener una de las siguientes estructuras generales:

- 20 $p97(\text{FGly})\text{-R}_1\text{-A}$
donde R_1 es al menos un enlace con reactivo con aldehído; y FGly es un resto de formilglicina dentro de un motivo de sulfatasa heteróloga.

- 25 Algunas realizaciones se refieren a conjugados de (i) un polipéptido de p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído) y (ii) un agente polipeptídico (pA) que se funcionaliza con un grupo reactivo con aldehído o viceversa, donde (i) y (ii) están unidos covalentemente a través del resto de FGly del motivo de sulfatasa y el grupo reactivo con aldehído. Dichos conjugados pueden tener una de las siguientes estructuras generales:

- 30 $p97(\text{FGly})\text{-R}_1\text{-pA}$ o $p97\text{-R}_1\text{-(FGly)pA}$
donde R_1 es al menos un enlace con reactivo con aldehído; y FGly es un resto de formilglicina dentro de un motivo de sulfatasa heteróloga.

- 35 El agente o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído (p. ej., anticuerpo, polipéptido de p97) puede funcionalizarse con uno o más grupos reactivos de aldehído tales como aminooxi, hidrazida y tiosemicarbácida, y después unirse covalentemente al polipéptido que contiene etiqueta de aldehído a través del al menos un resto de FGly, para formar un enlace reactivo con aldehído. La unión de un agente funcionalizado con aminooxi (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído) crea un enlace de oxima entre el resto de FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído); la unión de un agente funcionalizado con hidrazida (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído) crea un enlace de hidrazina entre el resto de FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído); y la unión de un agente funcionalizado con tiosemicarbazida (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído) crea un enlace de hidrazina carbotiamida entre el resto de FGly y el agente funcionalizado (o polipéptido que contiene etiqueta no de aldehído). Por lo tanto, en estas y otras realizaciones relacionadas, R_1 puede ser un enlace que comprende una base de Schiff, tal como un enlace de oxima, un enlace de hidrazina o un enlace de hidrazina carbotiamida.

- 45 Determinadas realizaciones incluyen conjugados de (i) un polipéptido de p97 que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído) y (ii) un agente polipeptídico que contiene un motivo de sulfatasa (o etiqueta de aldehído) (A), donde (i) y (ii) están covalentemente unidos a través de sus respectivos restos de FGly, opcionalmente a través de un resto o grupo enlazador bifuncionalizado. Por ejemplo, determinados conjugados de p97 pueden comprender la siguiente estructura:

- 50 $p97(\text{FGly})\text{-R}_1\text{-L-R}_2\text{-(FGly)A}$
donde R_1 y R_2 son el mismo o diferente enlace reactivo con aldehído; L es un resto enlazador, p97 (FGly) es un polipéptido de p97 que contiene etiqueta de aldehído, y (FGly) A es un agente que contiene etiqueta de aldehído, tal como un anticuerpo u otro agente basado en polipéptidos.

- 55 Meramente a modo de ilustración, en algunas realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heteróloga puede estar en el extremo C del polipéptido de p97 y en el extremo N del agente basado en polipéptidos. En otras realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heteróloga puede estar en el extremo N del polipéptido de p97 y en el extremo C del agente basado en polipéptidos. En aún otras realizaciones, el al menos un motivo de sulfatasa heteróloga puede estar en el extremo N del polipéptido de p97 y en el extremo N del agente basado en polipéptidos.

- 60 En realizaciones adicionales, el al menos un motivo de sulfatasa heteróloga puede estar en el extremo C del polipéptido de p97 y en el extremo C del agente basado en polipéptidos. Como se señala anteriormente, el al menos un motivo heterólogo puede estar en una posición interna en el polipéptido de p97 y/o en el agente basado en polipéptidos. Los expertos en la materia reconocerán que son posibles otras combinaciones.

- 65 Los enlaces reactivos con aldehído de R_1 y R_2 pueden formarse independientemente por cualquier grupo reactivo con aldehído que formará un enlace covalente entre (i) el resto de formilglicina (FGly) de la etiqueta de aldehído y (ii)

un resto enlazador que se funcionaliza con dicho grupo reactivo con aldehído (p. ej., un enlazador bifuncionalizado con dos grupos reactivos con aldehído, que pueden ser iguales o diferentes). Ejemplos de grupos reactivos con aldehído incluyen grupos aminooxi, hidrazida y tiosemicarbazida, que formarán enlaces que contienen bases de Schiff con un resto de FGly, que incluyen enlaces de oxima, enlaces de hidrazina y enlaces de hidrazina carbotiamida, respectivamente. Por lo tanto, R₁ y R₂ pueden ser un enlace que comprende una base de Schiff, tal como un enlace de oxima, un enlace de hidrazina o un enlace de hidrazina carbotiamida.

En algunas realizaciones, el polipéptido de p97 que contiene la etiqueta aldehído y el agente que contiene la etiqueta aldehído están unidos (por ejemplo, unidos covalentemente) a través de un enlazador multifuncionalizado (por ejemplo, enlazador bifuncionalizado), este último funcionalizado con los mismos o diferentes grupos reactivos con aldehído. En estas y otras realizaciones relacionadas, los grupos reactivos con aldehído permiten que el enlazador forme un puente covalente entre el polipéptido de p97 y el agente a través de sus respectivos restos de FGly. Los restos enlazadores incluyen cualquier resto o sustancia química que pueda funcionalizarse y preferentemente bi o multifuncionalizarse con uno o más grupos reactivos con aldehído. Los ejemplos particulares incluyen péptidos, polímeros hidrosolubles, entidades detectables, otros compuestos terapéuticos (por ejemplo, compuestos citotóxicos), restos de biotina/estreptavidina y glicanos (véase Hudak et al., J Am Chem Soc. 133:16127-35, 2011). Los ejemplos específicos de glucanos (o glucósidos) incluyen aminooxi glucanos, tales como glucanos de orden superior compuestos por intermedios de glucosil *N*-pentenoil hidroxamatos (*supra*). En el presente documento se describen enlazadores ejemplares, y se pueden funcionalizar con grupos reactivos con aldehído de acuerdo con técnicas de rutina en la técnica (véanse, por ejemplo, Carrico et al., Nat Chem Biol. 3:321-322, 2007; y las Patentes de Estados Unidos N.º 8.097.701 y N.º 7.985.783).

Los conjugados de p97 también se pueden preparar mediante diversas técnicas de "química clic", que incluyen reacciones que son modulares, de amplio alcance, dan rendimientos muy altos, generan principalmente subproductos inofensivos que pueden eliminarse por procedimientos no cromatográficos y pueden ser estereoespecíficos pero no necesariamente enantioselectivos (véase Kolb et al., Angew Chem Int Ed Engl. 40:2004-2021, 2001). Ejemplos particulares incluyen técnicas de conjugación que emplean la cicloadición 1,3-dipolar de azidas y alquinos de Huisgen, también conocidas como reacciones de "cicloadición de azida-alquino" (véase Hein et al., Pharm Res. 25:2216-2230, 2008). Ejemplos no limitantes de reacciones de cicloadición de azida-alquino incluyen reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas con cobre (CuAAC por sus siglas en inglés) y reacciones de cicloadición de azida-alquino catalizadas con rutenio (RuAAC por sus siglas en inglés).

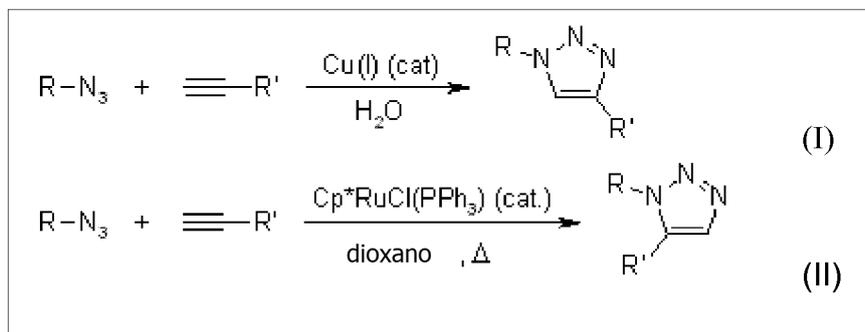
CuAAC funciona en un amplio intervalo de temperatura, es insensible a las condiciones acuosas y en un intervalo de pH de 4 a 12, y tolera un amplio intervalo de grupos funcionales (véase Himo et al, J Am Chem Soc. 127:210-216, 2005). El catalizador activo de Cu(I) puede generarse, por ejemplo, a partir de sales de Cu(I) o sales de Cu(II) usando ascorbato de sodio como agente reductor. Esta reacción forma productos 1,4-sustituídos, haciéndola específica de la región (véase Hein *et al.*, *supra*).

RuAAC utiliza complejos de cloruro de pentametilciclopentadienil rutenio [Cp**RuCl*] que son capaces de catalizar la cicloadición de azidas a alquinos terminales, conduciendo selectivamente a 1,2,3-triazoles disustituídos en 1,5 (ver Rasmussen et al., Org. Lett. 9:5337-5339, 2007). Además, y en contraste con CuAAC, RuAAC también se puede usar con alquinos internos para proporcionar 1,2,3-triazoles completamente sustituidos.

Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen polipéptidos de p97 que comprenden al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de azida o una cadena lateral de alquino, que incluye aminoácidos no naturales internos y terminales (por ejemplo, N-terminal, C-terminal). Determinados de estos polipéptidos de p97 pueden formarse mediante la incorporación *in vivo* o *in vitro* (por ejemplo, sistemas sin células) de aminoácidos no naturales que contienen cadenas laterales de azida o cadenas laterales de alquino. Las técnicas *in vivo* ejemplares incluyen técnicas de cultivo celular, por ejemplo, usando *E. coli* modificada (véanse Travis y Schultz, The Journal of Biological Chemistry. 285:11039-44, 2010; y Deiters y Schultz, Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters. 15:1521-1524, 2005), y las técnicas *in vitro* ejemplares incluyen sistemas sin células (véase Bundy, Bioconjug Chem. 21:255-63, 2010).

En algunas realizaciones, un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de azida se conjuga por cicloadición de azida-alquino a un agente (o enlazador) que comprende al menos un grupo alquino, tal como un agente polipeptídico que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de alquino. En otras realizaciones, un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de alquino se conjuga por cicloadición de azidaalquino a un agente (o enlazador) que comprende al menos un grupo azida, tal como un agente polipeptídico que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de azida. Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen conjugados que comprenden un polipéptido de p97 unido covalentemente a un agente a través de un enlace 1,2,3-triazol.

Los conjugados específicos de p97 pueden formarse mediante las siguientes reacciones basadas en CuAAC o en RuAAC, para comprender las siguientes estructuras (I) o (II) respectivas.



donde R es un polipéptido de p97 y R 'es un agente de interés (o enlazador); o donde R es un agente de interés (o enlazador) y R 'es un polipéptido de p97.

5

En determinadas realizaciones, el aminoácido no natural con la cadena lateral de azida y/o el aminoácido no natural con la cadena lateral de alquino son aminoácidos terminales (N-terminal, C-terminal). En determinadas realizaciones, uno o más de los aminoácidos no naturales son internos.

10 Por ejemplo, determinadas realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de azida conjugada con un agente que comprende un grupo alquino. Algunas realizaciones, incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de azida conjugada con un agente que comprende un grupo alquino. Realizaciones particulares incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de alquino conjugada con un agente que comprende un grupo lateral de azida. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente que comprende un grupo lateral de azida. Algunas realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural interno con una cadena lateral de azida conjugado con un agente que comprende un grupo alquino. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural interno con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente que comprende un grupo lateral de azida

Realizaciones particulares incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de azida conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de alquino. Otras realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de azida conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de alquino. Aún otras realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de azida conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de alquino. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de azida conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de alquino.

Otras realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de azida. Aún más realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de azida. Realizaciones adicionales incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de azida. Aún más realizaciones incluyen un polipéptido de p97 que comprende un aminoácido no natural C-terminal con una cadena lateral de alquino conjugado con un agente polipeptídico que comprende un aminoácido no natural N-terminal con una cadena lateral de azida.

45 También se incluyen procedimientos para producir un conjugado de p97, que comprende: (a) realizar una reacción de cicloadición de azida-alquino entre (i) un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral de azida y un agente que comprende al menos un grupo alquino (por ejemplo, un aminoácido no natural con una cadena lateral de alquino); o (ii) un polipéptido de p97 que comprende al menos un aminoácido no natural con una cadena lateral alquino y un agente que comprende al menos un grupo azida (por ejemplo, un aminoácido no natural con una cadena lateral de azida); y (b) aislar un conjugado de p97 de la reacción, produciendo así un conjugado de p97.

50

En el caso en el que el conjugado de p97 es un polipéptido de fusión, el polipéptido de fusión generalmente se

puede preparar usando técnicas convencionales. Preferentemente, sin embargo, un polipéptido de fusión se expresa como un polipéptido recombinante en un sistema de expresión, descrito en el presente documento y conocido en la técnica. Los polipéptidos de fusión de la invención pueden contener una o múltiples copias de una secuencia polipeptídica de p97 y pueden contener una o múltiples copias de un agente de interés basado en polipéptidos (*por ejemplo*, anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo), presentes en cualquier disposición deseada.

Para las proteínas de fusión, las secuencias de ADN que codifican el polipéptido de p97, el agente polipeptídico (*por ejemplo*, el anticuerpo) y, opcionalmente, los componentes del enlazador peptídico pueden ensamblarse por separado y después unirse en un vector de expresión apropiado. El extremo 3' de la secuencia de ADN que codifica un componente polipeptídico está unido, con o sin un enlazador peptídico, al extremo 5' de una secuencia de ADN que codifica el (los) otro(s) componente(s) polipeptídico(s) para que los marcos de lectura de las secuencias estén en fase. Las secuencias de ADN fijadas están operativamente unidas a elementos reguladores transcripcionales o traduccionales adecuados. Los elementos reguladores responsables de la expresión de ADN se encuentran solamente en 5' de la secuencia de ADN que codifica los primeros polipéptidos. De manera similar, los codones de parada necesarios para finalizar la traducción y las señales de terminación de la transcripción solo están presentes en 3' de la secuencia de ADN que codifica el polipéptido más C-terminal. Esto permite la traducción en un único polipéptido de fusión que conserva la actividad biológica de ambos polipéptidos componentes.

Se pueden aplicar técnicas similares, principalmente la disposición de elementos reguladores tales como promotores, codones de parada y señales de terminación de la transcripción, a la producción recombinante de proteínas no de fusión, por ejemplo, a polipéptidos de p97 y agentes polipeptídicos (*por ejemplo*, agentes de anticuerpos) para producción de conjugados no de fusión.

Los polinucleótidos y los polinucleótidos de fusión de la invención pueden contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica una secuencia polipeptídica de p97, y/o pueden contener una o múltiples copias de un ácido nucleico que codifica un agente polipeptídico.

En algunas realizaciones, un ácido nucleico que codifica un polipéptido de p97 objeto, un agente polipéptido y/o una fusión de p97-polipéptido se introduce directamente en una célula hospedadora y la célula se incuba en condiciones suficientes para inducir la expresión del (de los) polipéptido(s) codificado(s). Las secuencias polipeptídicas de la presente divulgación pueden prepararse usando técnicas convencionales bien conocidas por los expertos en la materia en combinación con las secuencias de polipéptidos y de ácidos nucleicos proporcionadas en el presente documento.

Por lo tanto, de acuerdo con ciertas realizaciones relacionadas, se proporciona una célula hospedadora recombinante que comprende un polinucleótido o un polinucleótido de fusión que codifica un polipéptido descrito en el presente documento. La expresión de un polipéptido de p97, agente polipeptídico o fusión de p97-agente polipeptídico en la célula hospedadora puede lograrse convenientemente cultivando en condiciones apropiadas células hospedadoras recombinantes que contienen el polinucleótido. Después de la producción por expresión, los polipéptidos pueden aislarse y/o purificarse usando cualquier técnica adecuada, y después usarse según se desee.

Los sistemas para la clonación y expresión de un polipéptido en una diversidad de diferentes células hospedadoras son bien conocidos. Las células hospedadoras adecuadas incluyen bacterias, células de mamífero, sistemas de levaduras y baculovirus. Las líneas de células de mamífero disponibles en la técnica para la expresión de un polipéptido heterólogo incluyen células de ovario de hámster chino (CHO), células HeLa, células de riñón de hámster recién nacido, células HEK-293, células de melanoma de ratón NSO y muchas otras. Un hospedador bacteriano preferido habitual es *E. coli*. La expresión de polipéptidos en células procariontas tales como *E. coli* está bien establecida en la técnica. Para una revisión, véase por ejemplo Pluckthun, A. *Bio/Technology*. 9:545-551 (1991). La expresión en células eucariotas en cultivo también está disponible para los expertos en la materia como una opción para la producción recombinante de polipéptidos (véase Ref, *Curr. Opinion Biotech*. 4:573-576, 1993; y Trill et al., *Curr. Opinion Biotech*. 6:553-560, 1995).

Se pueden elegir o construir vectores adecuados, que contienen secuencias reguladoras adecuadas, que incluyen secuencias promotoras, secuencias terminadoras, secuencias de poliadenilación, secuencias potenciadoras, genes marcadores y otras secuencias según sea adecuado. Los vectores pueden ser plásmidos, virus, por ejemplo, fagos o fagémidos, según sea adecuado. Para detalles adicionales, véase, por ejemplo, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*: 2ª edición, Sambrook et al., 1989, Cold Spring Harbor Laboratory Press. Muchas técnicas y protocolos conocidos para la manipulación de ácido nucleico, por ejemplo en la preparación de construcciones de ácidos nucleicos, la mutagénesis, por secuenciación, introducción de ADN en células y expresión génica, y análisis de proteínas, se describen en detalle en *Current Protocols in Molecular Biology*, Segunda edición, Ausubel et al. eds., John Wiley & Sons, 1992, o actualizaciones posteriores a los mismos.

La expresión "célula hospedadora" se usa para referirse a una célula en la que se ha introducido, o que es capaz de haber introducido en ella, una secuencia del ácido nucleico que codifica uno o más de los polipéptidos descritos en el presente documento, y que además expresa o es capaz de expresar un gen de interés seleccionado, tal como un gen que codifica cualquier polipéptido descrito en el presente documento. La expresión incluye la progenie de la

célula precursora, ya sea que la progenie sea idéntica o no en morfología o en composición genética a la progenitora original, siempre que el gen seleccionado esté presente. Las células hospedadoras pueden elegirse para determinadas características, por ejemplo, la expresión de una enzima generadora de formilglicina (FGE) para convertir un resto de cisteína o serina dentro de un motivo de sulfatasa en un resto de formilglicina (FGly), o la expresión de aminoacil ARNt sintetasa(s) que pueden incorporar aminoácidos no naturales en el polipéptido, incluyendo aminoácidos no naturales con una cadena lateral de azida, cadena lateral de alquino u otra cadena lateral deseada, para facilitar la conjugación.

Por consiguiente, también se contempla un procedimiento que comprende introducir dicho(s) ácido(s) nucleico(s) en una célula hospedadora. La introducción de ácidos nucleicos puede emplear cualquier técnica disponible. Para las células eucariotas, las técnicas adecuadas pueden incluir transfección con fosfato de calcio, DEAE-dextrano, electroporación, transfección y transducción mediadas por liposomas usando un retrovirus u otro virus, por ejemplo, vaccinia o, para células de insectos, baculovirus. Para las células bacterianas, las técnicas adecuadas pueden incluir transformación con cloruro de calcio, electroporación y transfección usando bacteriófagos. La introducción puede ir seguida de causar o permitir la expresión del ácido nucleico, por ejemplo, cultivando células hospedadoras en condiciones para la expresión del gen. En una realización, el ácido nucleico se integra en el genoma (por ejemplo, cromosoma) de la célula hospedadora. La integración puede promoverse mediante la inclusión de secuencias que promueven la recombinación con el genoma, de acuerdo con técnicas convencionales.

La presente invención también proporciona, en determinadas realizaciones, un procedimiento que comprende usar una construcción de ácido nucleico descrita en el presente documento en un sistema de expresión para expresar un polipéptido particular, tal como un polipéptido de p97, agente polipeptídico o proteína de fusión p97-agente polipeptídico como se describe en el presente documento.

Como se señala anteriormente, determinados conjugados de p97, tales como proteínas de fusión, pueden emplear uno o más grupos enlazadores, incluyendo enlazadores no peptídicos (*por ejemplo*, enlazadores no proteicos) y enlazadores peptídicos. Dichos enlazadores pueden ser enlazadores estables o enlazadores liberables.

Ejemplos de enlaces estables no peptídicos incluyen succinimida, ácido propiónico, enlaces de carboximetilato, éteres, carbamatos, amidas, aminas, carbamidas, imidas, enlaces C-C alifáticos, enlaces tioéter, tiocarbamatos, tiocarbamidas y similares. Por lo general, un enlace hidrolíticamente estable es aquel que muestra una tasa de hidrólisis de menos de aproximadamente 1-2 % a 5 % por día en condiciones fisiológicas.

Enlaces liberables no peptídicos ejemplares incluyen enlaces éster de carboxilato, éster de fosfato, anhídrido, acetal, cetel, aciloxialquil éter, imina, ortoéster, tioéster, éster tiol, carbonato e hidrazona. Realizaciones ilustrativas adicionales de enlaces hidrolíticamente inestables o débiles incluyen, pero sin limitación: $-O_2C-(CH_2)_b-O-$, donde b es de 1 a 5, $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-$, donde b es de 1 a 5 y c es de 2-5, $-O-(CH_2)_b-CO_2-(CH_2)_c-O-$, donde b es de 1 a 5 y c es de 2-5, $-(CH_2)_b-OPO_3-(CH_2)_{b'}$, donde b es 1-5 y b' es 1-5, $-C(O)-(NH-CHR-CO)_a-NH-CHR-$, donde a es de 2 a 20 y R es un sustituyente que se encuentra en un α -aminoácido, $-O-(CH_2)_b-CO_2-CHCH_2-CH_2-$, donde b es de 1-5, $-O-C_6H_4-CH=N-(CH_2)_b-O-$, donde b es de 1-5 y $-O-(CH_2)_b-CH_2-CH=N-(CH_2)_b-O-$, donde cada b es independientemente de 1-5.

Otros ejemplos ilustrativos de enlazadores liberables pueden ser enlazadores basados en eliminación de bencilo, enlazadores basados en bloqueo de trialquilo (o basados en lactonización de bloqueo de trialquilo), enlazadores basados en bicina y enlazadores lábiles ácidos. Entre los enlazadores lábiles ácidos pueden estar el enlace disulfuro, los enlazadores que contienen hidrazona y los enlazadores que contienen tiopropionato.

También se incluyen enlazadores que son liberables o escindibles durante o tras la internalización en una célula. Los mecanismos para la liberación intracelular de un agente de estos grupos enlazadores incluyen la escisión por reducción de un enlace disulfuro (*p. ej.*, Patente de Estados Unidos N.º 4.489.710, de Spittler), por irradiación de un enlace fotolábil (*p. ej.*, Patente de los Estados Unidos N.º 4.625.014, de Senter et al.), por hidrólisis de cadenas laterales de aminoácidos derivatizados (*p. ej.*, Patente de EE. UU. N.º 4.638.045, de Kohn et al.), por hidrólisis mediada por complemento de suero (*p. ej.*, Patente de EE. UU. N.º 4.671.958, de Rodwell et al.) y por hidrólisis catalizada por ácido (*p. ej.*, Patente de Estados Unidos N.º 4.569.789, de Blattler et al.). En una realización, se puede usar un enlazador ácido lábil (Cancer Research 52:127-131, 1992; y la patente de los Estados Unidos N.º 5.208.020).

En determinadas realizaciones, "los polímeros hidrosolubles" se usan en un enlazador para acoplar una secuencia polipeptídica de p97 a un agente de interés. Un "polímero hidrosoluble" se refiere a un polímero que es soluble en agua y por lo general es sustancialmente no inmunogénico, y por lo general tiene un peso molecular atómico superior a aproximadamente 1.000 Dalton. La unión de dos polipéptidos a través de un polímero hidrosoluble puede ser deseable ya que tales modificaciones pueden aumentar el índice terapéutico al aumentar la semivida en suero, por ejemplo, al aumentar la estabilidad proteolítica y/o disminuir el aclaramiento renal. Además, la unión a través de uno o más polímeros puede reducir la inmunogenicidad de las proteínas farmacéuticas. Ejemplos particulares de polímeros hidrosolubles incluyen polietilenglicol, polipropilenglicol, polioxialquilenos o copolímeros de polietilenglicol, polipropilenglicol y similares.

En algunas realizaciones, el polímero hidrosoluble tiene un peso molecular hidrodinámico eficaz de más de 10.000 Da, más de aproximadamente 20.000 a 500.000 Da, más de aproximadamente 40.000 Da a 300.000 Da, más de aproximadamente 50.000 Da a 70.000 Da, habitualmente de más de aproximadamente 60.000 Da. El "peso molecular hidrodinámico eficaz" se refiere al tamaño eficaz solvatado con agua de una cadena polimérica como se determina mediante cromatografía de exclusión por tamaño (SEC por sus siglas en inglés) basada en agua. Cuando el polímero hidrosoluble contiene cadenas poliméricas que tienen unidades de repetición de óxido de polialquileno, tales como unidades de repetición de óxido de etileno, cada cadena puede tener un peso molecular atómico de entre aproximadamente 200 Da y aproximadamente 80.000 Da o de entre aproximadamente 1.500 Da y aproximadamente 42.000 Da, siendo de particular interés de aproximadamente 2.000 a aproximadamente 20.000 Da. También se incluyen polímeros hidrosolubles lineales, ramificados y con carga terminal.

Los polímeros útiles como enlazadores entre polipéptidos etiquetados con aldehído pueden tener una amplia gama de pesos moleculares y subunidades poliméricas. Estas subunidades pueden incluir un polímero biológico, un polímero sintético o una combinación de los mismos. Ejemplos de dichos polímeros hidrosolubles incluyen: dextrano y derivados de dextrano, incluyendo sulfato de dextrano, dextrina P-amino reticulada y carboximetil dextrina, celulosa y derivados de celulosa, incluyendo metilcelulosa y carboximetilcelulosa, almidón y dextrinas, y derivados e hidrolizados de almidón, polialquilenglicol y derivados del mismo, incluyendo polietilenglicol (PEG), metoxipolietilenglicol, homopolímeros de polietilenglicol, homopolímeros de polipropilenglicol, copolímeros de etilenglicol con propilenglicol, en donde dichos homopolímeros y copolímeros están sin sustituir y sustituidos en un extremo con un grupo alquilo, heparina y fragmentos de heparina, alcohol polivinílico y polivinil etil éteres, polivinilpirrolidona, aspartamida y polioles polioxietilados, con el dextrano y derivados de dextrano, dextrina y derivados de dextrina. Se apreciará que también se incluyen diversos derivados de los polímeros hidrosolubles descritos específicamente.

Los polímeros hidrosolubles son conocidos en la técnica, particularmente los polímeros basados en óxido de polialquileno tales como polietilenglicol "PEG" (véase Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications, J. M. Harris, Ed., Plenum Press, Nueva York, N. Y. (1992); y Poly(ethylene glycol) Chemistry and Biological Applications, J. M. Harris y S. Zalipsky, Eds., ACS (1997); y las solicitudes de Patentes internacionales: documentos WO 90/13540, WO 92/00748, WO 92/16555, WO 94/04193, WO 94/14758, WO 94/17039, WO 94/18247, WO 94/28937, WO 95/11924, WO 96/00080, WO 96/23794, WO 98/07713, WO 98/41562, WO 98/48837, WO 99/30727, WO 99/32134, WO 99/33483, WO 99/53951, WO 01/26692, WO 95/13312, WO 96/21469, WO 97/03106, WO 99/45964 y las Patentes de EE.UU. N.º 4.179.337; 5.075.046; 5.089.261; 5.100.992; 5.134.192; 5.166.309; 5.171.264; 5.213.891; 5.219.564; 5.275.838; 5.281.698; 5.298.643; 5.312.808; 5.321.095; 5.324.844; 5.349.001; 5.352.756; 5.405.877; 5.455.027; 5.446.090; 5.470.829; 5.478.805; 5.567.422; 5.605.976; 5.612.460; 5.614.549; 5.618.528; 5.672.662; 5.637.749; 5.643.575; 5.650.388; 5.681.567; 5.686.110; 5.730.990; 5.739.208; 5.756.593; 5.808.096; 5.824.778; 5.824.784; 5.840.900; 5.874.500; 5.880.131; 5.900.461; 5.902.588; 5.919.442; 5.919.455; 5.932.462; 5.965.119; 5.965.566; 5.985.263; 5.990.237; 6.011.042; 6.013.283; 6.077.939; 6.113.906; 6.127.355; 6.177.087; 6.180.095; 6.194.580; 6.214.966).

Polímeros de interés ejemplares incluyen aquellos que contienen un óxido de polialquileno, óxido de alquileno de poliamida, o derivados de los mismos, incluyendo óxido de polialquileno y óxido de alquileno de poliamida que comprenden una unidad de repetición de óxido de etileno de fórmula $-(CH_2-CH_2-O)-$. Polímeros de interés ejemplares incluyen una poliamida que tiene un peso molecular superior a aproximadamente 1.000 Dalton de fórmula $-[C(O)-X-C(O)-NH-Y-NH]_n-$ o $-[NH-Y-NH-C(O)-X-C(O)]_n-$, donde X e Y son radicales divalentes que pueden ser iguales o diferentes y pueden ser ramificados o lineales, y n es un número entero discreto de 2-100, habitualmente de 2 a 50, y donde uno o ambos de X e Y comprenden una unidad de repetición hidrosoluble biocompatible, sustancialmente no antigénica que puede ser lineal o ramificada.

Unidades de repetición hidrosolubles adicionales comprenden un óxido de etileno de fórmula $-(CH_2-CH_2-O)-$ o $-(CH_2-CH_2-O)-$. El número de dichas unidades de repetición hidrosolubles puede variar significativamente, siendo el número habitual de dichas unidades de 2 a 500, de 2 a 400, de 2 a 300, de 2 a 200, de 2 a 100 y más habitualmente de 2 a 50. Una realización ejemplar es una en la que uno o ambos de X e Y se seleccionan entre: $-((CH_2)_{n1}-(CH_2-CH_2-O)_{n2}-(CH_2)-$ o $-((CH_2)_{n1}-(O-CH_2-CH_2)_{n2}-(CH_2)_{n1}-)$, donde n1 es de 1 a 6, de 1 a 5, de 1 a 4 y más habitualmente de 1 a 3 y donde n2 es de 2 a 50, de 2 a 25, de 2 a 15, de 2 a 10, de 2 a 8 y más habitualmente de 2 a 5. Una realización ejemplar adicional es una en la que X es $-(CH_2-CH_2)-$, y donde Y es $-(CH_2-(CH_2-CH_2-O)_3-CH_2-CH_2-CH_2)-$ o $-(CH_2-CH_2-CH_2-(O-CH_2-CH_2)_3-CH_2)-$, entre otras variaciones.

En determinadas realizaciones, se puede emplear una secuencia enlazadora peptídica para separar o acoplar los componentes de un conjugado de p97. Por ejemplo, para los conjugados polipéptido-polipéptido, los enlazadores peptídicos pueden separar los componentes a una distancia suficiente para asegurar que cada polipéptido se pliegue en sus estructuras secundarias y terciarias. Tal secuencia enlazadora peptídica puede incorporarse en el conjugado (por ejemplo, proteína de fusión) usando técnicas convencionales descritas en el presente documento y bien conocidas en la técnica. Se pueden elegir secuencias enlazadoras peptídicas adecuadas basándose en los siguientes factores: (1) su capacidad para adoptar una conformación extendida flexible; (2) su incapacidad para adoptar una estructura secundaria que pueda interactuar con epítopos funcionales en el primer y segundo

polipéptido; y (3) la falta de restos hidrófobos o cargados que puedan reaccionar con los epítomos funcionales de los polipéptidos. Las secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las divulgadas en Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83:8258-8262, 1986; la Patente de Estados Unidos N.º 4.935.233 y la Patente de Estados Unidos N.º 4.751.180.

5 En determinadas realizaciones ilustrativas, un enlazador peptídico es de aproximadamente 1 a 5 aminoácidos, aproximadamente 5 a 10 aminoácidos, aproximadamente 5 a 25 aminoácidos, aproximadamente 5 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 25 aminoácidos, aproximadamente 10 a 50 aminoácidos, aproximadamente 10 a 100 aminoácidos, o cualquier intervalo intermedio de aminoácidos. En otras realizaciones ilustrativas, un enlazador peptídico comprende aproximadamente 1, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50 o más aminoácidos de longitud. Los enlazadores particulares pueden tener una longitud total de aminoácidos de aproximadamente 1-200 aminoácidos, 1-150 aminoácidos, 1-100 aminoácidos, 1-90 aminoácidos, 1-80 aminoácidos, 1-70 aminoácidos, 1-60 aminoácidos, 1-50 aminoácidos, 1-40 aminoácidos, 1-30 aminoácidos, 1-20 aminoácidos, 1-10 aminoácidos, 1-5 aminoácidos, 1-4 aminoácidos, 1-3 aminoácidos, o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos.

Un enlazador peptídico puede emplear uno cualquiera o más aminoácidos de origen natural, aminoácidos de origen no natural, análogos de aminoácidos y/o miméticos de aminoácidos como se describe en otra parte en el presente documento y se conoce en la técnica. Determinadas secuencias de aminoácidos que pueden emplearse útilmente como enlazadores incluyen las divulgadas en Maratea et al., Gene 40:39-46, 1985; Murphy et al., PNAS EE.UU. 83:8258-8262, 1986; la Patente de Estados Unidos N.º 4.935.233 y la Patente de Estados Unidos N.º 4.751.180. Secuencias enlazadoras peptídicas particulares contienen restos de Gly, Ser y/o Asn. Otros aminoácidos casi neutros, tal como Thr y Ala, también pueden emplearse en la secuencia enlazadora peptídica, si se desea.

25 Determinados enlazadores ejemplares incluyen enlazadores que contienen Gly, Ser y/o Asn, de la siguiente manera: enlazadores [G]_x, [S]_x, [N]_x, [GS]_x, [GGS]_x, [GSS]_x, [GSGS]_x (SEQ ID NO:21), [GGSG]_x (SEQ ID NO:22), [GGGS]_x (SEQ ID NO:23), [GGGGS]_x (SEQ ID NO:24), [GN]_x, [GGN]_x, [GNN]_x, [GNGN]_x (SEQ ID NO: 25), [GGNG]_x (SEQ ID NO:26), [GGGN]_x (SEQ ID NO: 27), [GGGGN]_x (SEQ ID NO: 28), donde _x es 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, o 20 o más. Otras combinaciones de estos y aminoácidos relacionados serán evidentes para los expertos en la materia.

35 En realizaciones específicas, la secuencia enlazadora comprende una secuencia enlazadora Gly₃, que incluye tres restos de glicina. En realizaciones particulares, los enlazadores flexibles pueden diseñarse racionalmente utilizando un programa informático capaz de modelar tanto los sitios de unión al ADN como los péptidos mismos (Desjarlais y Berg, PNAS. 90:2256-2260, 1993; y PNAS. 91:11099-11103, 1994) o mediante procedimientos de presentación en fagos.

40 Los enlazadores peptídicos pueden ser fisiológicamente estables o pueden incluir un enlazador liberable tal como un enlazador fisiológicamente degradable o enzimáticamente degradable (por ejemplo, enlazador proteolíticamente escindible). En determinadas realizaciones, uno o más enlazadores liberables pueden dar como resultado una semivida más corta y un aclaramiento más rápido del conjugado. Estas realizaciones y las relacionadas pueden usarse, por ejemplo, para potenciar la solubilidad y la vida útil en la circulación sanguínea de los conjugados de p97 en el torrente sanguíneo, mientras que también suministran un agente al torrente sanguíneo (o a través de la BHE) que, después de la degradación del enlazador, está sustancialmente libre de la secuencia de p97. Estos aspectos son especialmente útiles en aquellos casos en los que los polipéptidos u otros agentes, cuando se conjugan de manera permanente con una secuencia de p97, demuestran una actividad reducida. Al usar los enlazadores como se proporcionan en el presente documento, dichos anticuerpos pueden mantener su actividad terapéutica cuando están en forma conjugada. De esta y otras formas, las propiedades de los conjugados de p97 se pueden adaptar de manera más eficaz para equilibrar la bioactividad y la semivida en circulación de los anticuerpos a lo largo del tiempo.

55 Los enlaces degradables enzimáticamente adecuados para su uso en realizaciones particulares de la presente invención incluyen, pero sin limitación: una secuencia de aminoácidos escindida por una serina proteasa tal como trombina, quimiotripsina, tripsina, elastasa, calicreína o subtilisina. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por trombina incluyen, pero sin limitación: -Gly-Arg-Gly-Asp-(SEQ ID NO:29), -Gly-Gly-Arg-, -Gly-Arg-Gly-Asp-Asn-Pro-(SEQ ID NO: 30), -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-(SEQ ID NO:31), -Gly-Arg-Gly-Asp-Ser-Pro-Lys-(SEQ ID NO: 32), -Gly-Pro-Arg-, -Val-Pro-Arg- y -Phe-Val - Arg-. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por elastasa incluyen, pero sin limitación: -Ala-Ala-Ala-, -Ala-Ala-Pro-Val-(SEQ ID NO:33), -Ala-Ala-Pro-Leu-(SEQ ID NO: 34), -Ala-Ala-Pro-Phe-(SEQ ID NO:35), -Ala-Ala-Pro-Ala-(SEQ ID NO: 36) y -Ala-Tyr-Leu-Val-(SEQ ID NO:37).

65 Los enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones particulares de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden escindirse mediante una metaloproteínasa de matriz tal como colagenasa, estromelina y gelatinasa. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por metaloproteínasa de la matriz incluyen, pero sin limitación: -Gly-Pro-Y-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO: 38), -

5 Gly-Pro-, Leu-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO: 39), -Gly-Pro-Ile-Gly-Pro-Z-(SEQ ID NO: 40) y -Ala-Pro-Gly-Leu-Z-(SEQ ID NO:41), donde Y y Z son aminoácidos. Ejemplos ilustrativos de secuencias de aminoácidos escindibles por colagenasa incluyen, pero sin limitación: -Pro-Leu-Gly-Pro-D-Arg-Z-(SEQ ID NO: 42), -Pro-Leu-Gly-Leu-Leu-Gly-Z-(SEQ ID NO: 43), -Pro-Gln-Gly-Ile-Ala-Gly-Trp-(SEQ ID NO: 44), -Pro-Leu-Gly-Cys(Me)-His-(SEQ ID NO:45), -Pro-Leu-Gly-Leu-Tyr-Ala-(SEQ ID NO: 46), -Pro-Leu-Ala-Leu-Trp-Ala-Arg-(SEQ ID NO:47) y -Pro-Leu-Ala-Tyr-Trp-Ala-Arg-(SEQ ID NO: 48), donde Z es un aminoácido. Un ejemplo ilustrativo de una secuencia de aminoácidos escindible por estromelisin es -Pro-Tyr-Ala-Tyr-Tyr-Met-Arg- (SEQ ID NO: 49); y un ejemplo de una secuencia de aminoácidos escindible por gelatinasa es -Pro-Leu-Gly-Met-Tyr-Ser-Arg- (SEQ ID NO: 50).

10 Enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones particulares de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden escindirse mediante una enzima conversiva de la angiotensina, tal como, por ejemplo, -Asp-Lys-Pro-, -Gly-Asp-Lys-Pro-(SEQ ID NO: 51), y -Gly-Ser-Asp-Lys-Pro-(SEQ ID NO: 52).

15 Enlaces enzimáticamente degradables adecuados para su uso en realizaciones particulares de la presente invención también incluyen secuencias de aminoácidos que pueden degradarse mediante catepsina B, tal como, por ejemplo, -Val-Cit-, -Ala-Leu-Ala-Leu- (SEQ ID NO:53), -Gly-Phe-Leu-Gly- (SEQ ID NO: 54) y -Phe-Lys-.

20 En determinadas realizaciones, sin embargo, son opcionales uno cualquiera o más de los enlazadores no peptídicos o peptídicos. Por ejemplo, las secuencias enlazadoras pueden no ser necesarias en una proteína de fusión donde los polipéptidos primero y segundo tienen regiones de aminoácidos N-terminales y/o C-terminales no esenciales que pueden usarse para separar los dominios funcionales y evitar la interferencia estérica.

25 Las propiedades funcionales de los polipéptidos de p97 y los conjugados polipeptídicos de p97 descritos en el presente documento pueden evaluarse usando una variedad de procedimientos conocidos por el experto en la materia, incluyendo, por ejemplo, ensayos de afinidad/unión (por ejemplo, resonancia del plasmón superficial, ensayos de inhibición competitiva); ensayos de citotoxicidad, ensayos de viabilidad celular, ensayos de proliferación o diferenciación celular, inhibición del crecimiento de células de cáncer y/o tumoral utilizando modelos *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, los conjugados descritos en el presente documento pueden analizarse para determinar los efectos sobre la internalización del receptor, la eficacia *in vitro* e *in vivo*, etc., incluyendo la velocidad de transporte a través de la barrera hematoencefálica. Dichos ensayos pueden realizarse usando protocolos bien establecidos conocidos por el experto (véase, p.ej., Current Protocols in Molecular Biology (Greene Publ. Assoc. Inc. & John Wiley & Sons, Inc., NY, NY); Current Protocols in Immunology (Edited by: John E. Coligan, Ada M. Krusbeek, David H. Margulies, Ethan M. Shevach, Warren Strober 2001 John Wiley & Sons, NY, NY); o kits comercialmente disponibles.

35 **Procedimientos de Uso y Composiciones Farmacéuticas**

40 Determinadas realizaciones de la presente invención se refieren a los conjugados reivindicados para su uso en procedimientos terapéuticos. Ejemplos de tales procedimientos incluyen procedimientos de tratamiento y procedimientos de diagnóstico, incluyendo, por ejemplo, el uso de conjugados de p97 para la obtención de imágenes médicas de determinados órganos/tejidos, tal como los del sistema nervioso. Las realizaciones específicas incluyen procedimientos para diagnosticar y/o tratar trastornos o afecciones del sistema nervioso central (SNC), o trastornos o afecciones que tienen un componente del SNC.

45 Por consiguiente, determinadas realizaciones incluyen procedimientos para tratar a un sujeto que lo necesita, que comprende administrar una composición que comprende un conjugado de p97 descrito en el presente documento. También se incluyen procedimientos para suministrar un agente al sistema nervioso (p. ej., tejidos del sistema nervioso central) de un sujeto, que comprende administrar una composición que comprende un conjugado de p97 descrito en el presente documento. En determinadas de estas y otras realizaciones relacionadas, los procedimientos aumentan la velocidad de suministro del agente a los tejidos del sistema nervioso central, en relación, por ejemplo, con el suministro por una composición que comprende el agente solo.

55 En algunos casos, un sujeto tiene una enfermedad, trastorno o afección del SNC, donde el aumento del suministro de un agente terapéutico a través de la barrera hematoencefálica a los tejidos del SNC en relación con los tejidos periféricos puede mejorar el tratamiento, por ejemplo, al reducir los efectos secundarios asociados con la exposición de un agente a los tejidos periféricos. Ejemplos de enfermedades, trastornos y afecciones del SNC incluyen varios tipos de cáncer, incluyendo cánceres primarios y metastásicos del SNC, enfermedades por almacenamiento lisosómico, enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer y enfermedades autoinmunitarias tal como la esclerosis múltiple.

60 Por lo tanto, determinadas realizaciones se refieren a procedimientos para tratar un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente del cerebro, donde el sujeto que lo necesita tiene dicho cáncer o está en riesgo de desarrollar tal afección. En algunas realizaciones, El cáncer es un cáncer primario del SNC, tal como un cáncer primario del cerebro. Por ejemplo, los procedimientos pueden ser para tratar un glioma, meningioma, adenoma hipofisario, schwannoma vestibular, linfoma primario del SNC, o tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma). En algunas realizaciones, el glioma es un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma o un papiloma del plexo

coroideo. En determinadas realizaciones, el cáncer de SNC o cerebral primario es glioblastoma multiforme, tal como un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma.

En realizaciones particulares, el cáncer es un cáncer metastásico del SNC, por ejemplo, un cáncer que ha metastatizado al cerebro. Los ejemplos de estos cánceres incluyen, sin limitación, cánceres de mama, cánceres de pulmón, cánceres del tracto genitourinario, cánceres del tracto gastrointestinal (p.ej., cánceres colorrectales, carcinomas pancreáticos), osteosarcomas, melanomas, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de próstata (por ejemplo, adenocarcinomas prostáticos), y linfomas. Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen procedimientos para tratar, inhibir o prevenir la metástasis de un cáncer mediante la administración a un paciente de una cantidad terapéuticamente eficaz de un conjugado divulgado en el presente documento (por ejemplo, en una cantidad que, después de la administración, inhibe, previene o retrasa la metástasis de un cáncer de una manera estadísticamente significativa, es decir, en relación con un control apropiado como será conocido por los expertos en la materia). En realizaciones particulares, el sujeto tiene un cáncer que aún no ha hecho metástasis en el sistema nervioso central, incluyendo uno o más de los cánceres descritos anteriormente, entre otros conocidos en la técnica.

En realizaciones particulares, el cáncer (célula) expresa o sobreexpresa uno o más de Her2/neu, B7H3, CD20, Her1/receptor(s) de EGF, receptor(es) de VEGF, receptor(es) de PDGF, CD30, CD52, CD33, CTLA-4, o tenascina.

También se incluye el tratamiento de otros cánceres, incluyendo cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, tumor epitelial, cáncer de hueso o un cáncer hematopoyético. Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la célula cancerosa a tratada por un conjugado de p97 sobreexpresa o está asociada con un antígeno canceroso, tal como HER2/neu, Her1/receptor de EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23(Receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (p. ej., VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R), alfafetoproteína, factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7), antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteína EpCAM (17-1A), Muerte Programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glicoproteína-3 (GPC3) y/o mesotelina humanos.

Los conjugados de p97 reivindicados para su uso en el tratamiento de cánceres que incluyen cánceres del SNC pueden combinarse con otras modalidades terapéuticas. Por ejemplo, una composición que comprende un conjugado de p97 puede administrarse a un sujeto antes, durante o después de otras intervenciones terapéuticas, incluyendo la atención sintomática, radioterapia, cirugía, trasplante, inmunoterapia, terapia hormonal, terapia fotodinámica, terapia antibiótica o cualquier combinación de las mismas. La atención sintomática incluye la administración de corticosteroides, para reducir el edema cerebral, dolores de cabeza, disfunción cognitiva y emesis y la administración de anticonvulsivos, para reducir las convulsiones. La radioterapia incluye irradiación de todo el cerebro, radioterapia fraccionada y radiocirugía, tal como la radiocirugía estereotáctica, que se puede combinar adicionalmente con la cirugía tradicional.

En terapias de combinación específicas, la porción de anticuerpo de un conjugado p97-anticuerpo comprende cetuximab, y el conjugado p97-cetuximab se usa para tratar a un sujeto con carcinoma de células escamosas avanzado local o regionalmente de la cabeza y el cuello en combinación con radioterapia. En otros aspectos, el conjugado p97-cetuximab se usa para tratar a un sujeto con enfermedad locorregional recurrente o carcinoma escamoso metastásico de cabeza y cuello en combinación con terapia basada en platino con 5-fluorouracilo (5-FU). En algunos aspectos, el conjugado p97-cetuximab se usa en combinación con irinotecán para tratar a un sujeto con cáncer colorrectal que expresa EGFR y que es refractario a la quimioterapia basada en irinotecán.

En algunos casos, el sujeto tiene o está en riesgo de tener una enfermedad por almacenamiento lisosómico. Por lo tanto, determinados procedimientos se relacionan con el tratamiento de enfermedades por almacenamiento lisosómico en un sujeto que lo necesita, opcionalmente aquellas enfermedades por almacenamiento lisosómico asociadas con el sistema nervioso central. Enfermedades por almacenamiento lisosómico ejemplares incluyen aspartilglucosaminuria, enfermedad por almacenamiento de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, Enfermedad de Krabbe, enfermedad por almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α -manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática,

5 mucopolipidosis tipo I, sialidosis tipos I/II, mucopolipidosis tipos II/III enfermedad de la célula I, mucopolipidosis tipo III pseudopolidistrofia de Hurler, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II, síndrome de Hunter, mucopolisacaridosis tipo IIIA, Síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB
 10 síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler y enfermedad por almacenamiento de ácido siálico. En estas y otras realizaciones relacionadas, el polipéptido de p97 puede conjugarse con uno o más polipéptidos asociados con una enfermedad por almacenamiento lisosómico, tal como se describe en el presente documento.

15 En determinados casos, el sujeto tiene o está en riesgo de tener un trastorno autoinmunitario y/o un trastorno neurodegenerativo, opcionalmente del SNC. Por lo tanto, también se incluyen procedimientos para tratar un trastorno degenerativo o autoinmunitario del sistema nervioso central (SNC) en un sujeto que lo necesite. Por ejemplo, en realizaciones específicas, el trastorno degenerativo o autoinmunitario del SNC es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple (EM). Por lo tanto, determinadas realizaciones incluyen administrar un conjugado de p97 a un sujeto que tiene la enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o EM. En realizaciones particulares, el polipéptido
 20 de p97 se conjuga con un anticuerpo u otro agente que se une específicamente a amiloide- β (p. ej., A β (1-42)) para la enfermedad de Alzheimer, Huntingtina para la enfermedad de Huntington, α -sinucleína para la enfermedad de Parkinson, o α 4 integrina, CD25 o IL-23 para EM. En algunas realizaciones, el polipéptido de p97 se conjuga con polipéptido de interferón- β , para el tratamiento de la EM. En realizaciones específicas, el polipéptido de p97 se conjuga con daclizumab para el tratamiento de la EM.

25 También se incluyen los conjugados reivindicados para su uso en procedimientos de tratamiento del dolor en un sujeto que lo necesita. Los ejemplos incluyen dolor agudo, dolor crónico y dolor neuropático, incluyendo combinaciones de los mismos. En algunos aspectos, el dolor tiene un componente de acción central, tal como el síndrome de dolor central (CPS por sus siglas en inglés), donde el dolor está asociado con daño o disfunción del
 30 SNC, incluyendo el cerebro, el tronco encefálico y/o la médula espinal. En realizaciones particulares, el polipéptido de p97 se conjuga con un anticuerpo u otro agente que se une específicamente a NGF o TrkA. En realizaciones específicas, el polipéptido de p97 se conjuga con tanezumab para el tratamiento del dolor, opcionalmente para el tratamiento de la osteoartritis de rodilla o cadera, lumbalgia crónica, dolor de cáncer de hueso o cistitis intersticial.

35 También se incluyen los conjugados reivindicados para su uso en procedimientos de tratamiento de la inflamación o de una afección inflamatoria en un sujeto que lo necesita. La inflamación "se refiere generalmente a la respuesta biológica de los tejidos a estímulos dañinos, tales como patógenos, células dañadas (por ejemplo, heridas) e irritantes. La expresión "respuesta inflamatoria" se refiere a los mecanismos específicos mediante los cuales se logra y regula la inflamación, incluyendo, meramente a modo de ilustración, la activación o migración de las células
 40 inmunitarias, la producción de citocinas, la vasodilatación, incluyendo la liberación de quininas, la fibrinólisis y la coagulación, entre otros descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. Idealmente, la inflamación es un intento de protección del cuerpo tanto para eliminar los estímulos perjudiciales como para iniciar el proceso de curación del tejido o tejidos afectados. En ausencia de inflamación, las heridas y las infecciones nunca curarían, creando una situación en la que la destrucción progresiva del tejido amenazaría la supervivencia. Por otro lado, la inflamación excesiva o crónica puede asociarse con una variedad de enfermedades, tal como fiebre del heno, aterosclerosis y artritis reumatoide, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica.

50 Los conjugados de p97 de la invención pueden modular la inflamación aguda, la inflamación crónica o ambas. Dependiendo de las necesidades del sujeto, determinadas realizaciones se refieren a reducir la inflamación aguda o las respuestas inflamatorias, y determinadas realizaciones se refieren a reducir la inflamación crónica o las respuestas inflamatorias crónicas.

55 La inflamación aguda se relaciona con la respuesta inicial del cuerpo a estímulos presuntamente dañinos e implica un mayor movimiento de plasma y leucocitos desde la sangre hacia los tejidos lesionados. Es un proceso a corto plazo, que generalmente comienza en minutos u horas y termina con la eliminación del estímulo perjudicial. La inflamación aguda puede caracterizarse por uno o más de enrojecimiento, aumento de calor, hinchazón, dolor y pérdida de la función. El enrojecimiento y el calor se deben principalmente al aumento del flujo sanguíneo a la temperatura central del cuerpo hacia el sitio inflamado, la hinchazón es causada por la acumulación de líquido, el dolor generalmente se debe a la liberación de productos químicos que estimulan las terminaciones nerviosas y la
 60 pérdida de la función tiene múltiples causas.

65 Las respuestas inflamatorias agudas se inician principalmente por células inmunitarias locales, tales como macrófagos residentes, células dendríticas, histiocitos, células de Kupffer y mastocitos. Al inicio de una infección, quemadura u otras lesiones, estas células se activan y liberan mediadores inflamatorios responsables de los signos clínicos de inflamación, tal como las aminas vasoactivas y eicosanoides. La vasodilatación y el consiguiente aumento del flujo sanguíneo provocan enrojecimiento y aumento del calor. El aumento de la permeabilidad de los

vasos sanguíneos da como resultado una exudación o pérdida de proteínas plasmáticas y líquido en el tejido, lo que crea hinchazón. Determinados mediadores liberados, tal como la bradiquinina, aumentan la sensibilidad al dolor y alteran los vasos sanguíneos para permitir la migración o extravasación de leucocitos, tal como neutrófilos, que generalmente migran a lo largo de un gradiente quimiotáctico creado por las células inmunitarias locales.

5 Las respuestas inflamatorias agudas también incluyen uno o más sistemas en cascada bioquímicos acelulares, que consisten en proteínas plasmáticas preformadas moduladas, que actúan en paralelo para iniciar y propagar la respuesta inflamatoria. Estos sistemas incluyen el sistema del complemento, que se activa principalmente por bacterias, y los sistemas de coagulación y fibrinólisis, que se activan principalmente por necrosis, tal como el tipo de
10 daño tisular causado por determinadas infecciones, quemaduras u otros traumas. Por lo tanto, los conjugados de p97 pueden usarse para modular la inflamación aguda, o cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias agudas individuales.

15 La inflamación crónica, una respuesta inflamatoria prolongada y retardada, se caracteriza por un cambio progresivo en el tipo de células que están presentes en el sitio de la inflamación, y con frecuencia conduce a la destrucción y curación simultánea o casi simultánea del tejido del proceso inflamatorio. A nivel celular, las respuestas inflamatorias crónicas implican una variedad de células inmunitarias tales como monocitos, macrófagos, linfocitos, células plasmáticas y fibroblastos, aunque en contraste con la inflamación aguda, que está mediada principalmente por granulocitos, la inflamación crónica está mediada principalmente por células mononucleares tales como monocitos y
20 linfocitos. La inflamación crónica también implica una variedad de mediadores inflamatorios, tal como IFN- γ y otras citocinas, factores de crecimiento, especies reactivas de oxígeno y enzimas hidrolíticas. La inflamación crónica puede durar muchos meses o años, y puede dar como resultado la destrucción indeseada del tejido y fibrosis.

25 Los signos clínicos de inflamación crónica dependen de la duración de la enfermedad, las lesiones inflamatorias, la causa y el área anatómica afectada. (véase, por ejemplo, Kumar et al., Robbins Basic Pathology-8th Ed., 2009 Elsevier, Londres; Miller, LM, Pathology Lecture Notes, Atlantic Veterinary College, Charlottetown, PEI, Canadá). La inflamación crónica se asocia con una variedad de afecciones o enfermedades patológicas, incluyendo, por ejemplo, alergias, enfermedad de Alzheimer, anemia, estenosis de la válvula aórtica, artritis tales como artritis reumatoide y osteoartritis, cáncer, insuficiencia cardíaca congestiva, fibromialgia, fibrosis, ataque cardíaco, insuficiencia renal,
30 lupus, pancreatitis, accidente cerebrovascular, complicaciones quirúrgicas, enfermedad inflamatoria pulmonar, enfermedad inflamatoria intestinal, aterosclerosis y psoriasis, entre otras descritas en el presente documento y conocidas en la técnica. Por lo tanto, los conjugados de p97 pueden usarse para tratar o controlar la inflamación crónica, modular cualquiera de una o más de las respuestas inflamatorias crónicas individuales, o tratar cualquiera de una o más enfermedades o afecciones asociadas con la inflamación crónica.

35 En determinadas realizaciones, los conjugados de p97 pueden modular las respuestas inflamatorias a nivel celular, tal como modulando la activación, secreción de moléculas inflamatorias (por ejemplo, secreción de citocinas o quininas), proliferación, actividad, migración o adhesión de varias células implicadas en la inflamación. Ejemplos de tales células incluyen células inmunitarias y células vasculares. Las células inmunitarias incluyen, por ejemplo,
40 granulocitos tal como neutrófilos, eosinófilos y basófilos, macrófagos/monocitos, linfocitos tal como linfocitos B, linfocitos T citolíticos (es decir, linfocitos T CD8+), linfocitos T auxiliares (es decir, linfocitos T CD4+, incluyendo los linfocitos T_{H1} y T_{H2}), linfocitos citolíticos naturales, linfocitos T $\gamma\delta$, células dendríticas y mastocitos. Ejemplos de células vasculares incluyen células de músculo liso, células endoteliales y fibroblastos. También se incluyen procedimientos para modular una afección inflamatoria asociada con una o más células inmunitarias o células
45 vasculares, incluyendo afecciones inflamatorias mediadas por neutrófilos, mediadas por macrófagos y mediadas por linfocitos.

50 En determinadas realizaciones, los conjugados de p97 pueden modular los niveles o la actividad de las moléculas inflamatorias, incluidas las moléculas inflamatorias derivadas de plasma y las moléculas inflamatorias derivadas de células. Se incluyen moléculas proinflamatorias y moléculas antiinflamatorias. Ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas de plasma incluyen, sin limitación, proteínas o moléculas de uno cualquiera o más del sistema del complemento, sistema de quininas, sistema de coagulación y el sistema de fibrinólisis. Ejemplos de miembros del sistema del complemento incluyen C1, que existe en el suero sanguíneo como un complejo molecular que contiene aproximadamente 6 moléculas de C1q, 2 moléculas de C1r y 2 moléculas de C1s, C2 (a y b), C3(a y B), C4 (a y b),
55 C5, y el complejo de ataque de membrana de C5a, C5b, C6, C7, C8 y C9. Ejemplos del sistema de quininas incluyen bradiquinina, calidina, calidreínas, carboxipeptidasas, enzima conversiva de la angiotensina y endopeptidasa neutra.

60 Ejemplos de moléculas inflamatorias derivadas de células incluyen, sin limitación, enzimas contenidas dentro de gránulos lisosómicos, aminas vasoactivas, eicosanoides, citocinas, proteínas de fase aguda y gases solubles tal como el óxido nítrico. Las aminas vasoactivas contienen al menos un grupo amino y se dirigen a los vasos sanguíneos para alterar su permeabilidad o provocar vasodilatación. Ejemplos de aminas vasoactivas incluyen histamina y serotonina. Los eicosanoides se refieren a moléculas de señalización hechas por oxidación de ácidos grasos esenciales de veinte carbonos, e incluyen prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos y leucotrienos.

65 Los conjugados de p97 pueden también modular los niveles o la actividad de las moléculas de fase aguda. Ejemplos de proteínas de fase aguda incluyen proteína C reactiva, amiloide sérico A, amiloide sérico P y vasopresina. En

determinados casos, la expresión de proteínas de fase aguda puede provocar una variedad de efectos sistémicos no deseados incluyendo amiloidosis, fiebre, aumento de la presión sanguínea, disminución de la sudoración, malestar, pérdida de apetito y somnolencia. Por consiguiente, los conjugados de p97 pueden modular los niveles o la actividad de las proteínas de fase aguda, sus efectos sistémicos o ambos.

5 En determinadas realizaciones, los conjugados de p97 reducen la inflamación local, la inflamación sistémica o ambas. En determinadas realizaciones, los conjugados de p97 pueden reducir o mantener (es decir, prevenir aumentos adicionales) la inflamación local o las respuestas inflamatorias locales. En determinadas realizaciones, los
10 conjugados de p97 pueden reducir o mantener (es decir, prevenir aumentos adicionales) la inflamación sistémica o las respuestas inflamatorias sistémicas.

En determinadas realizaciones, la modulación de la inflamación o de las respuestas inflamatorias pueden asociarse con uno o más tejidos u órganos. Ejemplos no limitantes de tales tejidos u órganos incluyen piel (p. ej., dermis, epidermis, capa subcutánea), folículos pilosos, sistema nervioso (por ejemplo, cerebro, médula espinal, médula espinal, nervios periféricos, meninges incluyendo la duramadre, aracnoides y piamadre), sistema auditivo u órganos del equilibrio (p. ej., oído interno, oído medio, oído externo), sistema respiratorio (por ejemplo, nariz, tráquea, pulmones), tejidos gastroesofágicos, el sistema gastrointestinal (por ejemplo, boca, esófago, estómago, intestino delgado, intestino grueso, recto), sistema vascular (por ejemplo, corazón, vasos sanguíneos y arterias), hígado, vesícula biliar, sistema linfático/inmunitario (por ejemplo, ganglios linfáticos, folículos linfoides, bazo, timo, médula ósea), sistema urogenital
20 (por ejemplo, riñones, uréter, vejiga, uretra, cuello del útero, trompas de Falopio, ovarios, útero, vulva, próstata, glándulas bulbouretrales, epidídimo, próstata, vesículas seminales, testículos), sistema musculoesquelético (por ejemplo, músculos esqueléticos, músculos lisos, hueso, cartílago, tendones, ligamentos), tejido adiposo, mamas y el sistema endocrino (por ejemplo, hipotálamo, pituitaria, tiroides, páncreas, glándulas adrenales). Por consiguiente, los conjugados de p97 pueden usarse para modular la inflamación asociada con cualquiera de estos tejidos u órganos, tal como para tratar afecciones o enfermedades asociadas con la inflamación de estos tejidos u órganos.

En realizaciones particulares, la afección inflamatoria tiene un componente del sistema nervioso o del sistema nervioso central, incluyendo inflamación del cerebro, de la médula espinal y/o de las meninges. En realizaciones particulares, la afección inflamatoria del SNC es meningitis (p. ej., bacteriana, vírica), encefalitis (p. ej., causada por infección o inflamación autoinmunitaria tal como la Encefalomiелitis Diseminada Aguda), sarcoidosis, enfermedades no metastásicas asociadas con neoplasia. Ejemplos particulares de afecciones inflamatorias asociadas al sistema nervioso o al SNC incluyen, sin limitación, meningitis (es decir, inflamación de las membranas protectoras que cubren el cerebro y la médula espinal), mielitis, encefalomiелitis (por ejemplo, encefalomiелitis miálgica, encefalomiелitis diseminada aguda, encefalomiелitis diseminada o esclerosis múltiple, encefalomiелitis autoinmunitaria), aracnoiditis (es decir, inflamación de la aracnoides, una de las membranas que rodean y protegen los nervios del sistema nervioso central), granuloma, inflamación o meningitis inducida por fármacos, enfermedades neurodegenerativas tal como la enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, demencia por VIH, encefalitis tal como encefalitis vírica y encefalitis bacteriana, infecciones parasitarias, trastornos inflamatorios desmielinizantes y trastornos autoinmunitarios tal como enfermedades autoinmunitarias del SNC mediadas por linfocitos T CD8+.
40 Ejemplos adicionales incluyen la enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barré, neuropatía autoinmunitaria, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome de la persona rígida no paraneoplásica, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydeham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmunitaria, neuropatía disimunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica, síndrome de la persona rígida, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis espinal, lesión aguda de la médula espinal y compresión de la médula espinal.

Como se señala anteriormente, también se incluye la inflamación asociada con infecciones del sistema nervioso o del SNC. Ejemplos específicos de infecciones bacterianas asociadas con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, infección estreptocócica, tal como *Streptococcus del grupo B* (por ejemplo, subtipos III) y *Streptococcus pneumoniae* (por ejemplo, serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), *Escherichia coli* (p.ej., que porta el antígeno K1), *Listeria monocytogenes* (p.ej., serotipo IVb), infección por neisseria tal como *Neisseria meningitidis* (meningococo), infección por estafilococos, infección por heamophilus tal como *Haemophilus influenzae* tipo B, *Klebsiella* y *Mycobacterium tuberculosis*. También se incluyen las infecciones por estafilococos y pseudomonas y otros bacilos gramnegativos, principalmente con respecto al trauma en el cráneo, que le da a las bacterias en la cavidad nasal la posibilidad de ingresar al espacio meníngeo, o en personas con derivación cerebral o dispositivo relacionado (p. ej., drenaje extraventricular, depósito de Ommaya). Ejemplos específicos de infecciones víricas asociadas con la inflamación del sistema nervioso incluyen, sin limitación, enterovirus, virus del herpes simple tipo 1 y 2, virus linfotrófico humano de linfocitos T, virus varicela zoster (varicela y culebrilla), virus de las paperas, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV por sus siglas en inglés). La meningitis también puede ser el resultado de la infección por espiroquetas tal como *Treponema pallidum* (sífilis) y *Borrelia burgdorferi* (enfermedad de Lyme), parásitos tal como la malaria (p. ej., malaria cerebral), hongos tal como *Cryptococcus neoformans* y amebas tal como *Naegleria fowleri*.

65 La meningitis u otras formas de inflamación del sistema nervioso también pueden asociarse con la propagación del cáncer a las meninges (*meningitis maligna*), determinados fármacos como los fármacos antiinflamatorios no

esteroides, antibióticos e inmunoglobulinas intravenosas, sarcoidosis (o neurosarcoidosis), trastornos del tejido conectivo como el lupus eritematoso sistémico y determinadas formas de vasculitis (afecciones inflamatorias de la pared de los vasos sanguíneos) tal como la enfermedad de Behçet. Los quistes epidermoides y los quistes dermoides pueden provocar meningitis al liberar materia irritante en el espacio subaracnoideo. Por consiguiente, los conjugados de p97 pueden usarse para tratar o controlar una o más de estas afecciones.

Como se señala anteriormente, determinados sujetos están a punto de someterse, están sometiéndose o han recibido terapia con un agente cardiotoxico de otra manera, es decir, un agente que muestra cardiotoxicidad en su forma no conjugada (un agente que no está conjugado con p97). Dichos sujetos pueden beneficiarse de la administración de un conjugado p97-agente, en relación con la administración del agente solo, en parte porque p97 puede ejercer un efecto cardioprotector sobre agentes cardiotoxicos por un mecanismo que se cree que difiere de sus propiedades de transporte de la BHE. Por lo tanto, dichos sujetos pueden tratarse con un conjugado p97-agente cardiotoxico para una variedad de afecciones de enfermedades, que incluyen enfermedades del SNC descritas en el presente documento, y enfermedades relacionadas con tejidos periféricos que no son del SNC.

Se describen agentes cardiotoxicos ejemplares en otra parte del presente documento, y pueden identificarse de acuerdo con técnicas de diagnóstico *in vivo* y exploración *in vitro* bien conocidas. Véanse Bovelli *et al.*, 2010, *supra*; Inoue *et al.*, AATEX 14, Special Issue, 457-462, 2007; y Dorr *et al.*, Cancer Research. 48:5222-5227, 1988.

Por ejemplo, los sujetos sometidos a terapia con un posible agente cardiotoxico pueden controlarse mediante técnicas de imagen para evaluar la disfunción sistólica y diastólica del VI, la enfermedad de las válvulas cardíacas, la pericarditis y el derrame pericárdico y las lesiones de la arteria carótida. El acortamiento fraccional del VI y la FEVI son los índices más comunes de la función sistólica del VI para la evaluación de la función cardíaca, por ejemplo, durante la quimioterapia. Además, los índices diastólicos derivados de Doppler representan un signo temprano de disfunción del VI en pacientes sometidos a terapia, por lo que la evaluación del patrón de flujo diastólico mitral, la relación de la velocidad de flujo máximo temprano con la velocidad de flujo máximo auricular (E/A), el tiempo de desaceleración de la onda E y el tiempo de relajación isovolumétrica pueden ser útiles para detectar cambios diastólicos de la función del VI antes de que se produzca la disfunción sistólica. El Doppler de tejido pulsado se puede realizar durante un examen ecocardiográfico Doppler convencional; puede ser confiable para proporcionar información cuantitativa sobre la relajación diastólica del miocardio y el rendimiento sistólico (onda E', onda A' y velocidad de la onda S). El Doppler tisular del anillo mitral lateral del VI tiene un papel pronóstico reconocido y, en combinación con el Doppler PW del flujo de entrada mitral, proporciona información precisa sobre el grado de presión de llenado del VI. Los cambios tempranos en la función miocárdica del VI han sido identificados por el Doppler de tejido pulsado de múltiples sitios del VI y pueden ser determinantes importantes de la cardiotoxicidad.

En realizaciones particulares, el agente cardiotoxico es un agente quimioterapéutico y el sujeto tiene cáncer. Ejemplos específicos de cánceres incluyen, sin limitación, cánceres de mama, cánceres de próstata, cánceres gastrointestinales, cánceres de pulmón, cánceres de ovarios, cánceres de testículos, cánceres de cabeza y cuello, cánceres de estómago, cánceres de vejiga, cánceres pancreáticos, cánceres de hígado, cánceres de riñón, carcinomas de células escamosas, cánceres del SNC o cerebrales (descritos en el presente documento), melanomas, cánceres no melanoma, cánceres de tiroides, cánceres de endometrio, tumores epiteliales, cánceres de hueso y cánceres hematopoyéticos.

En realizaciones específicas, el sujeto tiene un cáncer que expresa Her2/neu, tal como cáncer de mama, cáncer de ovario, cáncer de estómago, cáncer de útero agresivo o cáncer metastásico, tal como cáncer metastásico de SNC y el polipéptido de p97 se conjuga con trastuzumab. Dichos pacientes pueden beneficiarse no solo de la sinergia terapéutica resultante de la combinación de p97 y trastuzumab, especialmente para los cánceres del SNC, sino también de la cardiotoxicidad reducida de trastuzumab, resultante de los posibles efectos cardioprotectores de p97.

Los procedimientos para identificar sujetos con una o más de las enfermedades o afecciones descritas en el presente documento son conocidos en la técnica.

También se incluyen los conjugados reivindicados para su uso en procedimientos para obtener imágenes de un componente de órganos o tejidos en un sujeto, que comprende (a) administrar al sujeto una composición que comprende un polipéptido de p97 humana (melanotransferrina), o una variante de la misma, donde el polipéptido de p97 se conjuga con una entidad detectable, y (b) visualizar la entidad detectable en el sujeto, órgano o tejido.

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

Se puede emplear una variedad de procedimientos para visualizar la entidad detectable en el sujeto, órgano o tejido. Ejemplos de procedimientos no invasivos incluyen radiografía, tal como radiografías por fluoroscopia y de proyección, exploración por CT o exploración por CAT (tomografía computarizada (CT) o tomografía axial computarizada (CAT)), ya sea empleando la exploración por tomografía computarizada de rayos X, tomografía por emisión de positrones (PET) o tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT), y determinados tipos

de obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI por sus siglas en inglés), especialmente aquellos que utilizan agentes de contraste, incluyendo combinaciones de los mismos.

Meramente a modo de ejemplo, La PET se puede realizar con agentes de contraste emisores de positrones o radioisótopos tales como ^{18}F , SPECT se puede realizar con agentes de contraste emisores de rayos gamma o radioisótopos tales como ^{201}Tl , $^{99\text{m}}\text{Tc}$, ^{123}I , and ^{67}Ga , y la MRI se puede realizar con agentes de contraste o radioisótopos tales como ^3H , ^{13}C , ^{19}F , ^{17}O , ^{23}Na , ^{31}P y ^{129}Xe y Gd (gadolinio; complejos de Gd(III) orgánico quelado). Cualquiera de uno o más de estos agentes de contraste o radioisótopos ejemplares pueden conjugarse o incorporarse de otra manera con un polipéptido de p97 y administrarse a un sujeto con fines de obtención de imágenes. Por ejemplo, los polipéptidos de p97 pueden marcarse directamente con uno o más de estos radioisótopos, o conjugarse con moléculas (p. ej., moléculas pequeñas) que comprenden uno o más de estos agentes de contraste radioisotópicos, o cualquier otro descrito en el presente documento.

Para su uso *in vivo*, por ejemplo, para el tratamiento de enfermedades humanas, obtención de imágenes médicas o pruebas, los conjugados descritos en el presente documento se incorporan generalmente en una composición farmacéutica antes de la administración. Una composición farmacéutica comprende uno o más de los polipéptidos o conjugados de p97 descritos en el presente documento en combinación con un vehículo o excipiente fisiológicamente aceptable.

Para preparar una composición farmacéutica, se mezcla una cantidad eficaz o deseada de uno o más de los polipéptidos o conjugados de p97 con cualquier vehículo o excipiente farmacéutico conocido por los expertos en la materia como adecuado para el modo particular de administración. Un vehículo farmacéutico puede ser líquido, semilíquido o sólido. Las soluciones o suspensiones utilizadas para la aplicación parenteral, intradérmica, subcutánea o tópica pueden incluir, por ejemplo, un diluyente estéril (tal como agua), solución salina (p. ej., solución salina tamponada con fosfato; PBS), aceite no volátil, polietilenglicol, glicerina, propilenglicol u otro disolvente sintético; agentes antimicrobianos (tales como alcohol bencílico o metil parabenos); antioxidantes (tal como ácido ascórbico y bisulfito de sodio) y agentes quelantes (tal como ácido etilendiaminotetraacético (EDTA)); tampones (tal como acetatos, citratos y fosfatos). En caso de que se administren por vía intravenosa, los vehículos adecuados incluyen suero salino fisiológico o suero salino tamponado con fosfato (PBS) y soluciones que contienen agentes espesantes y solubilizantes, tales como glucosa, polietilenglicol, polipropilenglicol y mezclas de los mismos.

La administración de los polipéptidos y conjugados descritos en el presente documento, en forma pura o en una composición farmacéutica adecuada, puede realizarse a través de cualquiera de los modos aceptados de administración de agentes que sirven para utilidades similares. Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse combinando un polipéptido o conjugado o composición que contiene el conjugado con un vehículo, diluyente o excipiente fisiológicamente aceptable apropiado, y pueden formularse en preparaciones en formas sólida, semisólida, líquida o gaseosa, tales como comprimidos, cápsulas, polvos, gránulos, pomadas, soluciones, supositorios, inyecciones, inhalantes, geles, microesferas y aerosoles. Además, otros principios farmacéuticamente activos (incluidos otros agentes anticancerosos tal como se describe en otra parte del presente documento) y/o excipientes adecuados tales como sales, tampones y estabilizantes pueden, pero no necesariamente, estar presentes dentro de la composición.

La administración se puede lograr mediante una variedad de rutas diferentes, que incluyen oral, parenteral, nasal, intravenosa, intradérmica, subcutánea o tópica. Los modos de administración preferidos dependen de la naturaleza de la afección a tratar o prevenir.

Los vehículos pueden incluir, por ejemplo, vehículos excipientes o estabilizantes farmacéuticamente aceptables que no son tóxicos para la célula o mamífero que está expuesto a las dosificaciones y concentraciones empleadas. Con frecuencia, el vehículo fisiológicamente aceptable es una solución acuosa con pH tamponado. Ejemplos de transportadores fisiológicamente aceptables incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular (de menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes tales como EDTA; alcoholes de azúcar, tales como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como polisorbato 20 (TWEEN™), polietilenglicol (PEG) y poloxámeros (PLURONICS™), y similares.

En determinados aspectos, la secuencia polipeptídica de p97 y el agente están cada uno, de manera individual o como un conjugado preexistente, unidos a o encapsulados dentro de una partícula, por ejemplo, una nanopartícula, perla, formulación lipídica, partícula lipídica o liposoma, por ejemplo, inmunoliposoma. Por ejemplo, en realizaciones particulares, la secuencia polipeptídica de p97 está unida a la superficie de una partícula, y el agente de interés está unido a la superficie de la partícula y/o encapsulado dentro de la partícula. En algunas de estas y otras realizaciones relacionadas, el polipéptido de p97 y el agente están unidos covalente u operativamente entre sí solo a través de la partícula misma (por ejemplo, nanopartícula, liposoma), y no están unidos covalentemente entre sí de ninguna otra manera; es decir, están unidos individualmente a la misma partícula. En otras realizaciones, el polipéptido de p97 y

el agente primero se conjugan covalentemente o no covalentemente entre sí, como se describe en el presente documento (por ejemplo, a través de una molécula enlazadora), y después se unen o encapsulan dentro de una partícula (por ejemplo, inmunoliposoma, nanopartícula). En realizaciones específicas, la partícula es un liposoma, y la composición comprende uno o más polipéptidos de p97, uno o más agentes de interés y una mezcla de lípidos para formar un liposoma (p. ej., fosfolípidos, cadenas lipídicas mixtas con propiedades tensioactivas). En algunos aspectos, el polipéptido de p97 y el agente se mezclan individualmente con la mezcla de lípidos/liposomas, de modo que la formación de estructuras de liposomas es operativamente el polipéptido de p97 y el agente sin la necesidad de conjugación covalente. En otros aspectos, el polipéptido de p97 y el agente primero se conjugan covalentemente o no covalentemente entre sí, como se describe en el presente documento. y después se mezclan con lípido para formar un liposoma. El polipéptido de p97, el agente, o el conjugado p97-agente puede quedar atrapado en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial (por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsulas de gelatina y microcápsulas de poli(metilmetacrilato), respectivamente), en sistemas de suministro de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se divulgan en Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª edición, Oslo, A., Ed., (1980). La(s) partícula(s) o liposomas pueden comprender además otros agentes terapéuticos o de diagnóstico, tales como agentes citotóxicos.

La dosis concreta y la duración del tratamiento son en función de la enfermedad que se esté tratando y pueden determinarse de manera empírica usando protocolos de prueba conocidos o probando las composiciones en sistemas modelo conocidos en la técnica y extrapolando a partir de ellos. También se pueden realizar ensayos clínicos controlados. Las dosis también pueden variar con la gravedad de la afección a aliviar. Una composición farmacéutica generalmente se formula y administra para ejercer un efecto terapéuticamente útil mientras se minimizan los efectos secundarios no deseables. La composición puede administrarse de una vez o puede dividirse en una serie de dosis menores para su administración en intervalos de tiempo. Para cualquier sujeto particular, los regímenes de dosificación específicos pueden ajustarse con el tiempo de acuerdo con la necesidad individual.

Las rutas típicas para administrar estas y otras composiciones farmacéuticas relacionadas incluyen, sin limitación, oral, tópica, transdérmica, inhalación, parenteral, sublingual, bucal, rectal, vaginal, e intranasal. El término parenteral, tal como se usa en el presente documento, incluye inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, inyección intraesternal o técnicas de infusión. Las composiciones farmacéuticas de acuerdo con determinadas realizaciones de la presente invención se formulan para permitir que los principios activos contenidos en los mismos estén biodisponibles tras la administración de la composición a un paciente. Las composiciones que se administrarán a un sujeto o paciente podrán tener la forma de una o más unidades de dosificación, donde por ejemplo, un comprimido puede ser una unidad de dosificación individual, y un recipiente de un conjugado descrito en el presente documento en forma de aerosol puede contener una pluralidad de unidades de dosificación. Los procedimientos reales para preparar dichas formas farmacéuticas son conocidos o serán evidentes, para los expertos en la materia; por ejemplo, véase Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 20ª edición (Philadelphia College of Pharmacy and Science, 2000). La composición a administrar contendrá, en cualquier caso, una cantidad terapéuticamente eficaz de un polipéptido de p97, agente o conjugado descrito en el presente documento, para el tratamiento de una enfermedad o afección de interés.

Una composición farmacéutica puede estar en forma sólida o líquida. En una realización, el vehículo o los vehículos están formados por partículas, de forma que las composiciones están, por ejemplo, en forma de comprimidos o polvo. El vehículo o los vehículos pueden ser líquidos, siendo las composiciones, por ejemplo, un aceite oral, líquido inyectable o aerosol, que es útil en, por ejemplo, administración inhalatoria. Cuando se pretende para la administración oral, la composición farmacéutica está preferentemente bien en forma de un sólido o líquido, donde las formas semisólidas, semilíquidas, en suspensión y en gel se incluyen en las formas consideradas en el presente documento ya sea como sólido o como líquido.

Como una composición sólida para administración oral, la composición farmacéutica puede formularse en un polvo, gránulo, comprimido formado por compresión, píldora, cápsula, goma de mascar, oblea o similares. Tal composición sólida contendrá generalmente uno o más diluyentes inertes o vehículos comestibles. Además, pueden estar presentes uno o más de los siguientes: aglutinantes tales como carboximetilcelulosa, etilcelulosa, celulosa microcristalina, goma de tragacanto o gelatina; excipientes tales como almidón, lactosa o dextrinas, agentes disgregantes tales como ácido algínico, alginato de sodio, Primogel, almidón de maíz y similares; lubricantes tales como estearato de magnesio o Sterotex; agente deslizantes tales como dióxido de silicio coloidal; agentes edulcorantes tales como sacarosa o sacarina; un agente aromatizante tal como menta, salicilato de metilo o aromatizante de naranja; y un agente colorante. Cuando la composición farmacéutica está en forma de una cápsula, por ejemplo, una cápsula de gelatina, puede contener, además de los materiales del tipo anterior, un vehículo líquido tal como polietilenglicol o aceite.

La composición farmacéutica puede estar en forma de un líquido, por ejemplo, un elixir, jarabe, solución, emulsión o suspensión. El líquido puede ser para administración oral o para suministro por inyección, a modo de dos ejemplos. Cuando se pretende para la administración oral, la composición preferente contiene, además de los presentes compuestos, uno o más de un agente edulcorante, conservantes, tinte/colorante y un potenciador del aroma. En una composición pretendida para administrarse por inyección, pueden incluirse uno o más de un tensioactivo,

conservante, agente humectante, agente dispersante, agente de suspensión, tampón, estabilizante y agente isotónico.

5 Las composiciones farmacéuticas líquidas, ya sean soluciones, suspensiones u otra forma similar, pueden incluir uno o más de los siguientes adyuvantes: diluyentes estériles tales como agua para inyección, solución salina, preferentemente suero salino fisiológico, solución de Ringer, cloruro de sodio isotónico, aceites no volátiles tales como mono o diglicéridos sintéticos que pueden servir como disolvente o medio de suspensión, polietilenglicoles, glicerina, propilenglicol u otros disolventes; agentes antibacterianos tales como alcohol bencílico o metil parabeno; antioxidantes, tales como ácido ascórbico o bisulfito sódico; agentes quelantes, tales como ácido etilendiaminatetraacético; tampones, tales como acetatos, citratos o fosfatos y agentes para el ajuste de la tonicidad tales como cloruro de sodio o dextrosa. La preparación parenteral puede encerrarse en ampollas, jeringuillas desechables o viales multidosis hechos de vidrio o plástico. El suero salino fisiológico es un adyuvante preferente. Una composición farmacéutica inyectable es preferentemente estéril.

15 Una composición farmacéutica líquida pretendida para administración bien parenteral u oral contendría una cantidad de un polipéptido o conjugado de p97 como se divulga en el presente documento de modo que se obtenga una dosificación adecuada. Generalmente, esta cantidad es al menos un 0,01 % de un agente de interés en la composición. Cuando se pretende para la administración oral, esta cantidad puede variar entre un 0,1 y aproximadamente un 70 % del peso de la composición. Determinadas composiciones farmacéuticas orales
20 contienen entre aproximadamente un 4 % y aproximadamente un 75 % del agente de interés. En determinadas realizaciones, las composiciones y preparaciones farmacéuticas de acuerdo con la presente invención se preparan de modo que una unidad de dosificación parenteral contenga entre un 0,01 y un 10 % en peso del agente de interés antes de dilución.

25 La composición farmacéutica puede pretenderse para administración tópica, en cuyo caso el vehículo puede comprender adecuadamente una solución, emulsión, pomada o base de gel. La base, por ejemplo, puede comprender uno o más de los siguientes: vaselina, lanolina, polietilenglicoles, cera de abeja, aceite mineral, diluyentes tales como agua y alcohol, y emulgentes y estabilizantes. Pueden estar presentes agentes espesantes en una composición farmacéutica para administración tópica. Si se pretenden para administración transdérmica, la
30 composición puede incluir un parche transdérmico o dispositivo de iontoforesis.

La composición farmacéutica puede pretenderse para administración rectal, en la forma, por ejemplo, de un supositorio, que se fundirá en el recto y liberará el fármaco. La composición para administración rectal puede
35 contener una base oleaginosa como excipiente no irritante adecuado. Tales bases incluyen, sin limitación, lanolina, manteca de cacao y polietilenglicol.

La composición farmacéutica puede incluir diversos materiales, que modifican la forma física de una unidad de dosificación sólida o líquida. Por ejemplo, la composición puede incluir materiales que forman una cubierta de revestimiento alrededor de los principios activos. Los materiales que forman la cubierta de revestimiento son
40 generalmente inertes, y se pueden seleccionar entre, por ejemplo, azúcar, laca, y otros agentes de revestimiento entéricos. Como alternativa, los principios activos se pueden encerrar en una cápsula de gelatina. La composición farmacéutica en forma sólida o líquida puede incluir un agente que se une al conjugado o agente y ayuda de ese modo al suministro del compuesto. Agentes adecuados que pueden actuar con esta capacidad incluyen anticuerpos monoclonales o policlonales, una o más proteínas o un liposoma.

45 La composición farmacéutica puede consistir esencialmente en unidades de dosificación que pueden administrarse como un aerosol. El término aerosol se utiliza para indicar una diversidad de sistemas que varían desde aquellos de naturaleza coloidal a sistemas que consisten en envases presurizados. El suministro puede ser mediante un gas licuado o comprimido o mediante un sistema de bomba adecuado que dosifica los principios activos. Los aerosoles
50 pueden suministrarse en sistemas monofásicos, bifásicos o trifásicos para suministrar los principios activos. El suministro del aerosol incluye el recipiente necesario, activadores, válvulas, subrecipientes y similares, que juntos pueden formar un kit. Un experto habitual en la materia, sin experimentación indebida puede determinar aerosoles preferentes.

55 Las composiciones que comprenden conjugados como se describe en el presente documento pueden prepararse con vehículos que protegen los conjugados contra la eliminación rápida del cuerpo, tales como formulaciones de liberación prolongada o recubrimientos. Dichos vehículos incluyen formulaciones de liberación controlada, tal como, pero sin limitación, implantes y sistemas de suministro microencapsulado y polímeros biodegradables y biocompatibles, tales como acetato de etilvinilo, polianhídridos, ácido poliglicólico, poliortoésteres, ácido poliláctico
60 y otros conocidos por los expertos habituales en la materia.

Las composiciones farmacéuticas pueden prepararse mediante procedimientos bien conocidos en la técnica farmacéutica. Por ejemplo, una composición farmacéutica pretendida para administrarse por inyección puede prepararse combinando una composición que comprende un conjugado como se describe en el presente documento y opcionalmente, una o más de sales, tampones y/o estabilizantes, con agua destilada estéril para formar una
65 solución. Se puede añadir un tensioactivo para facilitar la formación de una solución o suspensión homogénea. Los

tensioactivos son compuestos que interactúan no covalentemente con el conjugado de modo que faciliten la disolución o suspensión homogénea del conjugado en el sistema de suministro acuoso.

5 Las composiciones pueden administrarse en una cantidad terapéuticamente eficaz, que variará dependiendo de una variedad de factores que incluyen la actividad del compuesto específico (por ejemplo, conjugado) empleado; la estabilidad metabólica y duración de acción del compuesto; la edad, el peso corporal, el estado de salud general, sexo, y dieta del paciente; el modo y tiempo de administración; la tasa de excreción; la combinación de fármacos; la gravedad del trastorno o afección particular; y el sujeto que experimenta terapia. Por lo general, una dosis diaria terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,001 mg/kg (es decir, ~ 0,07 mg) a 10 aproximadamente 100 mg/kg (es decir, ~ 7,0 g); preferentemente una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 0,01 mg/kg (es decir, ~ 0,7 mg) a aproximadamente 50 mg/kg (es decir, ~ 3,5 g); más preferentemente, una dosis terapéuticamente eficaz es (para un mamífero de 70 kg) de aproximadamente 1 mg/kg (es decir, ~ 70 mg) a aproximadamente 25 mg/kg (es decir, ~ 1,75 g).

15 Las composiciones que comprenden los conjugados descritos en el presente documento también pueden administrarse simultáneamente con, antes o después de la administración de uno o más de otros agentes terapéuticos, tal como se describe en el presente documento. Por ejemplo, en una realización, el conjugado se administra con un agente antiinflamatorio. Agentes antiinflamatorios o fármacos incluyen, pero sin limitación, esteroides y glucocorticoides (incluyendo betametasona, budesonida, dexametasona, acetato de hidrocortisona, 20 hidrocortisona, hidrocortisona, metilprednisolona, prednisolona, prednisona, triamcinolona), fármacos antiinflamatorios no esteroideos (AINE) incluyendo aspirina, ibuprofeno, naproxeno, metotrexato, sulfasalazina, leflunomida, medicinas anti-TNF, ciclofosfamida y micofenolato.

25 Tal terapia de combinación puede incluir administración de una formulación de dosificación farmacéutica única que contiene un compuesto de la invención y uno o más agentes activos adicionales, así como administración de composiciones que comprenden conjugados de la invención y cada agente activo en su propia formulación de dosificación farmacéutica separada. Por ejemplo, un conjugado como se describe en el presente documento y el otro agente activo pueden administrarse al paciente juntos en una composición de dosificación oral única tal como un comprimido o cápsula, o cada agente administrarse en formulaciones de dosificación oral separadas. De manera 30 similar, un conjugado como se describe en el presente documento y el otro agente activo se pueden administrar al paciente juntos en una única composición de dosificación parenteral, tal como en una solución salina u otra solución fisiológicamente aceptable, o cada agente administrarse en formulaciones de dosificación parenteral separadas. Cuando se usan formulaciones de dosificación separadas, las composiciones que comprenden conjugados y uno o más agentes activos adicionales se pueden administrar esencialmente al mismo tiempo, es decir, simultáneamente, 35 o en momentos escalonados por separado, es decir, secuencialmente y en cualquier orden; se entiende que la terapia de combinación incluye todos estos regímenes.

Los siguientes Ejemplos se presentan como ilustración y no como limitación.

40 Ejemplos

EJEMPLO 1

FRAGMENTOS DE GENERACIÓN DE MELANOTRANSFERRINA HUMANA (P97)

45 Se realizaron digestiones químicas y enzimáticas a escala de melanotransferrina humana (p97) usando bromuro de cianógeno (CNBr) y tripsina, para generar fragmentos de p97 para probar en un modelo *in vitro* de transporte de la barrera hematoencefálica (BHE).

50 Digestión con CNBr: A una muestra de proteína de 500 µl de p97 humana (10 mg/ml), se añadieron 2,664 ml de ácido fórmico al 88 % y 166,5 µl de CNBr 5 M en acetonitrilo. La muestra se agitó con formación de vórtice, se cubrió con papel de aluminio y se incubó durante 24 horas a temperatura ambiente en una campana de extracción química. Para interrumpir la reacción, se añadieron 10 volúmenes de agua de grado MS. El material de digestión se congeló a -80 °C y se liofilizó durante la noche. La muestra se almacenó a -20 °C hasta la purificación. El material de digestión 55 se volvió a solubilizar en 5 ml de ácido fórmico al 0,1 % y se purificó usando cartuchos Sep-Pack C8 de 12cc de Waters. El material de digestión purificado se congeló a -80 °C y se liofilizó durante la noche. El producto liofilizado se almacenó después a -20 °C. La Tabla 1 muestra un ejemplo de fragmentos de p97 predichos producto de digestión con CNBr.

60

Tabla 1: Producto de Digestión con CNBr Predichos

Posición del Sitio de Escisión	Longitud del Péptido (AA)	Masa del Péptido (Da)	Fragmento de P97 predicho-Restos de p97 Humana de Longitud Completa (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:
2	2	206,3	1-2	N/D
20	18	2091,3	3-20	19
137	117	12432,1	21-137	20

(continuación)

Posición del Sitio de Escisión	Longitud del Péptido (AA)	Masa del Péptido (Da)	Fragmento de P97 predicho-Restos de p97 Humana de Longitud Completa (SEQ ID NO:1)	SEQ ID NO:
293	156	16894,7	138-293	21
333	40	4578,1	294-333	22
363	30	3447,1	334-363	23
388	25	2884,4	364-388	24
609	221	24044,7	389-609	25
641	32	3670,1	610-641	26
685	44	4892,5	642-685	27
692	7	695,7	686-692	28

El análisis SDS-PAGE se realizó en el producto digerido y purificado. Las muestras de proteínas naturales y digeridas se cargaron en un gel Bis-Tris al 4-12 %, y el gel se ejecutó usando un voltaje constante de 200 V durante 35 minutos con una corriente inicial de 114 mA y una corriente final de 65 mA. Tras la electroforesis, el gel se enjuagó 3Xdurante cinco minutos cada una con 200 ml de agua Milli-Q. Después se tiñó el gel con 20 ml de reactivo de tinción GelCode Blue durante la noche, y posteriormente se tiñó con 200 ml de agua Milli-Q durante una hora. El análisis SDS-PAGE se muestra en la Figura 1 (Carril 1, vacío; Carril 2, Último SeeBlue; Carriles 2-5, vacíos; Carril 6, 50 µg de p97 no digerida; carriles 7-9, vacíos; Carril 10, 50 µg de p97 digerida con CNBr; carriles 11-12, vacíos). Carril 6, la muestra de proteína no digerida, tenía muchas bandas que indicaban que la proteína p97 tenía impurezas. Carril 10, el producto de digestión con CNBr, y al menos tres bandas visibles como grandes fragmentos de productos de digestión.

Estas tres bandas se extirparon, digeridas en gel con tripsina y se extrajeron y analizaron por análisis LC-MS/MS. Los resultados se muestran en las Figuras 3-6. La Figura 3 muestra los mapas de cobertura de secuencia de los fragmentos de p97 identificados por análisis MS/MS de un producto de digestión con CNBr de p97 humana; La Figura 3A muestra los resultados para la banda 1, La Figura 3B muestra los resultados para la banda 2, y la Figura 3B muestra los resultados para la banda 3.

La Figura 4A muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 1 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La Figura 4B enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas. La Figura 5A muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 2 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La Figura 5B enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas. La Figura 6A muestra la coincidencia de los péptidos detectados en la banda 3 con la secuencia de aminoácidos de p97 humana; la cobertura de secuencia de los péptidos coincidentes se indica en negrita. La Figura 6B enumera los péptidos individuales junto con determinadas características físicas.

Digestión con Tripsina: A una muestra de proteína de 500 µl de p97 humana (10 mg/ml), se añadieron 0,5 ml de bicarbonato de amonio 25 mM. Se añadieron cincuenta microlitros de DTT 200 mM (en Ambic 25 mM) y se redujo durante 30 minutos a 37 °C. Se añadieron doscientos microlitros de yodoacetamida 200 mM (en Ambic 25 mM) y se alquilaron cisteínas libres durante 30 minutos a 37 °C. A continuación, se añadieron 250 µg de tripsina porcina (Promega) a la muestra y la digestión se realizó durante la noche a 37 °C. El material de digestión se purificó usando cartuchos Oasis HLB de 6cc de Waters. El material de digestión purificado se congeló a 80 °C y se liofilizó durante la noche. El producto liofilizado se almacenó a -20 °C.

Para el análisis MS, los productos de digestión triptica de p97 liofilizados se rehidrataron en 1 ml de ácido fórmico al 0,1 % y acetonitrilo al 3 %. Se cargó un microgramo en una columna C18 y se inyectó en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo). El análisis MS/MS mostró que la muestra contenía una cantidad de contaminantes proteicos, pero también confirmó que la digestión con tripsina de p97 fue exitosa.

Se muestran los resultados en la Figura 2. Las Figuras 2A-2D muestran una lista de fragmentos de p97 identificados por análisis MS/MS de un producto de digestión con tripsina en solución de p97 humana, y la Figura 2E muestra el mapa de cobertura de secuencia de ese análisis.

EJEMPLO 2

PRUEBA DE FRAGMENTOS DE P97 EN UN MODELO *IN VITRO* DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Se realizaron experimentos para evaluar el paso de mezclas de fragmentos peptídicos de p97 a través de la barrera hematoencefálica (BHE) usando un modelo *in vitro* de BHE relevante y predictivo (véase Cecchelli et al., Adv. Drug Deliv. Rev. 36:165-178, 1999). El modelo utiliza células endoteliales capilares cerebrales cocultivadas con células gliales, para imitar estrechamente la BHE *in vivo* (véase Lundquist et al., Pharm. Res. 16:976-981,2002).

Modelo basado en células de la BHE: Para proporcionar un sistema *in vitro* para estudiar las funciones capilares cerebrales, se estableció un proceso de cocultivo que imita estrechamente la BHE *in vivo* cultivando células endoteliales capilares cerebrales en un lado de un filtro y células gliales de soporte en el otro lado. De manera específica, las células endoteliales se cultivaron en el compartimento superior del filtro y las células gliales en el compartimento inferior del plástico de una placa de seis pocillos (véanse las Figuras 7 y 8). En estas condiciones, las células endoteliales conservan los marcadores endoteliales apropiados (p. ej., antígeno relacionado con el factor VIII, superficie no trombogénica, producción de prostaciclina, actividad de la enzima conversiva de la angiotensina), y también conservan las características relevantes de la BHE (p. ej., presencia de uniones estrechas, escasez de vesículas pinocitóticas, actividad de monoaminooxidasa, actividad γ -glutamyltranspeptidasa, actividad de glicoproteína P, receptores específicos para lipoproteínas de baja densidad y transferrina).

Cultivo de Células Gliales. Se aislaron cultivos primarios de células gliales de la corteza cerebral de ratas recién nacidas (Booher y Sensenbrenner, *Neurobiology*. 2:97-105, 1972). Después de retirar las meninges, el tejido cerebral fue forzado suavemente a través de un tamiz de nylon. Se utilizó DMEM (medio Eagle modificado por Dulbecco) suplementado con suero fetal de ternera al 10 (v/v) (FCS, igual que el suero fetal bovino: FBS), glutamina 2 mM y 50 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ de gentamicina para la disociación de tejido cerebral y desarrollo de células gliales. Tres semanas después de la siembra, los cultivos gliales se estabilizaron y se compusieron de astrocitos (~ 60 %), oligodendrocitos y células microgliales (Descamps et al., *Glia*. 42:46-58, 2003).

Preparación de insertos de filtro. Los insertos en placa de cultivo (tamaño de poro Transwell PE de 3 μm ; diámetro de 24 mm, COSTAR, 3452/tamaño de poro Transwell PC de 3 μm ; diámetro de 24 mm, COSTAR, 3414) se recubrieron en la parte superior con colágeno de cola de rata.

Cocultivo de células endoteliales capilares cerebrales con células gliales. Las células gliales se colocaron en placas a una concentración de aproximadamente $1,25 \times 10^5$ células/ml en placas de plástico de seis pocillos y se incubaron a 37 °C con CO₂ al 5 %. El medio se cambió dos veces por semana. Tres semanas después de la siembra, los cultivos de células gliales se estabilizaron. A continuación, los subclones de células endoteliales congeladas en el pase 3 se cultivaron en una placa de Petri recubierta de gelatina de 60 mm de diámetro. Las células endoteliales confluentes se tripsinizaron y se colocaron en placas en el lado superior de los filtros a una densidad de 4×10^5 células/ml. El medio utilizado para el cocultivo fue DMEM suplementado con suero de ternera (CS) al 10 % (v/v) y de suero de caballo (HS, por sus siglas en inglés) al 10 % (v/v), glutamina 2 mM y 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de gentamicina, y se añadió 1 ng/ml de factor de crecimiento de fibroblastos básico cada dos días. En estas condiciones, las células endoteliales formaron una monocapa confluyente después de aproximadamente 12 días.

Se utilizó Lucifer Yellow se utilizó como marcador paracelular durante la evaluación de los péptidos de prueba para confirmar la integridad del modelo de BHE. Esta pequeña molécula hidrófila presenta una baja penetración cerebral y su coeficiente de permeabilidad endotelial revela la integridad de la monocapa de células endoteliales, lo que sirve como un control útil. El día de los experimentos, se añadió Ringer-HEPES (NaCl, 150 mM; KCl, 5.2 mM; CaCl₂, 2.2 mM; MgCl₂ 6H₂O, 0.2 mM; NaHCO₃, 6 mM; HEPES, 5 mM; glucosa 2,8 mM) al compartimento inferior (lado abluminal) de una placa de seis pocillos (3 ml por pocillo). Los filtros con o sin células endoteliales se lavaron con la solución Ringer-HEPES durante 10 minutos a 37 °C para minimizar las trazas de suero, y luego se transfirieron a cada pocillo de la placa de seis pocillos. Se colocó un volumen de 1 ml de solución Ringer-HEPES que contenía los fragmentos peptídicos en combinación con Lucifer Yellow (20 μM) en el compartimento superior (lado luminal) del pocillo.

Los experimentos se realizaron por triplicado con filtros que contenían una monocapa confluyente de células endoteliales (para pruebas de integridad de la BHE o evaluación del paso de fragmentos de péptidos), o por triplicado con filtros vacíos recubiertos solo con colágeno (prueba de filtro). Las incubaciones se realizaron en una plataforma oscilante durante 120 minutos a 37 °C. Al final del período de incubación, se recogieron partes alícuotas de los líquidos luminal y abluminal para el recuento de fluorescencia para evaluar la integridad de la membrana (Lucifer Yellow) y el análisis LC/MS para evaluar el paso de los fragmentos peptídicos de p97 a través del filtro vacío o de la monocapa endotelial, tal como se detalla a continuación.

Análisis de Fluorescencia. Se usó Lucifer Yellow (20 μM) como marcador paracelular para controlar la permeabilidad de la BHE, y se analizó mediante un contador de fluorescencia (Flouroskan Ascent, Thermolabs Systems). La fluorescencia se determinó en muestras representativas de cada compartimento inferior del triplicado y de la solución inicial (que contiene péptidos de prueba y Lucifer Yellow). Para el lado abluminal (compartimento inferior), se añadieron alícuotas de 200 μl a placas de 96 pocillos y se midieron por recuento de fluorescencia, y para el lado luminal (compartimento superior), se agregaron alícuotas de 20 μl a T0 y T120 minutos a placas de 96 pocillos y se midieron por recuento de fluorescencia.

Análisis LC/MS de Productos de Digestión con Tripsina. Se retiraron trescientos microlitros de cada pocillo y se agruparon en un solo tubo para cada punto temporal/fracción/tamaño de poro. Se añadieron quinientos microlitros de ácido fórmico al 0,1 % a cada muestra para la acidificación. Los péptidos se purificaron usando cartuchos Oasis HLB de 10cc de Waters, y los péptidos purificados se congelaron a -80 °C y se liofilizaron durante la noche. Las muestras se rehidrataron en 30 μl (acetonitrilo al 20 %, FA al 0,1 %). Se analizaron quince microlitros de cada muestra por LC-

MS/MS en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo), y los datos (archivos sin procesar) se analizaron con el paquete de software Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific). Las listas de máximos se enviaron a un servidor Mascot 2.3 contra la base de datos Uniprot-Swissprot. Las áreas de máximos se calcularon para los tres péptidos superiores para cada proteína detectada con alta confianza.

5 Los péptidos trípticos se detectaron en los compartimientos luminal y abluminal para los tamaños de poros tanto de 0,3 como de 0,4 μm después de 120 minutos. Basado en el área de máximos de los tres péptidos de p97 superiores, la relación de péptidos en el lado luminal con los del lado abluminal fue de aproximadamente 2:1. Los resultados para péptidos de p97 específicos se muestran en la Tabla 2 (tamaño de poro de 3 micras) y en la Tabla 3 (tamaño de poro de 4 micras) a continuación.

10

Tabla 2. Péptidos Tripticos a Tamaño de Poro de 3 Micras

Secuencia de Péptidos Tripticos (SEQ ID NO:)	Ablum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
LFSHEGSSFQMFSSAYGQK (SEQ ID NO:55)	1,28E+09	4,55E+09	Alta	115	2,50E+11	Alta	130	8,40E-13
HTTVFDNTNGHNSPWAALR (SEQ ID NO:56)	1,28E+09	1,05E+10	Alta	106	2,80E-10	Alta	103	5,80E-10
HTTVFDNTNGHNSPWAALR (SEQ ID NO:56)	7,04E+09	1,92E+10	Alta	101	9,50E-10	Alta	109	1,40E-10
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	5,49E+08	5,51E+09	Alta	101	2,80E-10	Alta	125	1,20E-12
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	7,34E+07	6,15E+08	Alta	100	6,60E-10	Alta	111	6,40E-11
TLPSWGOALLSQDFELLR (SEQ ID NO:59)	2,25E+06	1,94E+09	Alta	94	5,10E-09	Alta	133	6,80E-13
AQDLFGDDHKNKGF (SEQ ID NO:15)	9,09E+08	5,40E+08	Alta	87	2,40E-08	Alta	72	7,10E-07
CLAEGAGDVAFVK (SEQ ID NO:60)	2,20E+09	4,38E+09	Alta	87	3,10E-08	Alta	92	7,90E-09
MFDSSNYHGQDLFLK (SEQ ID NO:61)	9,62E+08	2,06E+09	Alta	86	2,50E-08	Alta	81	7,20E-08
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	1,59E+10	1,11E+10	Alta	82	8,50E-08	Alta	82	9,10E-08
LFSHEGSSFQMFSSAYGQK (SEQ ID NO:55)	1,94E+08	1,06E+09	Alta	81	5,50E-08	Alta	104	3,20E-10
MFDSSNYHGQDLFLK (SEQ ID NO:61)	5,67E+09	1,73E+10	Alta	79	1,40E-07	Alta	79	1,50E-07
MFDSSNYHGQDLFLK (SEQ ID NO:61)	3,22E+07	1,01E+08	Alta	79	1,10E-07	Alta	77	1,60E-07
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	3,58E+09	7,79E+09	Alta	76	1,50E-07	Alta	79	7,30E-08
GDSSGEGVCDKSPLE (SEQ ID NO:6)	1,93E+09	5,08E+08	Alta	74	3,10E-07	Alta	82	4,20E-08
AQDLFGDDHKNKGF (SEQ ID NO:15)	4,27E+08	7,66E+07	Alta	74	3,80E-07	Media	28	1,50E-02
CGDMAVAFR (SEQ ID NO:11)	4,54E+08	2,20E+08	Alta	71	3,40E-07	Alta	79	5,50E-08
LFSHEGSSFQMFSSAYGQKDLFLK (SEQ ID NO:62)	1,30E+07	8,27E+07	Alta	70	1,40E-06	Alta	33	6,00E-03
RDSSHAFTLDEL (SEQ ID NO:63)	1,66E+09	5,02E+09	Alta	68	2,70E-06	Alta	80	1,60E-07
AQDLFGDDHKNK (SEQ ID NO:64)	3,69E+09	1,08E+09	Alta	63	4,50E-06	Alta	55	2,60E-05
L SVMGCDVLK (SEQ ID NO:65)	2,43E+09	1,07E+10	Alta	62	9,70E-06	Alta	53	8,40E-05
SEDYELLPNGAR (SEQ ID NO:14)	2,52E+08	1,25E+08	Alta	62	3,90E-06	Alta	49	8,00E-05
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	8,66E+08	1,99E+09	Alta	60	1,20E-05	Alta	59	1,40E-05
SSHVTIDLKGVK (SEQ ID NO:4)	1,12E+08	4,73E+07	Alta	60	8,50E-06	Alta	57	1,30E-05
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	1,01E+09	1,37E+08	Alta	59	5,00E-06	Alta	57	7,90E-06
HTTVFDNTNGHNSPWAALR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	2,95E+07	Alta	55	2,90E-05	Alta	51	6,20E-05

(continuación)

Secuencia de Péptidos Tripticos (SEQ ID NO:)	Ablum 120: Area	Lum 120: Area	Confen Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Confen Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
LSVMGCDVLIK (SEQ ID NO:65)	4,85E+08	3,08E+09	Alta	55	4,70E-05	Alta	53	8,10E-05
DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13)	5,87E+09	1,03E+10	Alta	54	5,20E-05	Alta	59	1,70E-05
LCRGDSSGEGVCDK (SEQ ID NO:5)	2,64E+05	2,17E+05	Alta	52	2,90E-05	Alta	47	9,70E-05
SSHVTIDTLK (SEQ ID NO:67)	3,37E+09	1,74E+09	Alta	48	1,90E-04	Alta	43	6,80E-04
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	4,39E+09	1,00E+09	Alta	46	3,00E-04	Alta	45	4,20E-04
VPAHAVVVR (SEQ ID NO:9)	1,24E+08	3,48E+07	Alta	45	6,50E-05	Alta	40	2,00E-04
ADVTEWR (SEQ ID NO:8)	1,05E+10	9,31E+08	Alta	44	4,80E-04	Alta	48	2,30E-04
RSSHVTIDTLK (SEQ ID NO:3)	1,64E+08	9,53E+07	Alta	43	6,90E-04	Alta	45	4,10E-04
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	2,10E+09	2,51E+08	Alta	42	4,80E-04	Alta	60	7,40E-06
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:68)	1,09E+07	0,00E+00	Media	37	4,20E-03			
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	6,41E+09	1,00E+09	Media	31	3,80E-03	Alta	51	3,70E-05
GLLCDPNR (SEQ ID NO:69)	1,65E+09	1,97E+08	Media	30	8,60E-03	Media	29	1,20E-02
DSSHAFTLDELRLGK (SEQ ID NO:70)	1,99E+07	0,00E+00	Baja	26	5,20E-02			
GLLCDPNRLPPYLRL (SEQ ID NO:71)	6,75E+09	2,32E+10	Baja	25	3,20E-02	Baja	19	1,40E-01
EHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAWRR (SEQ ID NO:72)	1,70E+07	0,00E+00	Baja	22	5,30E-02			
GLLCDPNRLPPYLRL (SEQ ID NO:71)	1,09E+07	2,00E+08	Baja	18	2,00E-01	Media	26	3,10E-02
CVGNSQERYGYR (SEQ ID NO:73)	4,94E+06	0,00E+00	Baja	18	1,30E-01			
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	1,30E+08	5,49E+08	Baja	16	4,10E-01	Alta	72	1,20E-06
DSTSELVPIATQTYEAWLGHLEYLHAMIK (SEQ ID NO:75)	1,55E+07	3,56E+08	Baja	15	4,10E-01	Baja	11	1,00E+00
DSTSELVPIATQTYEAWLGHLEYLHAMIK (SEQ ID NO:75)	0,00E+00	0,00E+00	Baja	12	7,80E-01			
TLPSWQGALLSQDFELLOR (SEQ ID NO:59)	0,00E+00	0,00E+00				Alta	111	1,00E-10
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	0,00E+00	0,00E+00				Alta	79	1,20E-07
IQAEQVDVAVTLGSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	3,48E+06				Alta	75	4,30E-07
HSTVLENTDGK (SEQ ID NO:77)	0,00E+00	2,10E+07				Alta	66	2,70E-06
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:78)	0,00E+00	9,38E+07				Alta	62	8,40E-06
LLNEGQR (SEQ ID NO:79)	0,00E+00	1,77E+07				Alta	43	4,30E-04
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	0,00E+00	0,00E+00				Alta	40	1,20E-03
ADTDGGLIFRLLNEGQR (SEQ ID NO:81)	0,00E+00	3,69E+07				Alta	40	1,50E-03
HTTVFDNTNGHNSPWAELR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	0,00E+00				Alta	38	1,20E-03

Tabla 3. Péptidos Tripticos a Tamaño de Poro de 4 Micras

Secuencia de Péptidos Tripticos	Ablum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESLCR (SEQ ID NO:57)	7,98E+08	5,03E+09	Alta	123	1,70E-12	Alta	110	3,80E-11
HTTVFDNTNGHINSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	9,47E+09	1,79E+10	Alta	116	3,10E-11	Alta	102	6,70E-10
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	2,07E+09	4,14E+09	Alta	109	1,00E-10	Alta	127	1,50E-12
TLPSWGQALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:59)	2,21E+06	1,94E+09	Alta	103	6,90E-10	Alta	125	3,80E-12
HTTVFDNTNGHINSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	1,86E+09	1,01E+10	Alta	101	8,10E-10	Alta	97	2,20E-09
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	3,04E+08	1,24E+09	Alta	99	8,90E-10	Alta	97	1,60E-09
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	1,57E+10	8,04E+09	Alta	88	2,40E-08	Alta	85	4,70E-08
NYPSSILCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	1,09E+08	5,52E+08	Alta	87	1,60E-08	Alta	84	2,70E-08
AQDLFGDDHKNKGFK (SEQ ID NO:15)	5,25E+08	6,29E+07	Alta	85	3,20E-08	Alta	43	4,50E-04
CLAEAGADVAFVK (SEQ ID NO:60)	2,06E+09	5,13E+09	Alta	83	6,90E-08	Alta	103	7,10E-10
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	9,03E+09	1,79E+10	Alta	78	1,60E-07	Alta	76	3,00E-07
GDSSGEGVCKSPLER (SEQ ID NO:6)	2,34E+09	4,75E+08	Alta	78	1,20E-07	Alta	82	5,00E-08
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	1,99E+08	5,41E+08	Alta	77	3,60E-07	Alta	72	1,20E-06
CGDMVAEFR (SEQ ID NO:11)	3,92E+09	8,68E+09	Alta	76	1,40E-07	Alta	76	1,40E-07
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	1,23E+09	2,13E+09	Alta	74	3,40E-07	Alta	90	9,30E-09
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	0,00E+0	0,00E+00	Alta	73	6,80E-07	Baja	15	4,70E-01
CGDMVAEFR (SEQ ID NO:11)	5,90E+08	2,62E+08	Alta	70	3,60E-07	Alta	70	4,40E-07
SSHVTIDTLKGVK (SEQ ID NO:4)	1,37E+08	5,71E+07	Alta	70	7,30E-07	Alta	60	7,20E-06
AQDLFGDDHKNKGFK (SEQ ID NO:15)	2,84E+09	5,20E+08	Alta	70	1,10E-06	Alta	64	4,90E-06
MFDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:61)	4,19E+07	1,06E+08	Alta	68	1,20E-06	Alta	86	2,10E-08
AQDLFGDDHKNK (SEQ ID NO:64)	4,05E+09	1,19E+09	Alta	67	1,80E-06	Alta	66	2,00E-06
DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13)	9,64E+09	9,87E+09	Alta	67	2,70E-06	Alta	51	9,50E-05
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	3,09E+08	9,88E+07	Alta	65	2,00E-06	Alta	35	2,10E-03
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	1,42E+09	1,70E+08	Alta	64	1,50E-06	Alta	59	5,30E-06
RDSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:63)	2,01E+09	5,70E+09	Alta	64	7,90E-06	Alta	75	5,90E-07
LVMGCDVVK (SEQ ID NO:65)	3,34E+09	1,06E+10	Alta	60	1,60E-05	Alta	55	5,00E-05
LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQKDLLFK (SEQ ID NO:80)	2,40E+07	8,63E+07	Alta	57	2,40E-05	Alta	39	1,70E-03
LVMGCDVVK (SEQ ID NO:63)	6,72E+08	3,28E+09	Alta	53	7,00E-05	Alta	56	3,60E-05

(continuación)											
Secuencia de Péptidos Tripticos	Abum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Abum 120	Puntuación iónica en Abum 120	Valor esp en Abum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120			
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	2,40E+09	1,84E+08	Alta	52	5,60E-05	Alta	73	3,90E-07			
LCRGDSSGEGVCDK (SEQ ID NO:5)	5,97E+05	2,44E+05	Alta	51	3,70E-05	Alta	52	2,90E-05			
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	1,15E+09	1,92E+09	Alta	50	1,10E-04	Alta	60	1,10E-05			
HTTVFDNTNGHNSPWAELR (SEQ ID NO:56)	1,48E+07	2,91E+07	Alta	49	9,70E-05	Alta	46	2,10E-04			
RSSHVTIDTLK (SEQ ID NO:3)	2,23E+08	1,08E+08	Alta	48	1,90E-04	Alta	48	1,90E-04			
CGNMSEAFR (SEQ ID NO:82)	2,53E+07	0,00E+00	Alta	48	4,70E-05						
SSHVTIDTLK (SEQ ID NO:67)	3,87E+09	1,78E+09	Alta	46	5,20E-04	Alta	44	5,40E-04			
VPAHAVVVR (SEQ ID NO:9)	1,50E+08	4,52E+07	Alta	45	6,40E-05	Alta	39	2,70E-04			
ADVTEWR (SEQ ID NO:8)	1,10E+10	8,59E+08	Alta	44	4,80E-04	Alta	44	5,10E-04			
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	4,96E+09	1,03E+09	Alta	43	6,80E-04	Alta	57	2,50E-05			
DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:75)	1,42E+07	3,26E+08	Media	41	1,00E-03	Baja	18	1,80E-01			
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:68)	1,67E+07	0,00E+00	Media	40	1,90E-03						
TYGMNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:78)	1,38E+07	1,01E+08	Media	40	1,60E-03	Alta	57	2,70E-05			
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	6,88E+09	9,30E+08	Alta	39	7,90E-04	Alta	49	7,10E-05			
DSSHAFTLDELRGK (SEQ ID NO:70)	2,37E+07	0,00E+00	Baja	33	8,70E-03						
EHGLKPVGGEVYDQEVGTYYAVAVVRR (SEQ ID NO:72)	2,62E+07	0,00E+00	Media	31	5,80E-03						
GLLCDPNR (SEQ ID NO:69)	1,84E+09	1,72E+08	Baja	29	1,20E-02	Media	30	9,00E-03			
GLLCDPNRLPPYL (SEQ ID NO:71)	9,69E+09	2,33E+10	Baja	26	2,40E-02	Baja	24	4,20E-02			
ADTDGGLIFRLLNEGQR (SEQ ID NO:81)	5,53E+06	3,36E+07	Baja	26	4,10E-02	Alta	40	1,60E-03			
CVGNSQERYGYR (SEQ ID NO:73)	6,84E+06	0,00E+00	Baja	19	7,60E-02						
ADVTEWRQCHLAR (SEQ ID NO:83)	4,26E+06	0,00E+00	Baja	15	5,00E-01						
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	5,55E+06	1,46E+07	Baja	12	1,00E+00	Baja	16	3,80E-01			
TLPSWGCALLSQDFELLCR (SEQ ID NO:59)	0,00E+00	0,00E+00				Alta	107	2,90E-10			
LFSHEGSSQMFSSSEAYGQK (SEQ ID NO:55)	0,00E+00	1,27E+09				Alta	72	3,30E-07			
HSTVLENTDGK (SEQ ID NO:77)	0,00E+00	2,59E+07				Alta	62	6,70E-06			
IQAQVDAVTLSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	3,08E+06				Alta	53	7,70E-05			
IQAQVDAVTLSGE DIYTAG K (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	4,79E+07				Alta	49	1,60E-04			
LLNEGQR (SEQ ID NO:79)	0,00E+00	2,38E+07				Alta	43	4,70E-04			
DLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK (SEQ ID NO:84)	0,00E+00	3,76E+07				Alta	34	3,90E-03			
GLLCDPNRLPPYL (SEQ ID NO:71)	0,00E+00	2,30E+08				Media	26	3,00E-02			

(continuación)

Secuencia de Péptidos Tripticos	Ablum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
IQAEEQVDAVTLSGEDIYTAGK (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	0,00E+00				Baja	24	5,90E-02
DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAKM (SEQ ID NO:75)	0,00E+00	0,00E+00				Baja	12	7,30E-01
MFDSSNYHGQDILLFKDATVR (SEQ ID NO:85)	0,00E+00	0,00E+00						
AVPVGEKTTYR (SEQ ID NO:86)	0,00E+00	0,00E+00						

Análisis LCIMS de productos de digestión con CNBr. Se retiraron trescientos microlitros de cada pocillo y se agruparon en un solo tubo para cada punto temporal/fracción/tamaño de poro. Se añadieron quinientos microlitros de ácido fórmico al 0,1 % a cada muestra para la acidificación. Los fragmentos de proteínas con CNBr se purificaron usando cartuchos Sep=Pak Vac C8 de 12cc. Los fragmentos purificados se congelaron a -80 °C y se liofilizaron durante la noche. Los fragmentos por CNBr se rehidrataron con bicarbonato de amonio 25 mM, se redujeron con DTT y se alquilaron con yodoacetamida. La alquilación se interrumpió con una adición de sección de DTT. Después se agregaron seis microgramos de tripsina porcina purificada a cada pocillo y las muestras se colocaron durante la noche en una incubadora a 37 °C. La mañana siguiente, se purificaron los péptidos usando cartuchos Oasis HBL de 10 cc de Waters. Los péptidos purificados se congelaron a -80 °C y se liofilizaron durante la noche. Las muestras se rehidrataron en 30 µl (acetonitrilo al 20 %, FA al 0,1 %). Se analizaron quince microlitros de cada muestra por LC-MS/MS en un espectrómetro de masas LTQ Orbitrap Velos (Thermo), y los datos (archivos sin procesar) se analizaron con el paquete de software Proteome Discoverer 1.3.0.339 (Thermo Scientific). Las listas de máximos se enviaron a un servidor Mascot 2.3 contra la base de datos Uniprot-Swissprot. Las áreas de máximos se calcularon para los tres péptidos superiores para cada proteína detectada con alta confianza.

Los péptidos trípticos de los fragmentos de p97 con CNBr se detectaron en los compartimientos luminal y abluminal para los tamaños de poros tanto de 0,3 como de 0,4 µm después de 120 minutos. Basado en el área de máximos de los tres péptidos de p97 superiores, la relación de péptidos en el lado luminal con los del lado abluminal fue de aproximadamente 200:1. Los resultados para péptidos de p97 específicos se muestran en la Tabla 4 (tamaño de poro de 3 micras) y en la Tabla 5 (tamaño de poro de 4 micras) a continuación. Se detectaron péptidos trípticos de tres fragmentos distintos de p97 con CNBr (véase la Figura 9B).

Tabla 4: Productos de digestión con CNBr a Tamaño de Poro de 3 Micras

Secuencia de Péptidos con CNBr	Ablum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	3,92E+06	9,18E+08	Alta	65	1,50E-06	Alta	57	8,60E-06
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	1,46E+08	2,16E+10	Alta	57	8,20E-06	Alta	68	6,40E-07
VRPDTNIFTVYGLLDK (SEQ ID NO:88)	1,71E+07	1,73E+10	Alta	56	3,70E-06	Alta	79	2,10E-08
FSSEAYGQK (SEQ ID NO:89)	1,70E+06	2,39E+08	Alta	42	3,40E-04	Alta	42	3,20E-04
DSSHAFTLDEL (SEQ ID NO:13)	1,79E+06	1,18E+07	Media	32	4,10E-03	Alta	55	2,40E-05
HTTVFDNTNGHNSWPAAELR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	3,96E+08				Alta	110	3,20E-11
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESICR (SEQ ID NO:57)	0,00E+00	1,02E+07				Alta	107	1,80E-11
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	0,00E+00	2,34E+07				Alta	87	5,00E-09
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	0,00E+00	3,25E+07				Alta	85	2,80E-08
SEDYELLCPNGAR (SEQ ID NO:14)	0,00E+00	5,04E+07				Alta	77	7,90E-08
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:73)	0,00E+00	2,69E+07				Alta	75	2,00E-07
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:74)	0,00E+00	4,96E+07				Alta	67	6,90E-07
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:86)	0,00E+00	9,22E+07				Alta	66	7,90E-07
WCVLSTPEIQK (SEQ ID NO:67)	0,00E+00	1,04E+08				Alta	66	1,80E-06
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	0,00E+00	6,26E+08				Alta	64	1,50E-06
AQDLFGDDHMK (SEQ ID NO:64)	0,00E+00	2,28E+08				Alta	62	2,90E-06
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	0,00E+00	4,78E+06				Alta	57	6,60E-06
HTTVFDNTNGHNSWPAAELR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	1,83E+07				Alta	50	2,70E-05
YYDYSGAFR (SEQ ID NO:7)	0,00E+00	9,70E+06				Media	30	3,70E-03
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	0,00E+00	8,35E+06				Media	28	5,70E-03
GTSADHCVCVQAAGQEAADAITLDGGAIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0,00E+00	2,39E+07				Baja	15	4,10E-02
GTSADHCVCVQLIAAQEAADAITLDGGAIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0,00E+00	0,00E+00				Baja	11	1,50E-01

Tabla 5: Productos de digestión con CNBr a Tamaño de Poro de 4 Micras

Secuencia de Péptidos con CNBr	Ablum 120: Área	Lum 120: Área	Conf en Ablum 120	Puntuación iónica en Ablum 120	Valor esp en Ablum 120	Conf en Lum 120	Puntuación iónica en Lum 120	Valor esp en Lum 120
VRPDTNIFTVYGLLDK (SEQ ID NO:88)	8,42E+07	1,86E+10	Alta	78	2,60E-08	Alta	78	2,60E-08
SEDYELLCFNGAR (SEQ ID NO:14)	1,53E+07	1,04E+09	Alta	65	1,50E-06	Alta	59	6,20E-06
DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13)	1,69E+07	5,27E+07	Alta	47	1,20E-04	Alta	44	2,80E-04
FSSEAYGQK (SEQ ID NO:89)	2,05E+06	1,59E+08	Alta	39	6,60E-04	Alta	45	1,60E-04
LKPEIQCVSAK (SEQ ID NO:12)	5,38E+06	1,46E+07	Media	32	2,10E-03	Alta	54	1,40E-05
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	1,32E+08	2,17E+10	Baja	26	1,00E-02	Alta	67	7,60E-07
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	4,20E+08				Alta	115	1,10E-11
NYPSSLCALCVGDEQGR (SEQ ID NO:58)	0,00E+00	5,79E+07				Alta	96	7,10E-10
CLVENAGDVAFVR (SEQ ID NO:74)	0,00E+00	6,68E+07				Alta	79	7,00E-08
ADTDGGLIFR (SEQ ID NO:10)	0,00E+00	1,02E+07				Alta	73	4,50E-07
AQDLFGDDHKN (SEQ ID NO:64)	0,00E+00	1,98E+08				Alta	72	3,10E-07
FDSSNYHGQDLLFK (SEQ ID NO:87)	0,00E+00	1,07E+08				Alta	69	4,20E-07
TVGWNVPVGYLVESGR (SEQ ID NO:78)	0,00E+00	6,98E+07				Alta	67	7,80E-07
EAGIQPSLLCVR (SEQ ID NO:66)	0,00E+00	6,83E+08				Alta	66	1,00E-06
SEDYELLCFNGAR (SEQ ID NO:14)	0,00E+00	5,03E+07				Alta	65	1,30E-06
WCATSDPEQHK (SEQ ID NO:2)	0,00E+00	2,28E+06				Alta	62	1,90E-06
IQAQQVDAVTLSGE DYTAGK (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	1,80E+05				Alta	56	9,30E-06
HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	2,07E+07				Alta	50	2,80E-05
WCVLSLTPQIK (SEQ ID NO:68)	0,00E+00	2,22E+08				Alta	49	7,60E-05
GTSADHCVQAAQEAADAITLDGGAIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0,00E+00	3,05E+07				Alta	40	1,50E-04
TLPSWGGALLSQDFELLR (SEQ ID NO:56)	0,00E+00	0,00E+00						
AVSDYFGGSCVPGAGETSYSESCLR (SEQ ID NO:57)	0,00E+00	0,00E+00						
IQAQQVDAVTLSGEDYTAGK (SEQ ID NO:76)	0,00E+00	0,00E+00						
CLAEAGADVAFVK (SEQ ID NO:60)	0,00E+00	0,00E+00						
HSTVLENTDGGK (SEQ ID NO:77)	0,00E+00	0,00E+00						
GTSADHCVQLIAAQEAADAITLDGGAIYEAGK (SEQ ID NO:90)	0,00E+00	0,00E+00						

Usando las relaciones de área de máximo abluminal 120/luminal 120 como un criterio posible, los péptidos de p97 que tienen la mayor actividad de transporte de la BHE se muestran en las Tablas 6 (productos de digestión tríplicas) y 7 a continuación (productos de digestión con CNBr). Sin embargo, cualquiera de los fragmentos de p97 en las Tablas 2-5 que muestran un valor en el área abluminal 120 podría ser de posible interés para tener actividad de transporte de BHE.

Tabla 6. Péptidos tríplicas que cruzan la BHE en función de las relaciones de áreas de máximo abluminal/luminal

Secuencias Peptídicas	CONF	Abi 120)/lum120		Posición de AA	Estructura	SEQ ID NO:
		inserto de 0,4 um	inserto de 3,0 um			
WCATSDPEQHK	Alta	8,92	7,41	25-35	S-H	2
RSSHVTIDTLK	Alta	2,06	1,23	115-125	C-H	3
SSHVTIDTLKGVK	Alta	2,42	2,38	116-128		4
LCRGDSSGEGVCDK	Alta	2,45	1,21	188-201	C-H-C	5
GDSSGEGVCDKSPLER	Alta	4,93	3,80	191-206		6
YYDYSGAFR	Alta	7,40	ND	207-215		7
ADVTEWR	Alta	12,76	11,26	263-269	C	8
VPAHAVVVR	Alta	3,32	3,56	276-284	C-S-H	9
ADTDGGLIFR	Alta	1,95	1,44	285-294		10
CGDMAVAFR	Alta	2,26	2,06	379-387	H	11
LKPEIQCVSAK	Alta	4,81	4,37	391-401	C-S-CE	12
DSSHAFTLDELRL	Alta	0,98	ND	460-471	C-H-C	13
SEDYELLCPNGAR	Alta	13,05	8,38	596-608	C-S-C	14
AQDLFGDDHKNKNGFK	Alta	5,45	1,68	645-659	H-C	15

Tabla 7: Fragmentos de p97 con CNBr que cruzan la BHE en función de las relaciones de áreas de máximo abluminal/luminal

Secuencias Peptídicas	SEQ ID NO:
FSSEAYGQKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAM	16
ERIQAEQVDAVTLGSDIYTAGKTYGLVPAAGEHYAPEDSSNSYVAVVRRDSSHAFTLDELGRKRSCHAGFGSPAGWDVPVGALIQRGFIRPK DCDVLTAVSEFFNASCVPVNNPKNYPSSLCALCVGDEQGRNKCQVNSQERYGGRGAFRCLVENAGDVAFVRHHTTVFDNTNGHNSPEWAAEL RSEDYELLCPNGARAEVQFAACNLAQIPPHAVM	17
VRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHKNKNGFKM	18

EJEMPLO 3

15 FRAGMENTOS DE P97 EN UN MODELO *IN VIVO* DE LA BARRERA HEMATOENCEFÁLICA

Un fragmento de p97 (Mtf) (DSSHAFTLDELRL; SEQ ID NO: 13) se conjugó con un anticuerpo monoclonal (mAb), se administró periféricamente a ratones junto con proteínas de control y se probó en relación con las proteínas de control para su distribución en los tejidos cerebrales. Para la detección cuantitativa, todas las proteínas de prueba se marcaron con Alexa Fluor 647 (AF647) de acuerdo con técnicas de rutina.

Se prepararon las siguientes proteínas de prueba: Anticuerpo monoclonal (**mAb**) marcado con AF647, Conjugado MTF-mAb (**MTf-mAb** marcado con AF647; MTf es p97 humana soluble), Conjugado MTF_{PEP}-mAb (**MTf_{PEP}-mAb** marcado con AF647; MTF_{PEP} es el fragmento DSSHAFTLDELRYC (SEQ ID NO:92) de p97 humana); y fragmento de AF647 sin anticuerpo (**MTf_{PEP}**). La ruta de síntesis de los conjugados MTF-mAb y MTF_{PEP}-mAb se ilustra en la Figura 10.

Los artículos de prueba marcados con AF647 se administraron a ratones de acuerdo con el diseño del estudio en la Tabla 8 a continuación.

Tabla 8: Diseño del Estudio para Probar la Biodistribución Cerebral en Ratones						
Proteínas de Prueba	Ruta ²	Punto temporal (h)	Nivel de Dosis ¹ (mg/kg)	Nivel de Dosis (nanomoles/kg)	Perfusión Vascular ³	Número de Ratones ⁴
mAb	IV	2	10	66,7	sí	3
MTf-mAb	IV	2	15	65,2	sí	3
MTf _{PEP}	IV	2	5	1690,9	sí	3
MTf _{PEP} -mAb	IV	2	10,2	63,0	sí	3

Tabla 8: Diseño del Estudio para Probar la Biodistribución Cerebral en Ratones

(continuación)

Proteínas de Prueba	Ruta ²	Punto temporal (h)	Nivel de Dosis ¹ (mg/kg)	Nivel de Dosis (nanomoles/kg)	Perfusión Vascular ³	Número de Ratones ⁴
¹ Volumen de inyección = 0,10 ml/ratón ² Ruta de inyección = IV (vena de la cola) ³ Perfusión Vascular = 5 min @ 4 ml/min con PBS pH 7,4 con BSA al 2,7 %, 100 U/ml de heparina ⁴ Cepa de Ratón = BALB/c hembra de 6 - 8 semanas de edad (17,4 ± 1,1 gramos (media, D.T.))						

A las 2 horas después de la administración de las proteínas de prueba, se administró Texas Red, se sacrificaron los animales y se extrajeron los tejidos cerebrales. Se criosecaron de cinco a seis campos aleatorios de las secciones de la corona media y de la corteza cerebral de los tejidos cerebrales. Después se realizó una microscopía confocal para evaluar la biodistribución cerebral de las proteínas de prueba.

Para la microscopía confocal, se obtuvieron imágenes confocales de células marcadas con fluorescencia con un microscopio confocal de exploración láser A Leica AOBS SP8 (Leica, Heidelberg, Alemania). Las longitudes de onda de excitación fueron de 405 (DAPI), 595 nm (rojo Texas) y 653 nm (AF647), y se usó un láser de luz blanca de 80 MHz para recoger las respectivas señales de emisión. Todas las imágenes y datos espectrales (excepto DAPI) se generaron utilizando detectores HyD altamente sensibles. Las señales de emisión de retrodispersados de la muestra se suministraron a través del filtro sintonizable (AOBS).

Para el análisis tridimensional (3D) de fracción de imagen/volumen, se adquirió una serie de imágenes bidimensionales (2D) (1024x1024 píxeles) para un volumen de pila 3D. Las imágenes de la pila 3D con un grosor de sección óptica (eje z) de aproximadamente 0,3 micras se capturaron de secciones de tejido cerebral de 20 micras. Para cada volumen de tejido, se compilaron imágenes de la sección z y se realizó la restauración de imágenes tridimensionales con Imaris (BITPLANE Scientific Software). La estimación del volumen se realizó en los conjuntos de datos de imágenes en 3D registrados de cinco o más áreas diferentes de la corteza cerebral. El filtro de eliminación de ruido gaussiano se aplicó para definir el límite entre el primer plano y el fondo, y el nivel de umbral inferior en el histograma se ajustó para excluir todos los posibles valores de vóxeles de fondo. Se determinó que la suma de todos los vóxeles por encima de este nivel umbral era el volumen.

Se calcularon la V_{BC} (fracción de volumen de proteínas de prueba en capilares cerebrales), V_{BP} (fracción de volumen de proteínas de prueba en parénquima cerebral) y V_{TOT} (fracción de volumen de proteínas de prueba en capilares cerebrales y parénquima cerebral). Como se muestra en la Figura 11, el mAb no conjugado no cruzó de manera eficaz la BHE como lo ilustra su baja distribución en el parénquima cerebral. Por el contrario, la conjugación del mAb bien con MTF o con MTF_{PEP} aumentó la distribución del mAb en el parénquima cerebral en aproximadamente 5 veces. Además, el MTF_{PEP} no conjugado cruzó de manera eficaz la BHE y se distribuyó al parénquima cerebral. Estos resultados ilustran que la conjugación con fragmentos de p97 se puede usar para mejorar significativamente el suministro de polipéptidos tal como los anticuerpos a través de la BHE y hacia los tejidos del SNC tales como el cerebro.

EJEMPLO 4

CONJUGADOS PEPTÍDICOS DE P97

Un fragmento de p97_{PEP} (DSSHAFTLDELRL; SEQ ID NO: 13) se conjugó con la proteína de prueba de 44 kd peroxidasa de rábano picante (HRP). Este conjugado se administró periféricamente (por inyección IV) a ratones junto con proteínas de control y se probó en relación con las proteínas de control para su distribución en los tejidos cerebrales. Para la detección cuantitativa, todas las proteínas de prueba se marcaron con Alexa Fluor 680 (AF680) de acuerdo con técnicas de rutina.

Se prepararon las siguientes proteínas de prueba: HRP (HRP) marcada con AF680; Conjugado MTF_{PEP}-HRP (MTF_{PEP}HRP marcado con AF680; MTF_{PEP} es el fragmento DSSHAFTLDELRYC (SEQ ID NO:92) de p97 humana). Los restos de cisteína y tirosina C-terminal se añadieron al péptido de MTF para conjugación y yodación, respectivamente. La ruta de síntesis de los conjugados de HRP se ilustra en la Figura 12.

Los artículos de prueba marcados con AF680 se administraron a ratones de acuerdo con el diseño del estudio en la **Tabla 9** a continuación.

Proteínas de Prueba	Ruta ²	Punto temporal (h)	Nivel de Dosis ¹ (mg/kg)	Nivel de Dosis (nanomoles/kg)	Perfusión Vascular ³	Número de Ratones ⁴
PBS	IV	2	N/D	N/D	Sí	1
HRP	IV	2	10,0	227	sí	3

(continuación)

Tabla: Diseño del Estudio para Probar la Biodistribución Cerebral en Ratones						
Proteínas de Prueba	Ruta ²	Punto temporal (h)	Nivel de Dosis ¹ (mg/kg)	Nivel de Dosis (nanomoles/kg)	Perfusión Vascular ³	Número de Ratones ⁴
MTF _{pep} -HRP	IV	2	10,3	227	sí	3
¹ Volumen de inyección = 0,10 ml/ratón ² Ruta de inyección = IV (vena de la cola) ³ Perfusión Vascular = 10 min @ 1 ml/min con PBS pH 7,4 con BSA al 2,7 %, 100 U/ml de heparina ⁴ Cepa de Ratón = BALB/c hembra de 6 - 8 semanas de edad (16-20 gramos)						

- 5 A las 2 horas después de la administración de las proteínas de prueba, se administró Lectina-FITC de tomate (80 µg durante 10 minutos) para teñir la vasculatura cerebral seguido de perfusión intracardiaca de 10 ml de solución salina heparinizada, y se extrajeron los tejidos cerebrales y se procesaron para el análisis microscópico. Se crio-seccionaron tres áreas aleatorias de los tejidos cerebrales de las secciones centrales de la corona, se fijaron en acetona/metanol frío y se montaron para microscopía. Después se realizó una microscopía confocal tridimensional (3D) para evaluar la biodistribución cerebral de las proteínas de prueba.
- 10 Los resultados se muestran en las Figuras 13A-C. La Figura 13A muestra los resultados para PBS, la Figura 13B muestra los resultados para HRP marcada con AF680, y la Figura 13C muestra los resultados para el conjugado MTf_{PEP}-HRP marcado con AF680. Las Figuras 13A y 13B no muestran marcaje con AF680 detectable en tejidos cerebrales. Por el contrario, la Figura 13C muestra el marcaje detectable con AF680, como se ilustra con las flechas. Estos resultados muestran que la conjugación con el péptido DSSHAFTLDELRL puede potenciar significativamente el
- 15 suministro de una proteína de interés a través de la BHE y hacia los tejidos del cerebro.

Las diversas realizaciones descritas en el presente documento se pueden combinar para proporcionar realizaciones adicionales. Los aspectos de las realizaciones pueden modificarse, si es necesario, para emplear conceptos de las diversas patentes, solicitudes y publicaciones para proporcionar aún más realizaciones.

20 LISTADO DE SECUENCIAS

- <110> biOasis Technologies, Inc.
- 25 < 120 > FRAGMENTOS DE P97 Y USOS DE LOS MISMOS
- <130> BIOA-002/02WO
- <150> US 61/780, 170
- 30 <151> 13/03/2013
- <150> US 61/885.387
- <151> 01/10/2013
- 35 <160> 136
- <170> PatentIn versión 3.5
- <210> 1
- 40 <211> 738
- <212> PRT
- <213> *Homo sapiens*
- <400> 1
- 45

ES 2 774 549 T3

Met Arg Gly Pro Ser Gly Ala Leu Trp Leu Leu Leu Ala Leu Arg Thr
 1 5 10 15

Val Leu Gly Gly Met Glu Val Arg Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu
 20 25 30

Gln His Lys Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg Glu Ala Gly Ile
 35 40 45

Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg Gly Thr Ser Ala Asp His Cys Val
 50 55 60

Gln Leu Ile Ala Ala Gln Glu Ala Asp Ala Ile Thr Leu Asp Gly Gly
 65 70 75 80

Ala Ile Tyr Glu Ala Gly Lys Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly
 85 90 95

Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val
 100 105 110

Val Arg Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
 115 120 125

Ser Cys His Thr Gly Ile Asn Arg Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val
 130 135 140

Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val

ES 2 774 549 T3

Lys Ser Pro Gln His Cys Met Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp
 405 410 415
 Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr
 420 425 430
 Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser
 435 440 445
 Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala
 450 455 460
 Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe
 465 470 475 480
 Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg
 485 490 495
 Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu
 500 505 510
 Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro
 515 520 525
 Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys
 530 535 540
 Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe
 545 550 555 560
 Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr
 565 570 575
 Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala
 580 585 590
 Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
 595 600 605
 Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro
 610 615 620
 His Ala Val Met Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly
 625 630 635 640
 Leu Leu Asp Lys Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn
 645 650 655

ES 2 774 549 T3

Gly Phe Lys Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu
 660 665 670

Phe Lys Asp Ala Thr Val Arg Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr
 675 680 685

Tyr Arg Gly Trp Leu Gly Leu Asp Tyr Val Ala Ala Leu Glu Gly Met
 690 695 700

Ser Ser Gln Gln Cys Ser Gly Ala Ala Ala Pro Ala Pro Gly Ala Pro
 705 710 715 720

Leu Leu Pro Leu Leu Leu Pro Ala Leu Ala Ala Arg Leu Leu Pro Pro
 725 730 735

Ala Leu

5 <210> 2
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 2

10 Trp Cys Ala Thr Ser Asp Pro Glu Gln His Lys
 1 5 10

15 <210> 3
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 3

20 Arg Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys
 1 5 10

25 <210> 4
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 4

30 Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys Gly Val Lys
 1 5 10

35 <210> 5
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 5

ES 2 774 549 T3

Leu Cys Arg Gly Asp Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys
1 5 10

5
<210> 6
<211> 16
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 6

Gly Asp Ser Ser Gly Glu Gly Val Cys Asp Lys Ser Pro Leu Glu Arg
1 5 10 15

10

15
<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 7

Tyr Tyr Asp Tyr Ser Gly Ala Phe Arg
1 5

20

25
<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 8

Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg
1 5

30

35
<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 9

Val Pro Ala His Ala Val Val Val Arg
1 5

40

45
<210> 10
<211> 10
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 10

Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu Ile Phe Arg
1 5 10

50
<210> 11
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

ES 2 774 549 T3

<400> 11

Cys Gly Asp Met Ala Val Ala Phe Arg
 1 5

5 <210> 12
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 12

Leu Lys Pro Glu Ile Gln Cys Val Ser Ala Lys
 1 5 10

15 <210> 13
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20 <400> 13

Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
 1 5 10

25 <210> 14
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 14

Ser Glu Asp Tyr Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg
 1 5 10

30 <210> 15
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 15

Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys Asn Gly Phe Lys
 1 5 10 15

40 <210> 16
 <211> 40
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 16

Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser
 1 5 10 15

ES 2 774 549 T3

Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu
20 25 30

Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met
35 40

5 <210> 17
<211> 221
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 17

ES 2 774 549 T3

Glu Arg Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu
 1 5 10 15
 Asp Ile Tyr Thr Ala Gly Lys Thr Tyr Gly Leu Val Pro Ala Ala Gly
 20 25 30
 Glu His Tyr Ala Pro Glu Asp Ser Ser Asn Ser Tyr Tyr Val Val Ala
 35 40 45
 Val Val Arg Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
 50 55 60
 Gly Lys Arg Ser Cys His Ala Gly Phe Gly Ser Pro Ala Gly Trp Asp
 65 70 75 80
 Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile Arg Pro Lys Asp
 85 90 95
 Cys Asp Val Leu Thr Ala Val Ser Glu Phe Phe Asn Ala Ser Cys Val
 100 105 110
 Pro Val Asn Asn Pro Lys Asn Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys
 115 120 125
 Val Gly Asp Glu Gln Gly Arg Asn Lys Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu
 130 135 140
 Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg Gly Ala Phe Arg Cys Leu Val Glu Asn Ala
 145 150 155 160
 Gly Asp Val Ala Phe Val Arg His Thr Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn
 165 170 175
 Gly His Asn Ser Glu Pro Trp Ala Ala Glu Leu Arg Ser Glu Asp Tyr
 180 185 190
 Glu Leu Leu Cys Pro Asn Gly Ala Arg Ala Glu Val Ser Gln Phe Ala
 195 200 205
 Ala Cys Asn Leu Ala Gln Ile Pro Pro His Ala Val Met
 210 215 220

5 <210> 18
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<223> C-alfa-formilglicina (FGly)
 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 5 <222> (3)..(3)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 10 <222> (4)..(4)
 <223> Xaa = Ala o Pro

 <220>
 <221> MISC_FEATURE
 15 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido

 <400> 20

 20 Xaa Gly Xaa Xaa Xaa
 1 5

 <210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 30 <400> 21

 Gly Ser Gly Ser
 1

 <210> 22
 <211> 4
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 40 <400> 22

 Gly Gly Ser Gly
 1

 <210> 23
 <211> 4
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Enlazador peptídico
 50 <400> 23

 Gly Gly Gly Ser
 1
 55

ES 2 774 549 T3

5
<210> 24
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

10
<400> 24

Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

15
<210> 25
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

20
<400> 25

Gly Asn Gly Asn
1

25
<210> 26
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

30
<400> 26

Gly Gly Asn Gly
1

35

40
<210> 27
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

45
<400> 27

Gly Gly Gly Asn
1

50
<210> 28
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador peptídico

55
<400> 28

ES 2 774 549 T3

Gly Gly Gly Gly Asn
1 5

5 <210> 29
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
10 <223> Enlazador escindible por Trombina

<400> 29

Gly Arg Gly Asp
1

15 <210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Enlazador escindible por Trombina

<400> 30

25

Gly Arg Gly Asp Asn Pro
1 5

<210> 31
<211> 5
30 <212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
35 <223> Enlazador escindible por Trombina

<400> 31

Gly Arg Gly Asp Ser
1 5

40 <210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Enlazador escindible por Trombina

<400> 32

Gly Arg Gly Asp Ser Pro Lys
1 5

50 <210> 33
<211> 4
<212> PRT

ES 2 774 549 T3

<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador escindible por elastasa

5 <400> 33

Ala Ala Pro Val
1

10 <210> 34
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Enlazador escindible por elastasa

<400> 34

Ala Ala Pro Leu
1

20

<210> 35
<211> 4
<212> PRT

25 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador escindible por elastasa

30 <400> 35

Ala Ala Pro Phe
1

35 <210> 36
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador escindible por elastasa

40 <400> 36

Ala Ala Pro Ala
1

45

<210> 37
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Enlazador escindible por elastasa

<400> 37

55

ES 2 774 549 T3

Ala Tyr Leu Val
1

5 <210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador escindible por metaloproteinasas de matriz

15 <220>
<221> VARIANTE
<222> (3)..(3)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

20 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 38

Gly Pro Xaa Gly Pro Xaa
1 5

25 <210> 39
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

30 <220>
<223> Enlazador escindible por metaloproteinasas de matriz

35 <220>
<221> VARIANTE
<222> (4)..(4)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

<400> 39

Leu Gly Pro Xaa
1

40 <210> 40
<211> 6
<212> PRT
45 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Enlazador escindible por metaloproteinasas de matriz

50 <220>
<221> VARIANTE
<222> (6)..(6)
<223> Xaa = Cualquier aminoácido

55 <400> 40

Gly Pro Ile Gly Pro Xaa
1 5

ES 2 774 549 T3

<210> 41
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 5
 <220>
 <223> Enlazador escindible por metaloproteinasas de matriz
 <220>
 10 <221> VARIANTE
 <222> (5)..(5)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 41
 15
 Ala Pro Gly Leu Xaa
 1 5
 <210> 42
 <211> 7
 20 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 <220>
 25 <223> Enlazador escindible por colagenasa
 <220>
 <221> VARIANTE
 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 30 <400> 42
 Pro Leu Gly Pro Asp Arg Xaa
 1 5
 35 <210> 43
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial
 40 <220>
 <223> Enlazador escindible por colagenasa
 <220>
 <221> VARIANTE
 45 <222> (7)..(7)
 <223> Xaa = Cualquier aminoácido
 <400> 43
 Pro Leu Gly Leu Leu Gly Xaa
 1 5
 50
 <210> 44
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia artificial
 <220>
 <223> Enlazador escindible por colagenasa
 60 <400> 44

ES 2 774 549 T3

Pro Gln Gly Ile Ala Gly Trp
1 5

5 <210> 45
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

10 <220>
<223> Enlazador escindible por colagenasa

<400> 45

Pro Leu Gly Cys His
1 5

15 <210> 46
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

20 <220>
<223> Enlazador escindible por colagenasa

<400> 46

Pro Leu Gly Leu Tyr Ala
1 5

30 <210> 47
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Enlazador escindible por colagenasa

<400> 47

Pro Leu Ala Leu Trp Ala Arg
1 5

40 <210> 48
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

45 <220>
<223> Enlazador escindible por colagenasa

<400> 48

Pro Leu Ala Tyr Trp Ala Arg
1 5

50 <210> 49
<211> 7
<212> PRT
55 <213> Secuencia artificial

ES 2 774 549 T3

<220>
<223> Enlazador escindible por estromelisinina

5 <400> 49

Pro Tyr Ala Tyr Tyr Met Arg
1 5

10 <210> 50
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Enlazador escindible por gelatinasa

<400> 50

Pro Leu Gly Met Tyr Ser Arg
1 5

20 <210> 51
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Enlazador escindible por enzima conversiva de la angiotensina

<400> 51

30 Gly Asp Lys Pro
1

35 <210> 52
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

40 <220>
<223> Enlazador escindible por enzima conversiva de la angiotensina

<400> 52

Gly Ser Asp Lys Pro
1 5

45 <210> 53
<211> 4
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Enlazador escindible por catepsina B

<400> 53

Ala Leu Ala Leu
1

55 <210> 54

ES 2 774 549 T3

<211> 4
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>
 <223> Enlazador escindible por catepsina B
 <400> 54

10 Gly Phe Leu Gly
 1

<210> 55
 <211> 20
 <212> PRT
 15 <213> *Homo sapiens*
 <400> 55

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala
 1 5 10 15

20 Tyr Gly Gln Lys
 20

<210> 56
 <211> 21
 25 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 <400> 56

His Thr Thr Val Phe Asp Asn Thr Asn Gly His Asn Ser Glu Pro Trp
 1 5 10 15

Ala Ala Glu Leu Arg
 20

30 <210> 57
 <211> 25
 <212> PRT
 35 <213> *Homo sapiens*
 <400> 57

Ala Val Ser Asp Tyr Phe Gly Gly Ser Cys Val Pro Gly Ala Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Ser Tyr Ser Glu Ser Leu Cys Arg
 20 25

40 <210> 58
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*
 45 <400> 58

ES 2 774 549 T3

Asn Tyr Pro Ser Ser Leu Cys Ala Leu Cys Val Gly Asp Glu Gln Gly
1 5 10 15

Arg

5 <210> 59
<211> 19
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 59

Thr Leu Pro Ser Trp Gly Gln Ala Leu Leu Ser Gln Asp Phe Glu Leu
1 5 10 15

Leu Cys Arg

10

15 <210> 60
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 60

Cys Leu Ala Glu Gly Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Lys
1 5 10

20

25 <210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 61

Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys
1 5 10 15

30 <210> 62
<211> 25
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

35 <400> 62

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys
20 25

40 <210> 63
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 63

ES 2 774 549 T3

Arg Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
 1 5 10

5 <210> 64
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 64

Ala Gln Asp Leu Phe Gly Asp Asp His Asn Lys
 1 5 10

15 <210> 65
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 65

Leu Ser Val Met Gly Cys Asp Val Leu Lys
 1 5 10

20 <210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 66

Glu Ala Gly Ile Gln Pro Ser Leu Leu Cys Val Arg
 1 5 10

30 <210> 67
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

35 <400> 67

Ser Ser His Val Thr Ile Asp Thr Leu Lys
 1 5 10

40 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 68

Trp Cys Val Leu Ser Thr Pro Glu Ile Gln Lys
 1 5 10

50 <210> 69
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 69

ES 2 774 549 T3

Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg
 1 5

5 <210> 70
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10 <400> 70

Asp Ser Ser His Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg Gly Lys
 1 5 10

15 <210> 71
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 71

20 Gly Leu Leu Cys Asp Pro Asn Arg Leu Pro Pro Tyr Leu Arg
 1 5 10

25 <210> 72
 <211> 28
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 72

Glu His Gly Leu Lys Pro Val Val Gly Glu Val Tyr Asp Gln Glu Val
 1 5 10 15

30 Gly Thr Ser Tyr Tyr Ala Val Ala Val Val Arg Arg
 20 25

35 <210> 73
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 73

Cys Val Gly Asn Ser Gln Glu Arg Tyr Tyr Gly Tyr Arg
 1 5 10

40 <210> 74
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

45 <400> 74

Cys Leu Val Glu Asn Ala Gly Asp Val Ala Phe Val Arg
 1 5 10

<210> 75

ES 2 774 549 T3

<211> 27
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 75

Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr Gln Thr Tyr Glu Ala
 1 5 10 15

Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys
 20 25

<210> 76
 <211> 21
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

10

<400> 76

15

Ile Gln Ala Glu Gln Val Asp Ala Val Thr Leu Ser Gly Glu Asp Ile
 1 5 10 15

Tyr Thr Ala Gly Lys
 20

<210> 77
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

20

<400> 77

His Ser Thr Val Leu Glu Asn Thr Asp Gly Lys
 1 5 10

25

<210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

30

<400> 78

Thr Val Gly Trp Asn Val Pro Val Gly Tyr Leu Val Glu Ser Gly Arg
 1 5 10 15

35

<210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 79

Leu Leu Asn Glu Gly Gln Arg
 1 5

45

<210> 80
 <211> 25

ES 2 774 549 T3

<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

<400> 80

5

Leu Phe Ser His Glu Gly Ser Ser Phe Gln Met Phe Ser Ser Glu Ala
1 5 10 15

Tyr Gly Gln Lys Asp Leu Leu Phe Lys
20 25

<210> 81
<211> 17
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

10

<400> 81

Ala Asp Thr Asp Gly Gly Leu Ile Phe Arg Leu Leu Asn Glu Gly Gln
1 5 10 15

Arg

15

<210> 82
<211> 9
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

20

<400> 82

Cys Gly Asn Met Ser Glu Ala Phe Arg
1 5

25

<210> 83
<211> 13
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

30

<400> 83

Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg
1 5 10

35

<210> 84
<211> 32
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*

40

<400> 84

Asp Leu Leu Phe Lys Asp Ser Thr Ser Glu Leu Val Pro Ile Ala Thr
1 5 10 15

Gln Thr Tyr Glu Ala Trp Leu Gly His Glu Tyr Leu His Ala Met Lys
20 25 30

<210> 85

ES 2 774 549 T3

<211> 20
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 85

Met Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys Asp
 1 5 10 15
 Ala Thr Val Arg
 20

10 <210> 86
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

15 <400> 86

Ala Val Pro Val Gly Glu Lys Thr Thr Tyr Arg
 1 5 10

20 <210> 87
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 87

Phe Asp Ser Ser Asn Tyr His Gly Gln Asp Leu Leu Phe Lys
 1 5 10

25

<210> 88
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

<400> 88

Val Arg Pro Asp Thr Asn Ile Phe Thr Val Tyr Gly Leu Leu Asp Lys
 1 5 10 15

35

<210> 89
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

40

<400> 89

Phe Ser Ser Glu Ala Tyr Gly Gln Lys
 1 5

45

<210> 90
 <211> 31
 <212> PRT
 <213> *Homo sapiens*

50

<400> 90

ES 2 774 549 T3

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

ES 2 774 549 T3

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

Gly Ser Arg Ala Asp Val Thr Glu Trp Arg Gln Cys His Leu Ala Arg
 245 250 255

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Ala Gly Trp Asp Val Pro Val Gly Ala Leu Ile Gln Arg Gly Phe Ile

ES 2 774 549 T3

<400> 98

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

5 <210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Ochotona princeps

10 <400> 99

Asp Ser Ser Tyr Ala Phe Pro Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

15 <210> 100
<211> 12
<212> PRT
<213> Pteropus alecto

20 <400> 100

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

25 <210> 101
<211> 12
<212> PRT
<213> Tursiops truncatus

<400> 101

30 Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

35 <210> 102
<211> 12
<212> PRT
<213> Tupaia chinensis

<400> 102

Asp Ser Thr His Ala Phe Thr Val Asp Glu Leu Arg
1 5 10

40 <210> 103
<211> 12
<212> PRT
<213> Pantholops hodgsonii

45 <400> 103

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

50 <210> 104
<211> 12
<212> PRT
<213> Felis catus

55 <400> 104

ES 2 774 549 T3

		Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
5		<210> 117 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Leptonychotes weddellii</i> <400> 117											
10		Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
15		<210> 118 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Camelus ferus</i> <400> 118											
20		Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
25		<210> 119 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Sus scrofa</i> <400> 119											
30		Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
35		<210> 120 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Bos mutus</i> <400> 120											
40		Asn	Ser	Ser	Tyr	Ala	Phe	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
45		<210> 121 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Cyphellophora europaea</i> <400> 121											
50		Ala	Thr	Ser	His	Ala	Ile	Thr	Leu	Asp	Glu	Leu	Arg
		1				5					10		
50		<210> 122 <211> 12 <212> PRT <213> <i>Loxodonta africana</i> <400> 122											

ES 2 774 549 T3

<400> 128

Asn Ser Ser Asp Ala Phe Ser Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

5 <210> 129
<211> 12
<212> PRT
<213> *Trichechus manatus latirostris*

10 <400> 129

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Met Asp Glu Leu Arg
1 5 10

15 <210> 130
<211> 12
<212> PRT
<213> *Mesocricetus auratus*

20 <400> 130

Asp Arg Ser Tyr Ser Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

25 <210> 131
<211> 12
<212> PRT
<213> *Monodelphis domestica*

<400> 131

Asn Ser Ser Tyr Ser Phe Thr Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

30 <210> 132
<211> 12
<212> PRT
<213> *Equus caballus*

<400> 132

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Val Asp Glu Leu Arg
1 5 10

40 <210> 133
<211> 12
<212> PRT
<213> *Echinops telfairi*

45 <400> 133

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Thr Val Asp Glu Leu Arg
1 5 10

50 <210> 134
<211> 12
<212> PRT
<213> *Condylura cristata*

55 <400> 134

ES 2 774 549 T3

Asn Ser Ser Tyr Ala Phe Ser Leu Asp Glu Leu Arg
1 5 10

5
<210> 135
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 135

10 Ser Ala Ser Asp Leu Thr Trp Asp Asn Leu Lys
1 5 10

15
<210> 136
<211> 11
<212> PRT
<213> *Homo sapiens*
<400> 136

20 Ser Asp Thr Ser Leu Thr Trp Asn Ser Val Lys
1 5 10

REIVINDICACIONES

1. Un conjugado, que comprende un polipéptido de p97 de hasta 100 aminoácidos de longitud, donde el polipéptido de p97 comprende una secuencia de aminoácidos al menos un 80 % idéntica a DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO: 13),
5 donde el polipéptido de p97 se une de covalente u operativamente a un agente terapéutico, de diagnóstico o detectable, para formar un conjugado p97-agente y donde el polipéptido de p97 tiene la capacidad de transportar el agente a través de la barrera hematoencefálica (BHE).
2. El conjugado de la reivindicación 1, donde polipéptido de p97 comprende DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO: 13).
10
3. El conjugado de la reivindicación 1 o 2, donde el polipéptido de p97 comprende la fórmula $[X]_n$, en donde X es DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO:13) y n es 2, 3, 4, o 5.
4. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido de p97 es de hasta
15 aproximadamente 50 aminoácidos de longitud.
5. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde el polipéptido de p97 es de hasta aproximadamente 20 aminoácidos de longitud.
- 20 6. El conjugado de la reivindicación 5, donde polipéptido de p97 consiste en DSSHAFTLDELRL (SEQ ID NO: 13).
7. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6, donde el polipéptido de p97 tiene una o más cisteínas y/o tirosinas terminales.
- 25 8. El conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, donde el agente es una molécula pequeña, un polipéptido, un péptido mimético, un peptoide, un aptámero o una entidad detectable, particularmente donde la molécula pequeña es un agente citotóxico o quimioterapéutico o antiangiogénico seleccionado de uno o más de agentes alquilantes, antimetabolitos, antraciclinas, antibióticos antitumorales, platinos, inhibidores de topoisomerasa tipo I, inhibidores de topoisomerasa tipo II, alcaloides de la vinca y taxanos.
- 30 9. El conjugado de la reivindicación 8, donde la molécula pequeña se selecciona entre uno o más de clorambucilo, ciclofosfamida, cilengitida, lomustina (CCNU), melfalán, procarbazona, tiotepa, carmustina (BCNU), enzastaurina, busulfán, daunorrubicina, doxorubicina, gefitinib, erlotinib, idarrubicina, temozolomida, epirubicina, mitoxantrona, bleomicina, cisplatino, carboplatino, oxaliplatino, camptotecinas, irinotecán, topotecán, amsacrina, etopósido, fosfato de etopósido, tenipósido, temsirolimus, everolimus, vincristina, vinblastina, vinorelbina, vindesina, CT52923, paclitaxel, imatinib, dasatinib, sorafenib, pazopanib, sunitinib, vatalanib, gefitinib, erlotinib, AEE-788, dicloroacetato, tamoxifeno, fasudilo, SB- 681323, semaxanib, donepizilo, galantamina, memantina, rivastigmina, tacrina, rasigilina, naltrexona, lubiproston, safinamida, istradefilina, pimavanserina, pitolisant, isradipina, pridopidina (ACR16), tetrabenazina, bexaroteno, acetato de glatirámico, fingolimod y mitoxantrona, incluyendo sales y ácidos
35 farmacéuticamente aceptables de los mismos.
- 40 10. El conjugado de la reivindicación 8, donde el polipéptido es un anticuerpo o un fragmento de unión a antígeno del mismo,
particularmente donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un
45 antígeno asociado con cáncer, particularmente donde el antígeno asociado a cáncer es uno o más de Her2/neu, Her1/receptor de EGF (EGFR), Her3, antígeno A33, B7H3, CD5, CD19, CD20, CD22, CD23(Receptor de IgE), antígeno C242, 5T4, IL-6, IL-13, factor de crecimiento endotelial vascular VEGF (p. ej., VEGF-A) VEGFR-1, VEGFR-2, CD30, CD33, CD37, CD40, CD44, CD51, CD52, CD56, CD74, CD80, CD152, CD200, CD221, CCR4, HLA-DR, CTLA-4, NPC-1C, tenascina, vimentina, receptor del factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1R), alfafetoproteína,
50 factor de crecimiento tipo insulina 1 (IGF-1), anhidrasa carbónica 9 (CA-IX), antígeno carcinoembrionario (CEA), integrina $\alpha_v\beta_3$, integrina $\alpha_5\beta_1$, receptor de folato 1, glucoproteína transmembrana NMB, proteína de activación de fibroblastos alfa (FAP), glucoproteína 75, TAG-72, MUC1, MUC16 (o CA-125), fosfatidilserina, antígeno de membrana específico de próstata (PMSA), antígeno NR-LU-13, TRAIL-R1, miembro 10b de la superfamilia del receptor del factor de necrosis tumoral (TNFRSF10B o TRAIL-R2), miembro 7 de la familia SLAM (SLAMF7),
55 antígeno EGP40 de pancarcinoma, factor de activación de linfocitos B (BAFF), receptor del factor de crecimiento derivado de plaquetas, glicoproteína EpCAM (17-1A), Muerte Programada-1, proteína disulfuro isomerasa (PDI), fosfatasa de regeneración hepática 3 (PRL-3), fosfatasa ácida prostática, antígeno Lewis-Y, GD2 (un disialogangliósido expresado en tumores de origen neuroectodérmico), glipicano-3 (GPC3) o mesotelina humanos,
60 o particularmente donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a un antígeno asociado con el dolor, particularmente donde el antígeno asociado con el dolor es uno o más del factor de crecimiento nervioso (NGF) o la cinasa A relacionada con tropomiosina (TrkA),
o particularmente donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a una molécula proinflamatoria, opcionalmente, una citocina o quimiocina proinflamatoria,
65 particularmente donde la molécula proinflamatoria es una o más de TNF- α , TNF- β , FasL, CD27L, CD30L, CD40L, Ox40L, 4-1BBL, TRAIL, TWEAK, y Apo3L, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, interferón- γ (IFN- γ), IFN- α , IFN- β , IL-6, IL-8, IL-12, IL-15, IL-17, IL-18, IL-21, LIF, CCL5, GRO α , MCP-1, MIP-1 α , MIP-1 β , factor estimulante de colonias de macrófagos

(MCSF) o factor estimulante de colonias de granulocitos macrófagos (GM-CSF), particularmente donde la molécula proinflamatoria es TNF- α , y donde el anticuerpo es adalimumab, certolizumab pegol, etanercept, golimumab, infliximab, D2E7, CDP 571, o CDP 870, o un fragmento de unión a antígeno o una variante de los mismos,

5 o particularmente en donde el anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo se une específicamente a uno o más de Her2/neu, Her1/EGFR, TNF- α , antígeno B7H3, CD20, VEGF, CD52, CD33, CTLA-4, tenascina, alfa-4 (α 4) integrina, IL-23, amiloide- β , Huntingtina, CD25, factor de crecimiento nervioso (NGF), TrkA, o a-sinucleína humanos, particularmente donde el anticuerpo se selecciona entre uno o más de trastuzumab, cetuximab, daclizumab, tanezumab, 3F8, 8H9, abagovomab, adecatumumab, afutuzumab, alemtuzumab, alacizumab (pegol), amatuximab, apolizumab, bavituximab, bectumomab, belimumab, bevacizumab, bivatumumab (mertansina), brentuximab vedotina, cantuzumab (mertansina), cantuzumab (ravtansina), capromab (pendetida), catumaxomab, citatumumab (bogatox), cixutumumab, clivatuzumab (tetraxetán), conatumumab, dacetuzumab, dalotuzumab, detumomab, drozitumab, ecomeximab, edrecolomab, elotuzumab, enavatuzumab, ensituximab, epratuzumab, ertumaxomab, etaracizumab, farletuzumab, FBTA05, figitumumab, flanvotumab, galiximab, gemtuzumab, ganitumab, gemtuzumab (ozogamicina), girentuximab, glembatumumab (vedotina), ibritumomab tiuxetán, icrucumab, igovomab, indatuximab ravtansina, intetumumab, inotuzumab ozogamicina, ipilimumab (MDX-101), iratumumab, labetuzumab, lexatumumab, lintuzumab, lorvotuzumab (mertansina), lucatumumab, lumiliximab, mapatumumab, matuzumab, milatumumab, mitumomab, mogamulizumab, moxetumomab (pasudotox), nacolomab (tafenatox), naptumomab (estafenatox), narnatumab, necitumumab, nimotuzumab, nivolumab, Neuradiab® (con o sin yodo radiactivo), NR-LU-10, ofatumumab, olaratumab, onartuzumab, oportuzumab (monatox), oregovomab, panitumumab, patritumab, pentumomab, pertuzumab, primumab, racotumomab, radretumab, ramucirumab, rilotumumab, rituximab, robatumumab, samalizumab, sibrotuzumab, siltuximab, tabalumab, taplitumomab (paptox), tenatumomab, teprotumumab, TGN1412, ticilimumab, tremelimumab, tigatuzumab, TNX-650, tositumomab, TRBS07, tucotuzumab (celmoleucina), ublituximab, urelumab, veltuzumab, volociximab, votumumab y zalutumumab, incluyendo fragmentos

25 de unión a antígeno de los mismos,
o donde el polipéptido es un polipéptido de interferón- β , o un fragmento activo o variante del mismo,
o donde el polipéptido se asocia con una enfermedad por almacenamiento lisosómico,
particularmente donde el polipéptido se selecciona entre uno o más de aspartilglucosaminidasa, lipasa ácida, transportador de cisteína, Lamp-2, a-galactosidasa A, ceramidasa ácida, a-L-fucosidasa, β -hexosaminidasa A, ac de GM2-gangliósido (GM2A), α -D-manosidasa, β -D-manosidasa, arilsulfatasa A, saposina B, neuraminidasa, a-N-acetilglucosaminidasa fosfotransferasa, subunidad γ de fosfotransferasa, L-iduronidasa, iduronato-2-sulfatasa, heparán-N-sulfatasa, α -N-acetilglucosaminidasa, acetilCoA:N-acetiltransferasa, N-acetilglucosamina 6-sulfatasa, galactosa, 6-sulfatasa, β -galactosidasa, N-acetilgalactosamina 4-sulfatasa, hialuronoglucosaminidasa, sulfatasas, palmitoil proteína tioesterasa, tripeptidil peptidasa I, esfingomielinasa ácida, catepsina A, catepsina K, a-galactosidasa B, NPC1, NPC2, sialina y transportador de ácido siálico, incluyendo fragmentos activos y variantes de los mismos.

11. El conjugado de la reivindicación 8, donde la entidad detectable se selecciona de uno o más de ácido diatrizoico, un radioisótopo, un fluoróforo/tinte fluorescente y una nanopartícula.

40 12. El conjugado de la reivindicación 8, donde el agente es un agente cardiotoxico en su forma no conjugada, particularmente donde el agente cardiotoxico es una antraciclina/antraquinolona, ciclofosfamida, antimetabolito, agente antimicrotúbulos, inhibidor de tirosina cinasa, bevacizumab o trastuzumab, y/o donde el agente cardiotoxico es ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docataxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfán, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona, o mitoxantrona.

13. Una composición, que comprende un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-12 y un vehículo farmacéuticamente aceptable.

50 14. La composición de la reivindicación 13 para su uso en terapia,
particularmente para tratar un cáncer del sistema nervioso central (SNC), opcionalmente del cerebro, particularmente cáncer primario o cáncer metastásico del SNC, particularmente para tratar un glioma, meningioma, adenoma hipofisario, schwannoma vestibular, linfoma primario del SNC, neuroblastoma, o tumor neuroectodérmico primitivo (meduloblastoma), particularmente donde el glioma es un astrocitoma, oligodendroglioma, ependimoma o un papiloma del plexo coroideo,
o particularmente para tratar glioblastoma multiforme, particularmente donde el glioblastoma multiforme es un glioblastoma de células gigantes o un gliosarcoma,
o particularmente para tratar una enfermedad por almacenamiento lisosómico, particularmente donde la enfermedad por almacenamiento lisosómico se selecciona entre uno o más de aspartilglucosaminuria, enfermedad por almacenamiento de éster de colesterol, enfermedad de Wolman, cistinosis, enfermedad de Danon, enfermedad de Fabry, lipogranulomatosis de Farber, enfermedad de Farber, fucosidosis, galactosialidosis tipos I/II, enfermedad de Gaucher tipos I/II/III, enfermedad de Gaucher, leucodistrofia de células globoides, Enfermedad de Krabbe, enfermedad por almacenamiento de glucógeno II, enfermedad de Pompe, gangliosidosis GM1 tipos I/II/III, gangliosidosis GM2 tipo I, enfermedad de Tay Sachs, gangliosidosis GM2 tipo II, enfermedad de Sandhoff, gangliosidosis GM2, α -manosidosis tipos I/II, β -manosidosis, leucodistrofia metacromática, mucopolisidosis tipo I,

- sialidosis tipos I/II, mucopolipidosis tipos II/III enfermedad de la célula I, mucopolipidosis tipo III pseudopolidistrofia de Hurler, mucopolisacaridosis tipo I, mucopolisacaridosis tipo II (síndrome de Hunter), mucopolisacaridosis tipo IIIA, Síndrome de Sanfilippo, mucopolisacaridosis tipo IIIB, mucopolisacaridosis tipo IIIC, mucopolisacaridosis tipo IIID, mucopolisacaridosis tipo IVA, síndrome de Morquio, mucopolisacaridosis tipo IVB, mucopolisacaridosis tipo VI, mucopolisacaridosis tipo VII, síndrome de Sly, mucopolisacaridosis tipo IX, deficiencia de sulfatasa múltiple, lipofuscinosis cerioidea neuronal, enfermedad de Batten CLN1, enfermedad de Niemann-Pick tipos NB, enfermedad de Niemann-Pick, enfermedad de Niemann-Pick tipo C1, enfermedad de Niemann-Pick tipo C2, picnodisostosis, enfermedad de Schindler tipos I/II, enfermedad de Schindler y enfermedad por almacenamiento de ácido siálico, o particularmente para tratar un trastorno degenerativo o autoinmunitario del sistema nervioso central (SNC), particularmente donde el trastorno degenerativo o autoinmunitario del SNC es enfermedad de Alzheimer, enfermedad de Huntington, enfermedad de Parkinson o esclerosis múltiple (EM), o para tratar el dolor, particularmente donde el dolor es dolor agudo, dolor crónico, dolor neuropático y/o dolor central, o particularmente para tratar una afección inflamatoria, particularmente donde la afección inflamatoria tiene un componente del sistema nervioso central, particularmente donde la afección inflamatoria es una o más de meningitis, mielitis, encefalomiелitis, aracnoiditis, sarcoidosis, granuloma, inflamación inducida por fármacos, enfermedad de Alzheimer, accidente cerebrovascular, demencia por VIH, encefalitis, infección parasitaria, un trastorno desmielinizante inflamatorio, una enfermedad autoinmunitaria del SNC mediada por linfocitos T CD8+, enfermedad de Parkinson, miastenia grave, neuropatía motora, síndrome de Guillain-Barre, neuropatía autoinmunitaria, síndrome miasténico de Lambert-Eaton, enfermedad neurológica paraneoplásica, atrofia cerebelosa paraneoplásica, síndrome del hombre rígido no paraneoplásica, atrofia cerebelosa progresiva, encefalitis de Rasmussen, esclerosis lateral amiotrófica, corea de Sydenham, síndrome de Gilles de la Tourette, poliendocrinopatía autoinmunitaria, neuropatía disimunitaria, neuromiotonía adquirida, artrogriposis múltiple, neuritis óptica, accidente cerebrovascular, lesión cerebral traumática (TBI), estenosis espinal, lesión aguda de la médula espinal y compresión de la médula espinal, o donde la afección inflamatoria está asociada con una infección del sistema nervioso central, particularmente donde la infección puede ser una infección bacteriana causada por uno o más de *estreptococos del grupo B* (por ejemplo, subtipos III), *Streptococcus pneumoniae* (p.ej., serotipos 6, 9, 14, 18 y 23), *Escherichia coli* (p.ej., que porta el antígeno K1), *Listeria monocytogenes* (p.ej., serotipo IVb), infección por neisseria tal como *Neisseria meningitidis* (meningococo), infección por estafilococos, infección por *Haemophilus influenzae* tipo B, *Klebsiella*, *Mycobacterium tuberculosis*, *Treponema pallidum* o *Borrelia burgdorferi*, o donde la infección es una infección vírica causada por uno o más de un enterovirus, virus del herpes simple tipo 1 o 2, virus linfotrófico humano de linfocitos T, virus varicela zoster, virus de las paperas, virus de inmunodeficiencia humana (VIH) o virus de la coriomeningitis linfocítica (LCMV) o donde la afección inflamatoria está asociada con un cáncer del SNC, opcionalmente una meningitis maligna, particularmente donde el sujeto puede estar recibiendo terapia con un agente cardiotoxico de otra manera, particularmente donde el agente cardiotoxico es una antraciclina/antraquinolona, ciclofosfamida, antimetabolito, agente antimicrotúbulos, inhibidor de tirosina cinasa, bevacizumab o trastuzumab, particularmente donde el agente cardiotoxico es ciclopentenil citosina, 5-fluorouracilo, capecitabina, paclitaxel, docataxel, adriamicina, doxorubicina, epirubicina, emetina, isotamida, mitomicina C, erlotinib, gefitinib, imatinib, sorafenib, sunitinib, cisplatino, talidomida, busulfán, vinblastina, bleomicina, vincristina, trióxido de arsénico, metotrexato, rosiglitazona o mitoxantrona, y/o donde el sujeto tiene cáncer, particularmente donde el cáncer es uno o más de cáncer de mama, cáncer de próstata, cáncer gastrointestinal, cáncer de pulmón, cáncer de ovario, cáncer de testículos, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de páncreas, cáncer de hígado, cáncer de riñón, carcinoma de células escamosas, cáncer del SNC o cerebral, melanoma, cáncer no melanoma, cáncer de tiroides, cáncer de endometrio, un tumor epitelial, cáncer de hueso o un cáncer hematopoyético, y/o donde la administración del conjugado puede reducir la cardiotoxicidad del agente, en relación con una forma no conjugada del agente.
15. Un conjugado de una cualquiera de las reivindicaciones 1-6 para su uso en un procedimiento para obtener imágenes de un componente de órganos o tejidos en un sujeto, que comprende (a) administrar el conjugado al sujeto, donde el polipéptido se conjuga con una entidad detectable, y (b) visualizar la entidad detectable en el sujeto, particularmente donde el compartimento de órganos o tejidos comprende el sistema nervioso central, o donde el compartimento de órganos o tejidos comprende el cerebro, y/o donde la visualización de la entidad detectable comprende uno o más de fluoroscopia, radiografía de proyección, exploración por tomografía computarizada de rayos X, tomografía por emisión de positrones (PET), tomografía computarizada por emisión de fotón único (SPECT) u obtención de imágenes por resonancia magnética (MRI).

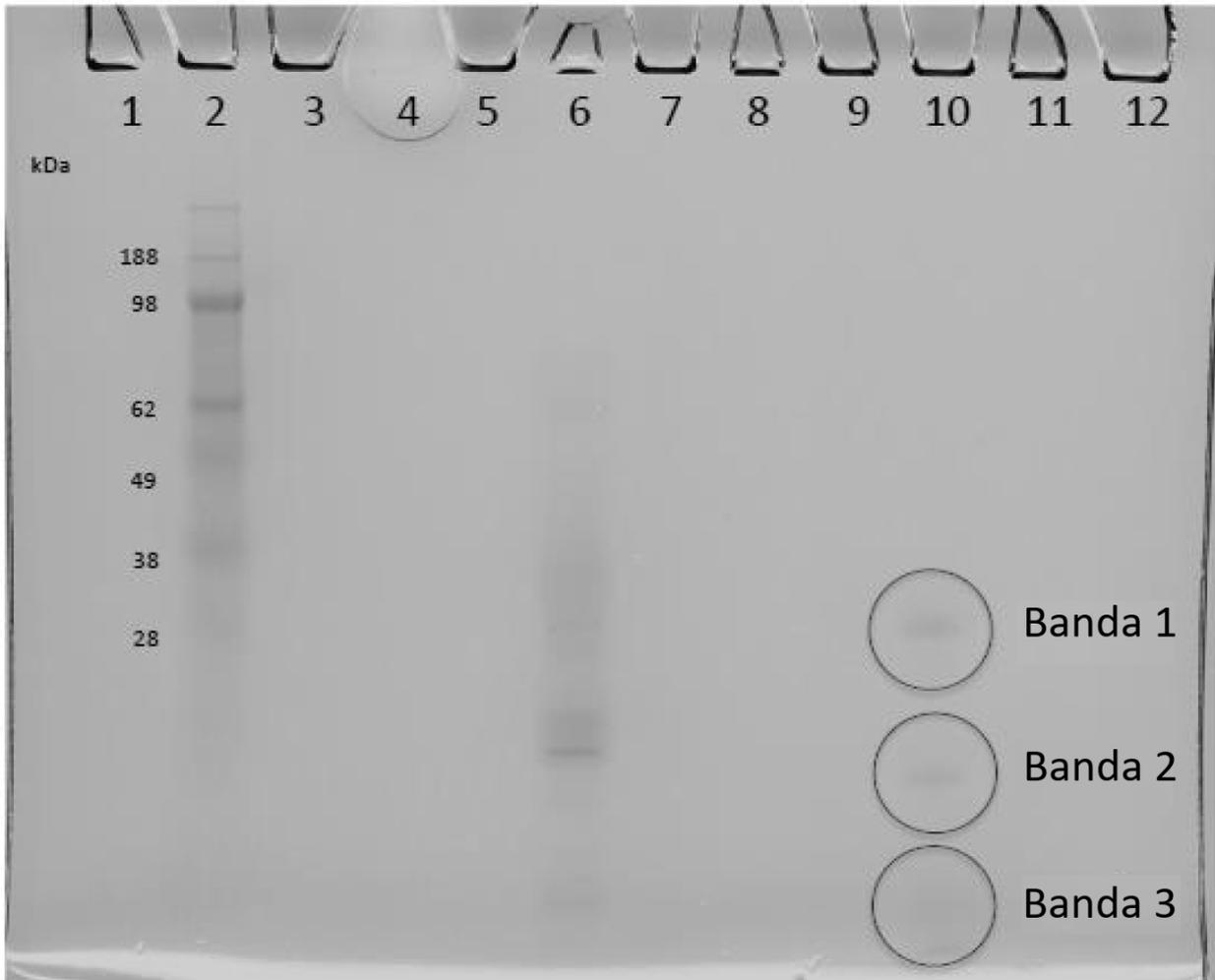


Figura 1

ES 2 774 549 T3

Confianza	Secuencia	Modificaciones	Carga	MH+ [Da]	Δ M [ppm]	RT [min]	#
							Escisiones perdidas
Alta	LFSHEGSSSQMFSEAYGQK		2	2267, 00762	0,08	43, 95	0
Alta	HTTVFDNTNGHNSEPWAAELR		2	2396, 10185	0,15	36, 39	0
Alta	TLPSWGQALLSQDFELLcR	C18 (Carbamidometil)	2	2234, 13017	1,19	72, 07	0
Alta	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLcR	C10 (Carbamidometil); C24 (Carbamidometil)	2	2656, 12822	-0,33	44, 59	0
Alta	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7 (Carbamidometil); C10 (Carbamidometil)	2	1925, 84819	0,05	39, 87	0
Alta	ADTDGGLIFR		2	1064, 53679	-0,35	75, 63	0
Alta	mFDSSNYHGQDLLFK	M1(Oxidación)	2	1817, 8167	0,18	40, 07	0
Alta	cGDMAVAFR	C1 (Carbamidometil)	2	1026, 45098	1,32	35, 91	0
Alta	AQDLFGDDHNKnGFK	N12(Desamidado)	2	1706, 77641	-0,32	27, 41	1
Alta	LFSHEGSSSQmFSSEAYGQK	M11(Oxidación)	2	2283, 00176	-0,26	38, 56	0
Alta	LLNEGQRLFSHEGSSSQMFSEAYGQK		3	3077, 44004	-0,73	47, 85	1

Figura 2A

ES 2 774 549 T3

Alta	LFSHEGSSFQMFSSSEAYGQKDLLFK		3	2883, 36435	-0,54	52, 06	1
Alta	MFDSSNYHGQDLLFK		2	1801, 82317	0,95	45, 29	0
Alta	SEDYELLcPNGAR	C1 (Carbamidometil)	2	1523, 67937	-0,12	35, 44	0
Alta	cGDmAVAFR	C1 (Carbamidometil); M4(Oxidación)	2	1042, 4439	-0,61	22, 74	0
Alta	LcRGDSSGEGVcDK	C2 (Carbamidometil); C12 (Carbamidometil)	2	1539, 65276	0,04	13, 54	1
Alta	EAGIQPSLLcVVR	C10 (Carbamidometil)	2	1342, 71453	-0,22	40, 47	0
Alta	LKPEIQcVSAK	C7 (Carbamidometil)	3	1272, 69797	-0,1	21, 58	0
Alta	HSTVLENTDGK		2	1200, 5855	-0,05	15, 92	0
Alta	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIYE AGK	C7 (Carbamidometil)	3	3145, 51023	-0,18	55, 77	0
Alta	GDSSGEGVcDK	C9 (Carbamidometil)	2	1110, 43633	-0,48	10, 07	0
Alta	cLAEGAGDVAFVK	C1 (Carbamidometil)	2	1336, 65605	-0,44	37, 26	0
Alta	SSHVTIDTLKGVK		3	1384, 77948	-0,02	24, 42	1
Alta	TVGWNVPVGYLVESGR		2	1732, 90166	-0,06	54, 48	0
Alta	RDSSHAFTLDELRL		3	1546, 76072	-0,13	32, 63	1
Alta	IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK		3	2208, 10361	0,22	44, 72	0
Alta	YYDYSGAFR		2	1141, 49394	-0,85	68	0
Alta	AQDLFGDDHDK		3	1259, 56464	-0,41	20, 56	0
Alta	DSSHAFTLDELRL		2	1390, 65898	-0,58	76, 84	0
Alta	GDSSGEGVcDKSPLER	C9 (Carbamidometil)	3	1692, 74961	0,1	21, 09	1
Alta	WcATSDPEQHK	C2 (Carbamidometil)	2	1358, 57903	-0,29	19, 94	0
Alta	LLnEGqRLFSHEGSSFqMFSSEAYGQK	N3(Desamidado); Q6(Desamidado); Q17(Desamidado)	3	3080, 3928	-0,5	57, 33	1
Alta	cLVENAGDVAFVR	C1 (Carbamidometil)	2	1449, 71599	0,3	39, 92	0

Figura 2B

ES 2 774 549 T3

Alta	RSSHVTIDTLK		3	1256, 69574	-0,02	19, 02	1
Alta	GLLcDPNRLPPYLR	C4 (Carbamidometil)	4	1683, 89943	-0,33	43, 29	1
Alta	MFDSSnYHGQDLLFK	N6(Desamidado)	3	1802, 8024	-1,71	45, 84	0
Alta	AQDLFGDDHNKNGFK		4	1705, 79641	2,03	25, 95	1
Alta	HTTVFDINTnGHNSEPWAAELR	N9(Desamidado)	4	2397, 08584	0,13	38, 77	0
Alta	SEDYELLCpNGAR	C8 (Carbamidometil) N10(Desamidado)	2	1524, 65764	-3,88	36, 12	0
Alta	TLPSWGqALLSqDFELLcR	Q7(Desamidado); Q12(Desamidado); C18 (Carbamidometil)	2	2236, 106	4,68	71, 93	0
Alta	LSVMGcDVLK	M4(Oxidación); C6 (Carbamidometil)	2	1137, 56389	-0,37	32, 07	0
Alta	SSHVTIDTLK		2	1100, 59477	0,11	22, 53	0
Alta	EHGLKPVVGEVYDQEVGTSYYAVAVVR R		4	3120, 61098	-0,13	44, 41	1
Alta	LSVMGcDVLK	C6 (Carbamidometil)	2	1121, 56914	-0,23	41, 14	0
Alta	cGNMSEAFR	C1 (Carbamidometil)	2	1071, 43474	0,05	24, 39	0
Alta	SPQHcMER	C5 (Carbamidometil)	2	1044, 43474	-0,25	9,6 7	0
Media	ADVTEWR		2	876,4 2131	0,3	26, 04	0
Media	SPQHcMER	C5 (Carbamidometil); M6(Oxidación)	2	1060, 42974	-0,17	0,9 2	0
Media	GLLcDPNR	C4 (Carbamidometil)	2	944,4 616	-0,3	23, 83	0
Media	TVGWNVPVGYLVESGRLSVMGcDVLK	C22 (Carbamidometil)	3	2835, 45389	0,2	64, 55	1
Media	GLLcDPnRLPPYLR	C4 (Carbamidometil) N7(Desamidado)	3	1684, 88028	-2,21	45, 01	1
Baja	DLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYL HAMK		4	3706, 85024	1,06	70, 87	1
Baja	LLNEGQR		2	829,4 5293	0,3	15, 59	0
Baja	DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK		3	3090, 48777	-0,02	64, 02	0

Figura 2C

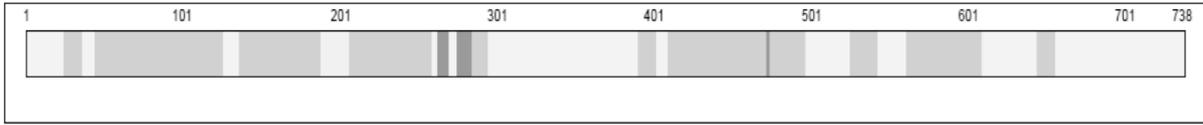
Baja	DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK GLLcDPNR	C31 (Carbamidometil)	4015, 3 92771	70, -1,03 52	1
Baja	VPAHAVVVR		947,5 2 7927	18, 0,75 33	0
Q12(Desamidado);					
Baja	DSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMK GLLcDPNR	C31 (Carbamidometil)	4016, 3 93406	70, 4,53 55	1

Figura 2D

1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	
1	MRGPGGALWL	LLALRTVLGG	MEVRCATSD	PEQHKCGRMS	EAFREAGIQP	SLLCVRGTSA	DHCVQLIAAQ	EADAITLDGG	AIYEAGKEHG	LKPVVGEVVD	QEVGTSYYAV	AVVRRSSHVT	IDTLKGVKSC
131	HGINRTVGV	NVPVGYLVES	GRLSVMCCDV	LQAVSDYFEG	SCVPGAGETS	YSESLCRLCR	GDSSGEGVCD	KSPLERYDYD	SGAFRCLEAG	AGDVAFVKHS	TVLENTDGKT	LPSWQALLS	QDFELLCRDG
261	SRADVTEWRQ	CHLARVPAHA	VVVRADTDGG	LIFRLLNEQ	RLEFHEGSSF	QMFSEAYGQ	KDLLFKDSTS	ELVPIATQTY	EAWLGHEYLH	AMRGLLCPN	RPPYLRWCV	LSTPEIQKCG	DMAVAFRRQR
391	LKPEIQCVSA	KSPQHCERI	QAEQVDAVTL	SGEDIYTAGK	KYGLVPAAGE	HYAPEDSSNS	YVVAVVRRD	SSHAFTLDEL	RGKRSCHAGF	GSPAGWDVVF	GALIQRGFIR	PKDCDLTAV	SEFFNASCVP
521	VNNPKNYPS	LCALCVGDEQ	GRNKCVCNSQ	ERYGYRGAF	RCLVENAGDV	AFVRHTTVFD	NTNGHSEPW	AAELRSEDYE	LICPNGARAE	VSQFAACNLA	QIPPHAVMVR	PDNIPTVYG	LLDKAQDLFG
651	DDHNKNGFRM	FDSSNYHQD	LLEKDATVRA	VPVGEKITTYR	GWLGLDYVAA	LEGMSSQQCS	GAAPAPGAP	LLPLLPA	ARLLPPAL	SEQ ID NO:1			

Figura 2E

Banda 1

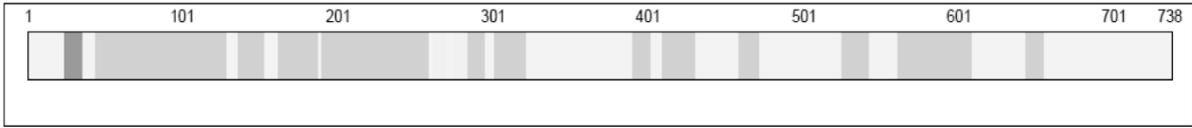


	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121
Modificaciones P08582				C	D		D	C		D			D
	MKCDSCALML	LLALRTVLGG	MEVFMCAYSQ	FRQRMCCNMS	EAFPRACIQP	SLLCVRCVTS	DRCVQLIAAQ	KADATFLDGG	AIYEACGKHC	LKPVUGREVVD	QREVCTSYVAV	AVVRRSSHVT	IDYLRKVKSC
Modificaciones P08582			D		O	C		C		C			P
	HTGINRTVGM	NVFPVGLVES	GRLSVMGCDV	LKAVSDYFGG	SCVPGAGEYS	YSESLCRLCR	GDSSGEVCD	KSPLERYDY	SGAFRCIAEG	AGDVAFKHS	TVLZHTDGET	LFSWQALLS	QDFELLCROG
Modificaciones P08582													
	SRADVTENRQ	CHLARVFAHA	VVFEADTDGG	LIFKLLNEGQ	ELFSHEGSSP	QMFSSSEAYGQ	KDLLFKDSTS	ELVPIATQIT	EAWLGHEYLH	AMKGLLCDEN	RLFPYLRWCV	LSIFEIQKCG	DNVAIFRRQR
Modificaciones P08582													
	LKPEIQCVSA	KSPQHCNERI	QASQVDAVTL	SGEDIYTAGK	KYGLVPAAGE	HYAPEDSSNS	YVVAVVRD	SSHAFTLDEL	NGKRSCHAGF	GSPAGWVPV	GALIQRGFIR	PKDCVLIYAV	SEFFNASCVP
Modificaciones P08582													
	VHNFQVYFSS	LCALCVDEEQ	GRNECVNSQ	ERYVGVNGAF	ACLVENAGDV	AFVRIHTVFD	NVNGHSEPW	AAELRSEDEE	LLCPNGARAE	VSQPAACHLA	QIPPHAVVR	PETNIETVYG	LLHWQQLFEG
Modificaciones P08582													
	DDHNKNGCFM	FDSSNYRQD	LLSKDATVRA	VFVCEKTTYR	GMKCLIDYVLA	LRGMSQQCS	GAAADARCAP	LLPILLPALA	ARLLDPAL				

SEQ ID NO:1

Figura 3A

Banda 2

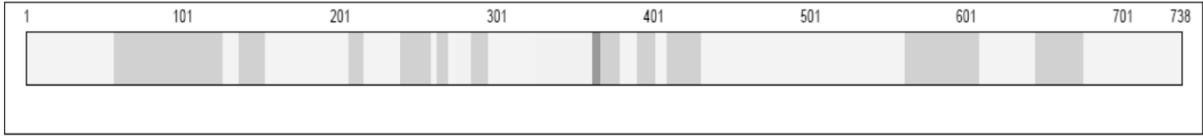


	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121
Modificaciones P08582	1					P	P						
	MRGSPGALNL LLALRATVLGG MEVFWGATSD PEQHRGGRMS EATFEAGIQP SLGCVRGTSA DHCVQLIAAQ EADAITLDGG AIYEAGKEHG LKPVVGEVYD QEVGTSTYAV AVVRRSSHYT IDTLKGVKSC												
Modificaciones P08582	131												
	HTGINKTVGW NTFVGYLVES GRLSVMGCDV LKAVSDYFGG SCVFGAGETS YSESLCRLCR QDSSGEGVCD KSPLEIYDY SGAFPCLAEG AGDVAEVGHS TVLEMTDGET LPSWQQALLS QDFELLCRDG												
Modificaciones P08582	261												
	SPADVTEWRQ CHLADVAHA VVVRADYDCC LIFLLNECQ DLFSEHCSSF QAFSSEAVCQ MDLLFKDSTS ELVDIATQTY EAWLGHVYIH AMKCLLDDIN ELDDYLRWCV LETDEIQKCC DQAVAFRQQR												
Modificaciones P08582	391												
	LKFEIQVSA KSFQGNERI QAEQVDAVTL SGEDLYTAGK KYGLVFAAGE HYAFEDSSNS YYVAVVRFD SSHAFTLDEL RGRKRSCHAGF GSPAGWDFV GALIQRGTIR FKDCVLIAT SEFFNASCVF												
Modificaciones P08582	521												
	VINPKIYPSL LCALCVGDEQ GRNRKCVNSQ ERYHYRGA F RCLWENAGDV AFVREHTTVED NTNGHNSFW AAELRSEDYE LLCPNGARAE VSQFAACNLA QIPRAVMVR PDINIFTVYG LLDKADLFG												
Modificaciones P08582	651												
	DDENKQCFEM FDSNHYCQD LLFDATAVRA VVVCRTTYR CWLCLDYVAA LECNRSQQCS CAALFAPCAD LLPILLDALA ADLLFDAL												

SEQ ID NO:1

Figura 3B

Banda 3



	1	11	21	31	41	51	61	71	81	91	101	111	121	
Modificaciones P08562	1						C				D			
		MRGFSALML	LLALRIVLGG	MEVRCATSD	FEQHKOGMS	EAFREAGIQF	SILLCVAGTSA	DHCVQLIAAQ	EADAITLDGG	AIYEAGAEHG	LKPVVGEVID	QEVGTSTIYAV	AVVRSRSHVT	IITLNGVKS
Modificaciones P08562	181											D	D	C
		HTCINATVGV	NVIVCVLVEE	GRISVMCCDV	LKAVSDYFG	SCVDCACETS	YSESLORLCR	CDSSRCVUCD	KSLERATYEV	SCAERCLAEQ	ACDVAIVKHS	TVLENTDCKT	LDSWQALLS	QDFZLLCRDC
Modificaciones P08562	261									P	C	D	P	D
		SRADVTEWRQ	CHLARVPARA	VVVRADTDGG	LIFRLINEGQ	RLFSHEGSSF	QMFSSSEAYGQ	KLLLFKDSST	EIVPIATQTY	EAWLIGHEYLR	AMKGLLCDPN	RLPPVLRWCY	LSTPEIQKCG	IMAVAFRRQR
Modificaciones P08562	391	D	DC											
		LKPEIQCVSA	KSPQHCMERI	QAEQVDAVPL	SGEDIYTACH	KYGLVFAASE	HYAPEDSGNS	YVVAVVRERD	SSHAFTLDEL	RGEHSCHAGE	SSPAGWDVIV	GALIQRGFIR	PKDCNLTAV	SEFFNAGCVF
Modificaciones P08562	521					C		D	D	D	C		D	
		VINPKNYFSS	LCALCVGDEQ	GRNEKVGNSQ	ERYVGYRGAF	RCLVENAGDV	AFVRRHTVFD	HTNGHSEFPW	AAELRSEDYE	LICFNGARAE	VSQFAACNLA	QIPPHAVMVR	EDNIHFTVYG	LLDKAQDLFG
Modificaciones P08562	651	D	D	O	D	D								
		DDHNSVGFIM	FDSSNVTGQD	LLFKDATVRA	VEVGEKTTYR	GWLSELYVAA	LEGMSSQQCS	GAAPAPGAP	LLEPILLPALA	ARLLPPAL				

SEQ ID NO:1

Figura 3C

Banda 1 (~28–38 kDa)

1 MRGPSGALWL LLALRTVLGG MEVRWCATSD PEQHKCGNMS EAFREAGIQP
51 SLLCVRG TSA DHCVQLIAAQ EADAITLDGG AIYEAGKEHG LKPVVGEVYD
101 QEVGTSYYAV AVVRRSSHVT IDTLKGVKSC HTGINRTVGVW NVPVGYLVES
151 GRLSVMGCDV LKAVSDYFGG SCVPGAGETS YSESLCRLCR GDSSGEGVCD
201 KSPLERYDY SGAFRCLAEG AGDVAFVKHS TVLENTDGKT LPSWGQALLS
251 QDFELLCRDG SRADVTEWRQ CHLARVPAHA VVVRADTDGG LIFRLLNEGQ
301 RLFSGEGSSF QMFSSEAYGQ KDLLFKDSTS ELVPIATQTY EAWLGHEYLH
351 AMKGLLCDPN RLPPYLRWCV LSTPEIQKCG DMAVAFRRQR LKPEIQCVSA
401 KSPQHCMERI QAEQVDAVTL SGEDIYTAGK KYGLVPAAGE HYAPEDSSNS
451 YYVVAVVRRD SSHAFTLDEL RGKRSCHAGF GSPAGWDVPV GALIQRGFIR
501 PKDCDVLTA V SEFFNASCV VNNPKNYPSS LCALCVGDEQ GRNKCVGNSQ
551 ERYYG YRGAF RCLVENAGDV AFVRHTTVFD NTNGHNSEPW AAELRSEDYE
601 LLCPNGARAE VSQFAACNLA QIPPHAVMVR PDTNIFTVYG LLDKAQDLFG
651 DDHNKNGFKM FDSSNYHGQD LLFKDATVRA VPVGEKTTYR GWLGLDYVAA
701 LEGMSSQQCS GAAAPAPGAP LLPLLLPALA ARLLPAL [SEQ ID NO:1]

Figura 4A

ES 2 774 549 T3

Confianza	Secuencia	Modificaciones	Puntuación iónica	Valor de exp.	Carga	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
Baja	GDSSGEGVCKKSPLEK	C9(Carbamidometil)	24	0,588637876	3	1692,74906	-0,23	11,73
Baja	LKPEIQcVSAK	C7(Carbamidometil)	27	0,772587143	3	1272,69925	0,91	11,84
Baja	SSHVTIDTLK		32	0,183325902	2	1100,59270	-1,77	12,05
Baja	AQDLFGODHNK		49	0,001586224	2	1253,56499	-0,14	12,30
Alta	SSHVTIDTLKGVK		34	0,10947824	2	1384,77971	0,14	12,63
Baja	AqDLFGODHNK	Q2(Desamidado)	24	0,316471818	3	1260,55002	0,67	13,00
Baja	GLLcDPNR	C4(Carbamidometil)	20	1,450983432	2	944,46153	-0,36	13,13
Baja	ADVTEWR		40	0,02157799	2	876,42064	-0,47	13,55
Alta	RDSHAFITLDELK		36	0,102069849	3	1546,76017	-0,48	14,62
Alta	LSVmGcDVLK	M4(Oxidación);C6(Carbamidometil)	57	0,000594205	2	1137,56389	-0,37	15,19
Baja	YYDYSGAFR		22	0,582859505	2	1141,49455	-0,31	16,14
Alta	SEDYELLcPnGAR	C8(Carbamidometil)	63	7,9564E-05	2	1523,67949	-0,04	16,22
Alta	cLAEGAGDVAFVK	C1(Carbamidometil)	47	0,007423868	2	1336,65703	0,29	16,22
Alta	DSSHAFITLDELK		39	0,031508659	3	1390,65891	-0,63	16,48
Alta	SEDYELLcPnGAR	C8(Carbamidometil);N10(Desamid)	65	4,30461E-05	2	1524,66850	3,24	16,59
Alta	HTTVFDNTmGHNSPWAELR		65	0,000115457	2	2396,10161	0,05	16,63
Alta	HTTVFDNTmGHNSPWAELR	N9(Desamidado)	29	0,352597977	4	2397,08681	0,54	16,95
Baja	SEDYELLcPnGAR	C8(Propionamida);C8(Carbamidom	21	1,495576912	2	1537,69609	-37081,82	16,98
Alta	ADTDGGLIFR		85	1,02686E-06	2	1064,53740	0,23	17,05
Alta	cLVENAGDVAFVR	C1(Carbamidometil)	82	2,76997E-06	2	1449,71514	-0,29	17,22
Alta	mFDSSNYHGQDLLFK	M1(Oxidación)	25	0,599293128	3	1817,81559	-0,43	17,30
Alta	HTTVFDNTmGHNSPWAELR	N9(Desamidado); N12(Desamidado)	17	5,447408025	4	2398,08730	7,41	17,41
Alta	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7(Carbamidometil); C10(Carbami	113	8,74972E-10	2	1925,84770	-0,21	17,42
Baja	SEDYELLcPnGAR	C8(Propionamida);C8(Carbamidom	14	5,97825186	2	1538,67668	-37060,41	17,45
Alta	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7(Carbamidometil); C10(Carbami	106	4,05712E-09	2	1926,83391	0,93	17,71
Alta	cLVEnAGDVAFVR	C1(Carbamidometil); N5(Desamida	77	7,23432E-06	2	1450,69866	-0,63	17,95
Alta	EAGIQPSLLcVR	C10(Carbamidometil)	76	7,27757E-06	2	1342,71514	0,24	17,97
Baja	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7(Carbamidometil); C10(Propion	44	0,00733681	2	1939,86528	-29393,76	18,07
Alta	cLVENAGDVAFVR	C1(Propionamida);C1(Carbamidom	61	0,000356625	2	1463,73357	-38954,56	18,40
Baja	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7(Carbamidometil); C10(Propion	47	0,003457106	2	1940,84905	-29378,99	18,43
Alta	AVSDYFGGScVPGAGETSYSESLeR	C10(Carbamidometil); C24(Carbam	93	5,3769E-08	2	2656,13042	0,49	18,51
Alta	EAGIQPSLLcVR	Q5(Desamidado); C10(Carbamidom	55	0,001031465	2	1343,69878	-0,04	18,52
Baja	S-hAGFGSPAGWDVpVpGALLiQR	C2(Propionamida); C2(Carbamidom	14	19,48150831	3	2297,11759	-24821,17	18,74
Alta	EHGLKpVVGevYDQEVGTSYYAWAVVf		39	0,080559493	4	2964,51186	0,54	18,75
Alta	S-hAGFGSPAGWDVpVpGALLiQR	C2(Carbamidometil)	50	0,005390434	3	2282,11502	0,62	20,48
Alta	S-hAGFGSPAGWDVpVpGALLiQR	C2(Carbamidometil); Q21(Desamid	22	3,584246826	3	2283,09995	1,02	20,97
Media	KYGLWpAAGEHYAPEDSSNSYYWAVVf		11	55,84334183	3	3041,47208	-9,32	21,45
Alta	TVGWNpVpVgYLVESGR		75	1,83654E-05	2	1732,90264	0,50	21,62
Alta	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGATY	C7(Carbamidometil)	28	1,02247977	3	3145,51316	0,75	22,45
Alta	IQAeqVDAVTLsGEDiYTAgK		121	4,90258E-10	2	2208,10674	1,63	23,33

Figura 4B

Banda 2 (~14-17 kDa)

1 MRGPSGALWL LLALRTVLGG MEVRWCATSD PEQHKCGNMS EAFREAGIQP
51 SLLCVRG TSA DHCVQLIAAQ EADAITLDGG AIYEAGKEHG VGEVYD
101 QEVGTSYYAV AVVRRSSHVT IDTLKGVKSC HTGINRTVWG NVPVGYLVES
151 GRLSVMGCDV LKA VSDYFGG SCVPGAGETS YSESLCRLCR GDSSGEGVCD
201 KSPLERYDY SGAFRCLAEG AGDVAFVKHS TVLENTDGKT LPSWGQALLS
251 QDFELLCRDG SRADVTEWRQ CHLARVPAHA VVVRADTDGG LIFRLLNEGQ
301 RLFSHEGSSF QMFSSEAYGQ KDLLFKDSTS ELVPIATQTY EAWLGHEYLH
351 AMKGLLCDPN RLPPYLRWCV LSTPEIQKCG DMAVAFRRQR **LKPEIQCVSA**
401 KSPQHCMERI **QAEQVDAVTL** SGEDIYTAGK KYGLVPAAGE HYAPEDSSNS
451 YYVVAVVRRD **SSHAFTLDEL** RGKRSCHAGF GSPAGWDVPV GALIQRGFIR
501 PKDCDLTAV SEFFNASCVP VNNPKNYPSS **LCALCVGDEQ** GRNKCVGNSQ
551 ERYYG YRGAF RCLVENAGDV **AFVRHTTVFD** NTNGHNSEPW AAEL**SEDYE**
601 LLCPNGARAE VSQFAACNLA QIPPHAVMVR PDTNIFTVYG LLDKAQDLFG
651 DDHNKNGFKM FDSSNYHGQD LLFKDATVRA VPVGEKTTYR GWLGLDYVAA
701 LEGMSSQQCS GAAAPAPGAP LLPLLLPALA ARLLPPAL [SEQ ID NO:1]

Figura 5A

ES 2 774 549 T3

Confianza	Secuencia	Modificaciones	Puntuación iónica	Valor de exp.	Carga	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
Alta	AVSDYFGGScVPGAGETSYSSESLcR	C10(Carbamidometil); C24(Carba	105	3,32619E-09	2	2656,13091	0,68	18,42
Alta	ADTDGGLIFR		88	5,66332E-07	2	1064,53667	-0,46	16,92
Alta	IQAEQVDVAVTLSGEDIYTAGK		83	2,68245E-06	2	2208,10503	0,86	18,53
Alta	cLVENAGDVAFVR	C1(Carbamidometil)	73	2,18803E-05	2	1449,71599	0,30	17,53
Alta	EAGIQPSLLcVR	C10(Carbamidometil)	72	1,893E-05	2	1342,71526	0,33	17,87
Alta	EAGIQPSLLcVR	Q5(Desamidado); C10(Carbamidom	72	2,09047E-05	2	1343,69927	0,32	18,46
Alta	TVGWNVVPGVYLVESGR		64	0,000214885	2	1732,90276	0,57	21,54
Alta	TVGWNVVPGVYLVESGR	N5(Desamidado)	61	0,00037243	2	1733,88884	1,76	22,34
Alta	cLAEGAGDVAFVKHSTVLENTDgK	C1(Carbamidometil)	59	0,000716311	3	2518,22568	0,53	15,87
Alta	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7(Carbamidometil)	50	0,006393688	3	3145,50913	-0,53	22,11
Alta	HSTVLENTDgK		49	0,002664503	2	1200,58537	-0,15	8,94
Alta	SSHVTIDTLKGVK		47	0,005004121	2	1384,77959	0,06	12,56
Alta	SEDYELLCpNGAR	C8(Carbamidometil)	44	0,007060764	2	1523,67925	-0,20	16,38
Alta	cLAEGAGDVAFVK	C1(Carbamidometil)	43	0,015618173	2	1336,65764	0,74	17,35
Alta	NYPSSLcALcVGDEQGR	C7(Carbamidometil); C10(Carbam	42	0,011117546	2	1925,85039	1,19	17,48
Alta	DSSHAFTLDELr		40	0,02400093	2	1390,65923	-0,41	17,41
Alta	LFSHEGSSSFQmFSSEAYGQK	M11(Oxidación)	34	0,067830844	3	2283,00125	-0,48	16,73
Alta	EHGLKPVWGEVYDQEVGTSYYAVAVVF		18	9,497357658	3	2964,48630	-8,09	20,83
Media	VPAHAVVVR		37	0,016034535	2	947,57823	-0,35	9,83
Media	YYDYSGAFR		32	0,058131104	2	1141,49529	0,33	16,02
Baja	ADVTEWR		42	0,014791458	2	876,42088	-0,19	13,46
Baja	SSHVTIDTLK		45	0,008209964	2	1100,59307	-1,44	12,00
Baja	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7(Carbamidometil); Q14(Desamid	13	30,54462867	3	3146,51181	5,41	21,09
Baja	RSSHVTIDTLK		21	2,359482024	3	1256,69629	0,41	10,68
Baja	cLAEGAGDVAFVK	C1(Propionamida); C1(Carbamidom	49	0,004630097	2	1350,67266	-42216,82	17,34
Baja	RDSHAFTLDELr		18	7,055056021	3	1546,75998	-0,60	15,58
Baja	GDSSGEGVcDKSPLER	C9(Carbamidometil)	26	0,349899255	2	1692,75029	0,50	11,53
Baja	GLLcDPNR	C4(Carbamidometil)	17	2,628224465	2	944,46153	-0,36	13,06
Baja	SEDYELLCpNGAR	C8(Carbamidometil); N10(Desamid	12	7,790573694	2	1524,66240	-0,76	16,62
Baja	AVSDYFGGScVPGAGETSYSSESLcR	C10(Carbamidometil); C24(Propio	32	0,094002039	2	2670,14946	-21353,40	19,02
Baja	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7(Propionamida); C7(Carbamidom	11	56,65840641	3	3159,52512	-18047,90	26,07
Baja	GDSSGEGVcDKSPLER	C9(Propionamida); C9(Carbamidom	35	0,066541439	3	1706,76413	-33409,67	12,28
Baja	LKPEIQcVSAK	C7(Carbamidometil)	12	25,47451421	2	1272,69792	-0,13	11,81

Figura 5B

Banda 3 (~3-5 kDa)

```

  1 MRGPSGALWL LLALRTVLGG MEVRWCATSD PEQHKCGNMS EAFREAGIQP
 51 SLLCVRG TSA DHCVQLIAAQ EADAITLDGG AIYEAGKEHG LKPVVGEVYD
101 QEVGTSYYAV AVVRRSSHVT IDTLKGVKSC HTGINRTVGW NVPVGYLVES
151 GRLSVMGCDV LKAVSDYFGG SCVPGAGETS YSESLCRLCR GDSSGEGVCD
201 KSPLERYDY SGAFRC LAEG AGDVAFVKHS TVLENTDGKT LPSWGQALLS
251 QDFELLCRDG SRADVTEWRQ CHLARVPAHA VVVRADTDGG LIFRLLNEGQ
301 RLFSHEGSSF QMFSSEAYGQ KDLLFKDSTS ELVPIATQTY EAWLGHEYLH
351 AMKGLLCDPN RLPPYLRWCV LSTPEIQKCG DMAVAFRRQR LKPEIQCVSA
401 KSPQHCMERI QAEQVDAVTL SGEDIYTAGK KYGLVPAAGE HYAPEDSSNS
451 YYVVAVVRRD SSHAFTLDEL RGKRSCHAGF GSPAGWDVPV GALIQRGFIR
501 PKDCDVLTA V SEFFNASCV P VNNPKNYPSS LCALCVGDEQ GRNKCVGNSQ
551 ERYGYRGAF RCLVENAGDV AFVRHTTVFD NTNGHNSEPW AAELRSEDYE
601 LLCPNGARAE VSQFAACNLA QIPPHAVMVR PDTNIFTVYG LLDKAQDLFG
651 DDHNKNGFKM FDSSNYHGQD LLFKDATVRA VPVGEKTTYR GWLGLDYVAA
701 LEGMSSQQCS GAAAPAPGAP LLPLLLPALA ARLLPPAL [SEQ ID NO:1]

```

Figura 6A

ES 2 774 549 T3

Confianza	Secuencia	Modificaciones	Puntuación iónica	Valor de exp.	Carga	MH+ [Da]	ΔM [ppm]	RT [min]
Alta	EHGLKPVWGEVYDQEVGTSYYAVAVWF		92	3,98408E-07	3	2964,51340	1,06	18,72
Alta	ADTDGGLIFR		80	3,43802E-06	2	1064,53630	-0,81	17,05
Alta	IQAEQVDAVTLSGEDIYTAGK		77	1,11566E-05	2	2208,10503	0,86	18,53
Alta	cLAEGAGDVAFVK	C1(Carbamidometil)	69	4,64898E-05	2	1336,65679	0,11	16,37
Alta	AQDLFGDDHINK		54	0,000515661	2	1259,56474	-0,33	12,27
Alta	LKPEIQcVSAK	C7(Carbamidometil)	46	0,011480148	2	1272,69829	0,15	11,78
Alta	DSSHAFTLDELRL		45	0,00851981	3	1390,65900	-0,57	17,45
Alta	YYDYSGAFR		42	0,005301934	2	1141,49443	-0,42	16,22
Alta	WcVLSTPEIQK	C2(Carbamidometil)	41	0,035667619	2	1360,69390	0,65	18,09
Alta	LKPEIQcVSAK	Q6(Desamidado); C7(Carbamidometil)	40	0,045361318	2	1273,68242	0,24	12,30
Alta	GTSADHcVQLIAAQEADAITLDGGAIY	C7(Carbamidometil)	16	15,05040921	3	3145,51242	0,52	22,45
Media	mFDSNHYHGQDLLFK	M1(Oxidación)	13	10,33638211	3	1817,81614	-0,13	17,30
Baja	SEDYELLcPNGAR	C8(Carbamidometil)	43	0,008580171	2	1523,68059	0,69	16,37
Baja	AqDLFGDDHINK	Q2(Desamidado)	20	0,820984659	3	1260,54947	0,23	12,97
Baja	LFSHEGSSFMFSSEAYGQK	M11(Oxidación)	16	5,227925584	3	2283,00437	0,88	16,79
Baja	RDSSHAFTLDELRL		20	3,778030027	3	1546,76053	-0,25	15,62
Baja	GLLcDPNR	C4(Carbamidometil)	28	0,21544481	2	944,46129	-0,62	13,00
Baja	GLLcDPNRLPPYLR	C4(Carbamidometil)	19	4,54838221	3	1683,89920	-0,47	18,45
Baja	LKPEIQcVSAK	C7(Propionamida); C7(Carbamidometil)	14	13,9717555	2	1286,71367	-44315,64	12,39

Figura 6B

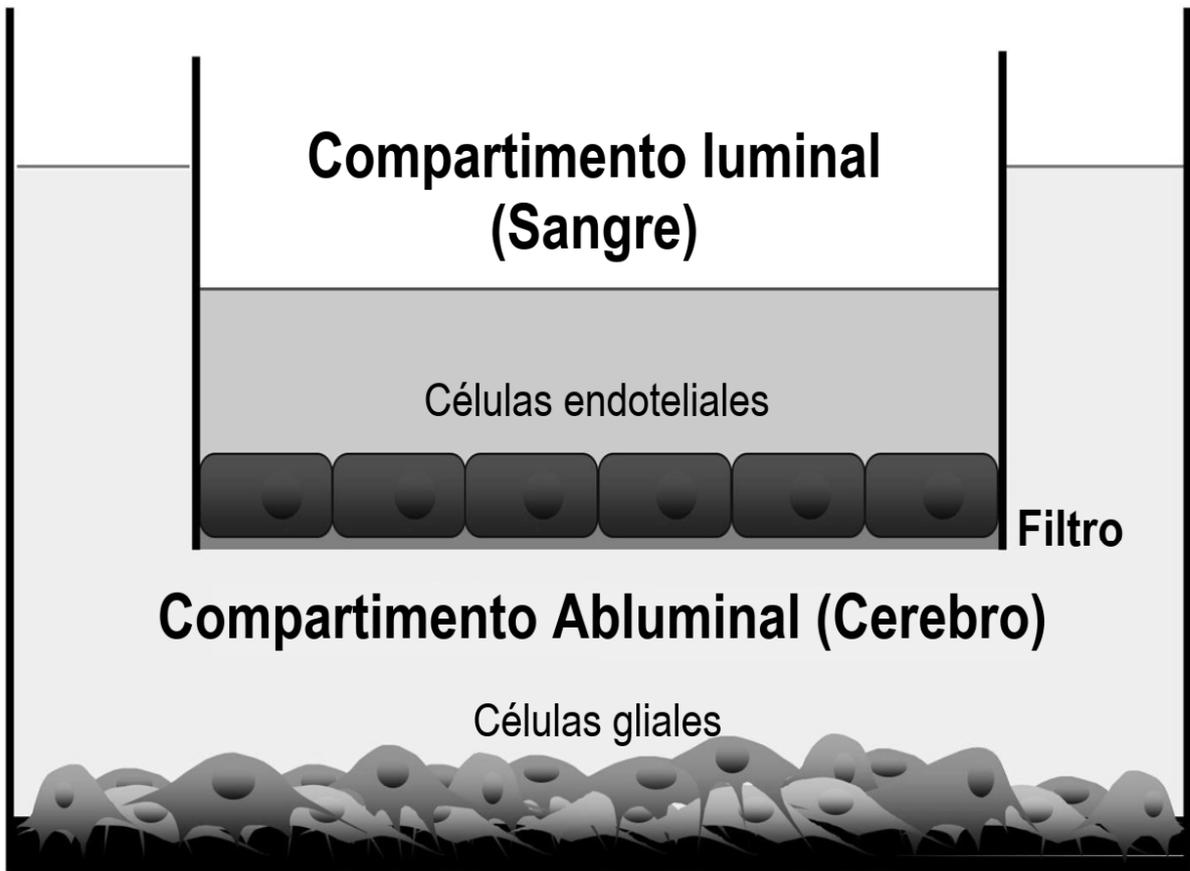


Figura 7

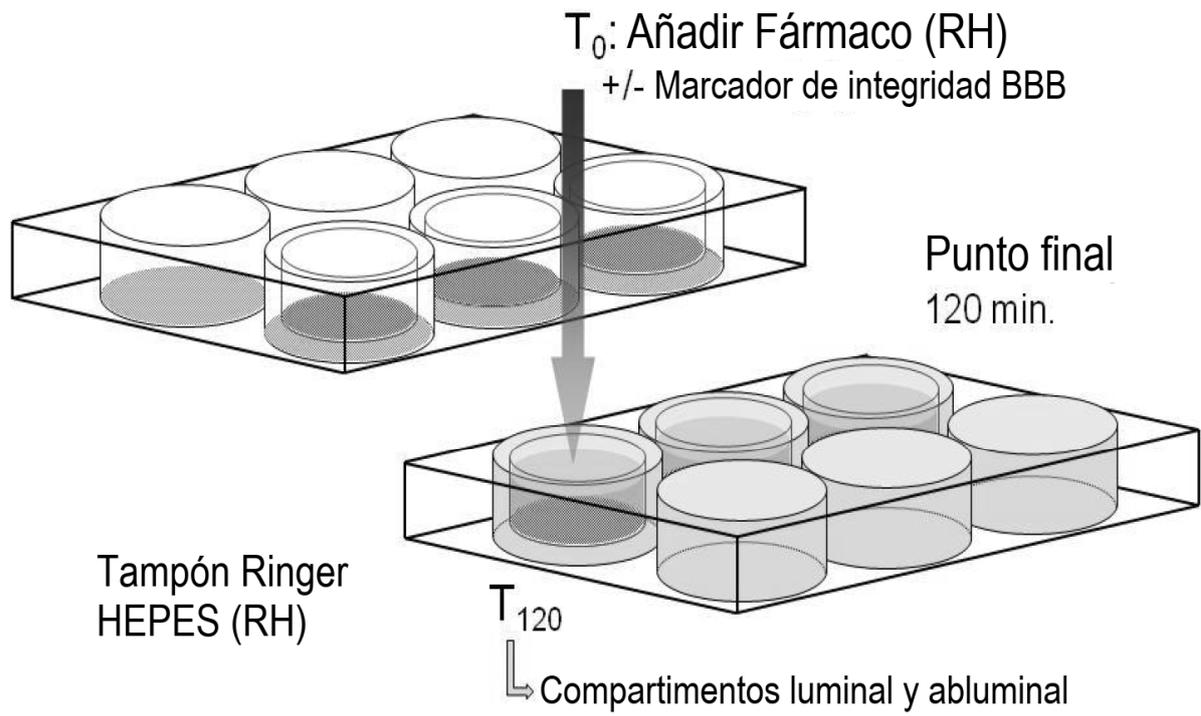


Figura 8

AA: **GMEVRWCATSDPEQH**KCGNMSEAFREAGIQPSLLCVRGTSADHCVQLIAAQEADAITLDG
 Pred: -EEEEEEEE-HHHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEE---HHHHHHHHH---EEEE-H

AA: **GAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQEVGTSYAVAVVRRSSHVTIDTLKGVKSCHTGINRTVG**
 Pred: HHHHHH---EEEEEEEE---EEEEEEEEEE---HHH-----

AA: **WNVVPGYLVESGRLSVMGCDVLKAVSDYFGGSCVPGAGETSYSCLRCLCRGDSSGEGVC**
 Pred: EEEEEHHHHHHH-----HHHHHHHHHHH-----HHHHHH-----

AA: **DKSPLERYDYSGAFRCLAEGAGDVAFVKHSTVLENTDGKTLPSWGWQALLSQDFELLCRD**
 Pred: -----HHHHHHHH---EEEE-----HHHHHH---

AA: **GSRADVTEWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQRLFSHEGSSSQMFSEAYG**
 Pred: -----EEEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH-----HHH-

AA: **QKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHAYLHAMKGLLCDPNRPPYLRWCVLSTPEIQK**
 Pred: ---EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEE---HHHHHH

AA: **GDMAVAFRRRLKPEIQCVSAKSPQHCMERIQAEQVDAVTLGEDIYTAGKTYGLVPAAG**
 Pred: HHHHHHHHH---EEEE---HHHHHHHHH---EEEE---HHHHHHHHHH---EEEE

AA: **EHYAPEDSSNSYVVAVVRRDSSHAFTLDELGRKRSCHAGFGSPAGWDVVPVGGALIQRGI**
 Pred: EE-----EEEEEEEE---HHH---EEE-----EEEE-HHHHH---

AA: **RPKDCDVLTAVERSEFNASCVPVNNPKNYPSSLCALCVGDEQGRNKCVGNSQERYGYRGA**
 Pred: -----EEEE-----HHHHHH-----H

AA: **FRCLVENAGDVAFVRHTTVFDNTNGHNSEPWAAELRSEDEYELLCPNGARAEVSQFAACNL**
 Pred: HHHHH---EEEE---HHH---HHHHHH---EEEE-----EE

AA: **AQIPPHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAODLFGDDHKNKNGFKMFDSSNYHGQDLLFKDATVR**
 Pred: EEE---EEEE---HHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEE---EE

AA: **AVPVGEKTTYRGWLGLDYVAALGEMSSQQC**
 Pred: EEEE---HHHH--HHHHHHHHHHHH---

En negrita: N-LOBE

Normal: C-LOBE

Subrayado: Péptidos trípticos

AA: secuencia diana

Pred: (H)= Hélice, (E)= Cadena, (-)= Bucle

Figura 9A

AA: GMEVRCATSDPEQHKCGNMSEAFREAGIQPSLLCVRGTSADHCVQLIAAQEADAITLDG
 Pred: -EEEEEEEE-HHHHHHHHHHHHHHHHHHH---EEEEEE---HHHHHHHHH---EEEE-H

AA: GAIYEAGKEHGLKPVVGEVYDQEVGTSYAVAVVRRSSHVTIDTLKGVKSCHTGINRTVG
 Pred: HHHHHH-----EEEEEEEE-----EEEEEEEEEE-----HHH-----

AA: WNVVPGYLVESGRLSVMGCDVVKAVSDYFGGSCVPGAGETSYSSESLCRLCRGDSSGEGVC
 Pred: EEEEEHHHHHHH-----HHHHHHHHHHH-----HHHHHH-----

AA: DKSPLERYDYDYGAFRCLAEAGAGDVAFVKHSTVLENTDGKTLPSWQALLSQDFELLCRD
 Pred: -----HHHHHHHH---EEEEEE-----HHHHHH----

AA: GSRADVTEWRQCHLARVPAHAVVVRADTDGGLIFRLLNEGQRLFSHEGSSFQMFSSEAYG
 Pred: -----EEEEEE---EEEEEE---HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----HHH-

AA: QKDLLFKDSTSELVPIATQTYEAWLGHEYLHAMKGLLCDPNRPPYLRWCVLSTPEIQKC
 Pred: ---EEEE-----HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEEEE---HHHHHH

AA: GDMAVAFRRQRLKPEIQCVSAKSPQHCMERIQAEQVDVAVTSGEDIYTAGKTYGLVPAAG
 Pred: HHHHHHHHHH-----EEEEEE---HHHHHHHHHH---EEEEEE-HHHHHHHHHHH---EEEEEE

AA: EHYAPEDSSNSYVVAVVRRDSSHAFTLDELGRKRSCHAGFGSPAGWDVPVPGALIQRQFI
 Pred: EE-----EEEEEEEE-----HHH-----EEE-----EEEE-HHHHH-----

AA: RPKDCDVLTAVERSEFFNASCVPVNNPNKNYPSSLCALCVGDEQGRNKCVGNSQERYGYRGA
 Pred: -----EEEE-----HHHHHH-----H

AA: FRCLVENAGDVAFVRHTTVFDNTNGHNSEPWAAELRSEDYELLCPNGARAQVSVQFAACNL
 Pred: HHHHH-----EEEEEE--HHHH-----HHHHHHH---EEEE-----EE

AA: AQIPPHAVMVRPDTNIFTVYGLLDKAQDLFGDDHKNKGFKMFDSSNYHGQDLLFKDATVR
 Pred: EEE---EEEEEE ---HHHHHHHHHHHHHHHHHH-----EEEEEE---EE

AA: AVPVGEKTTYRGWLGLDYVAALGEMSSQQC
 Pred: EEEE-----HHHH--HHHHHHHHHHHHHHHH----

En negrita: N-LOBE
 Normal: C-LOBE
Subrayado: fragmentos grandes de CNBr
 AA: secuencia diana
 Pred: (H)= Hélice, (E)= Cadena, (-)= Bucle

Figura 9B

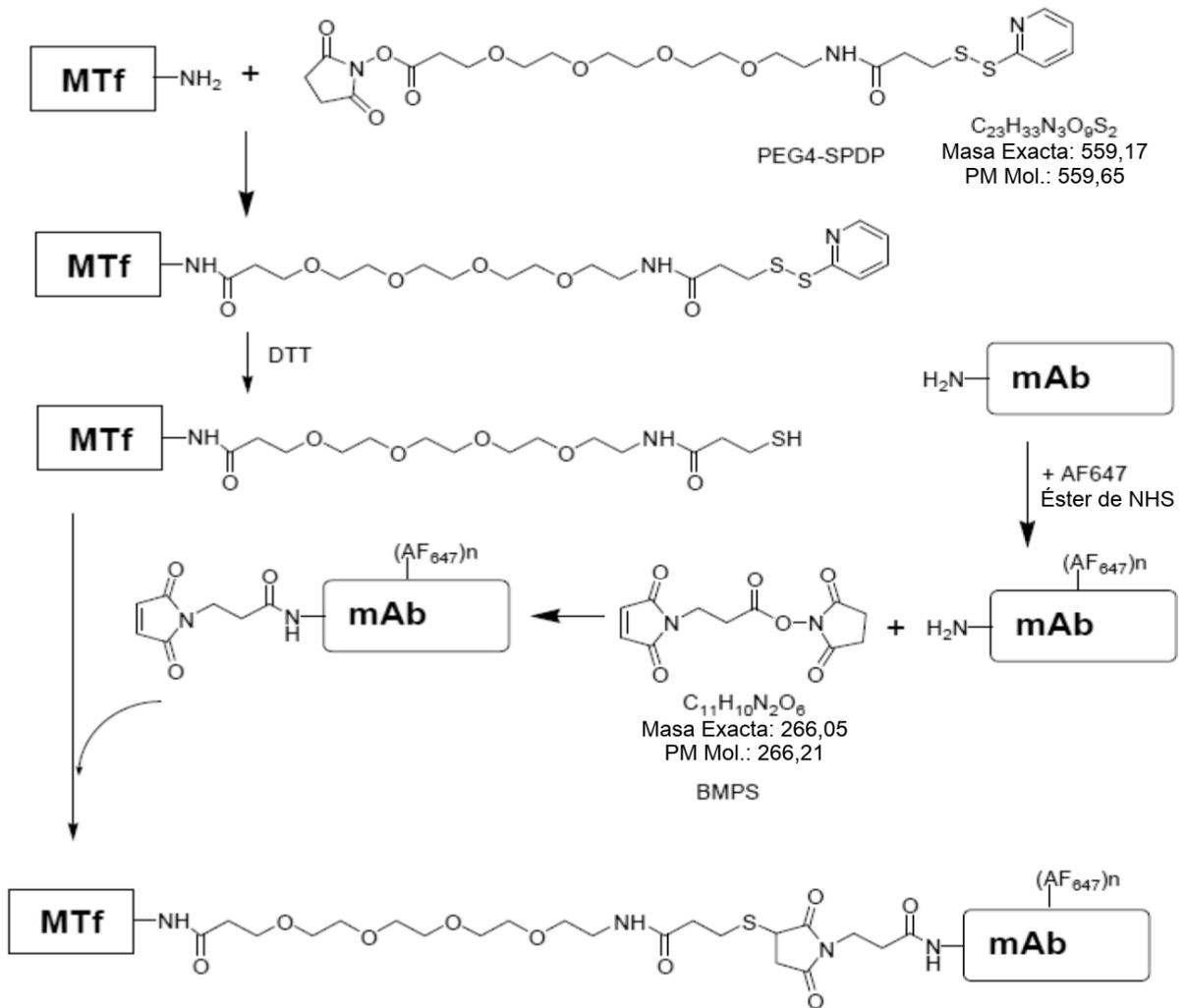


Figura 10

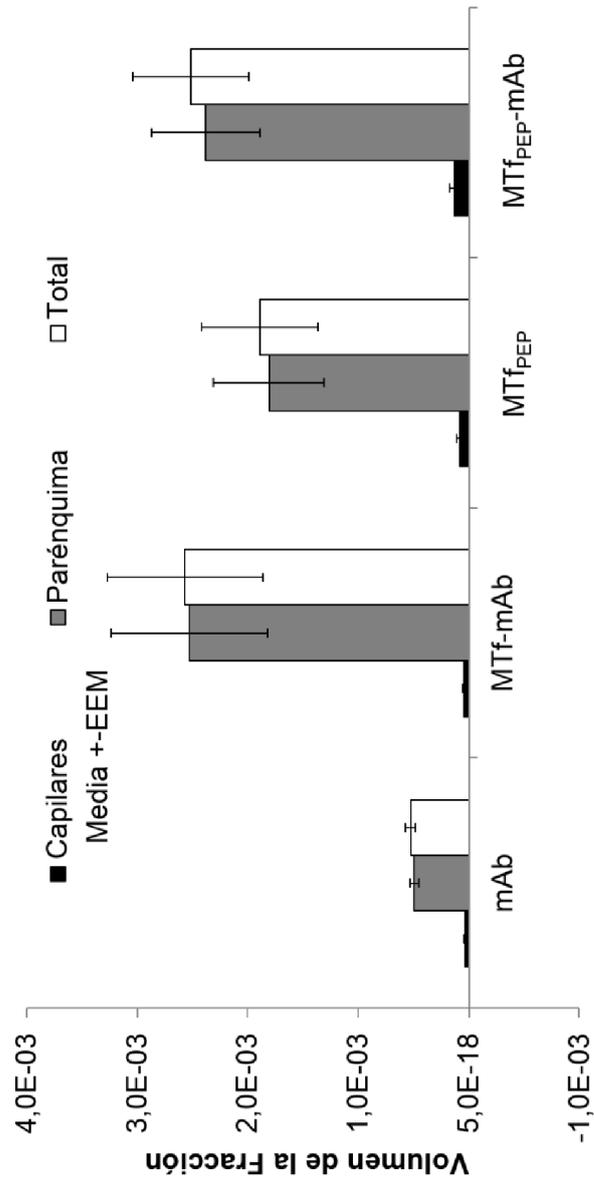


Figura 11

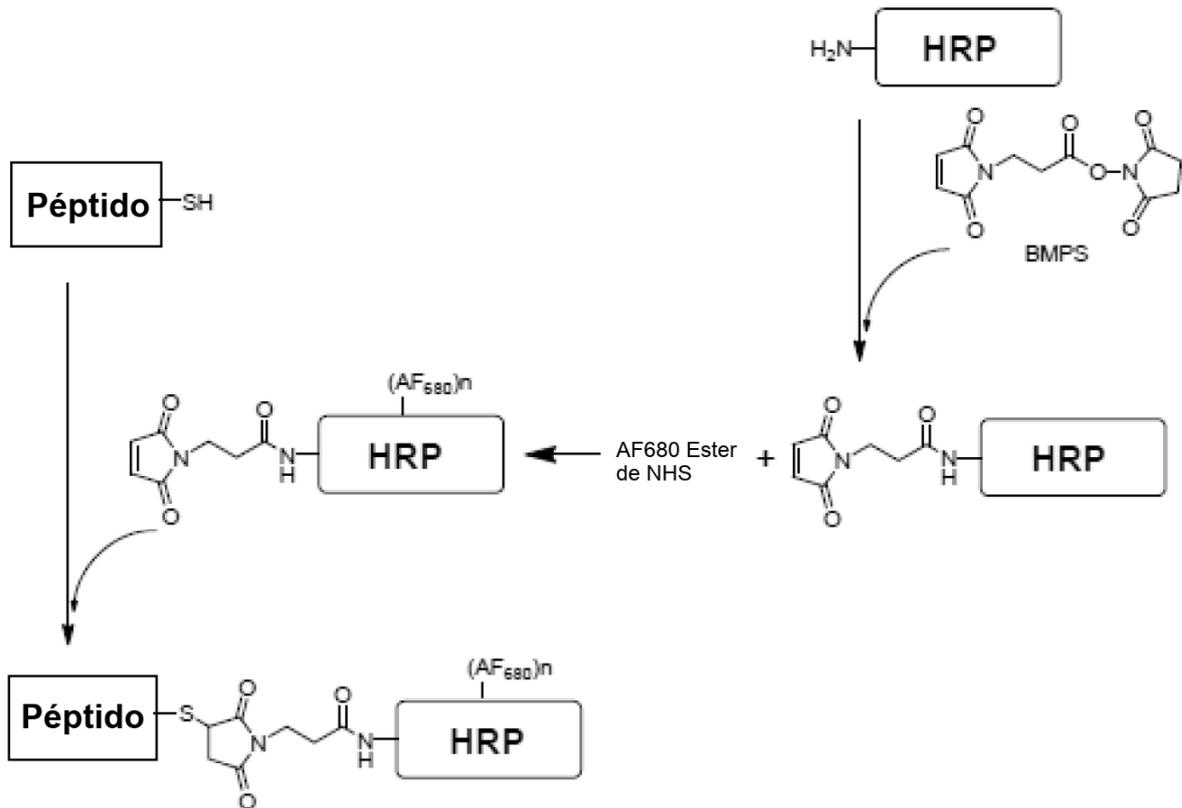


Figura 12

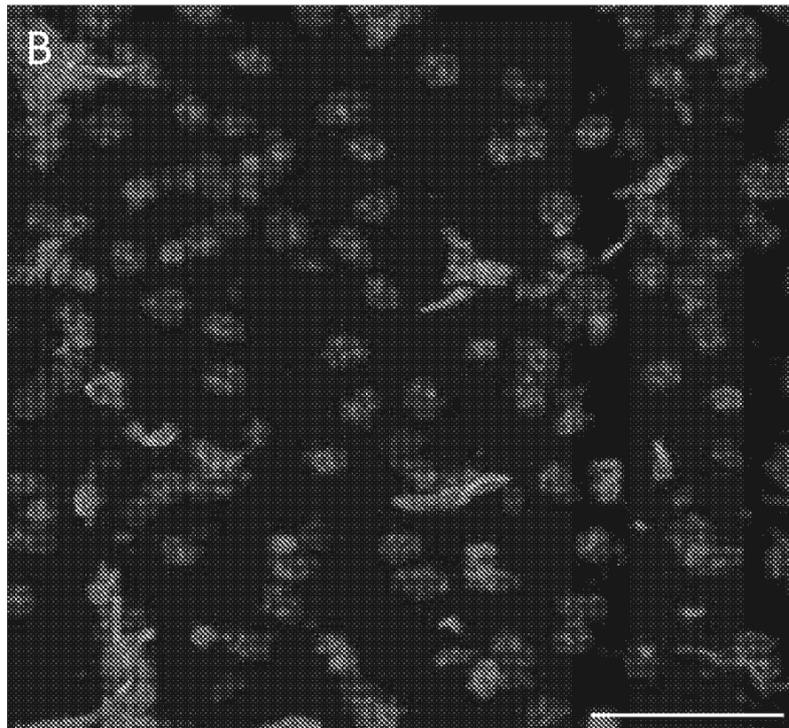
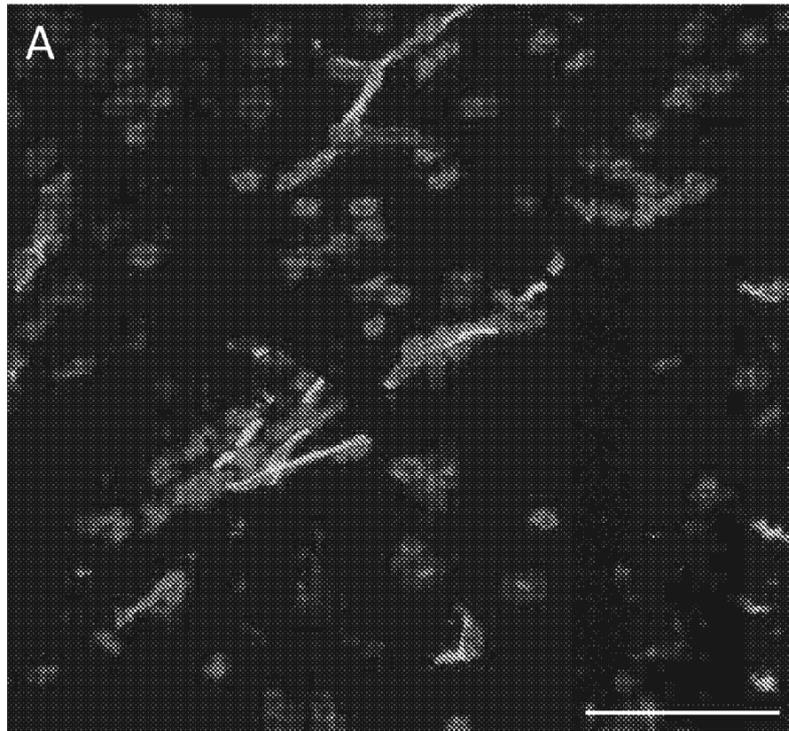


Figura 13

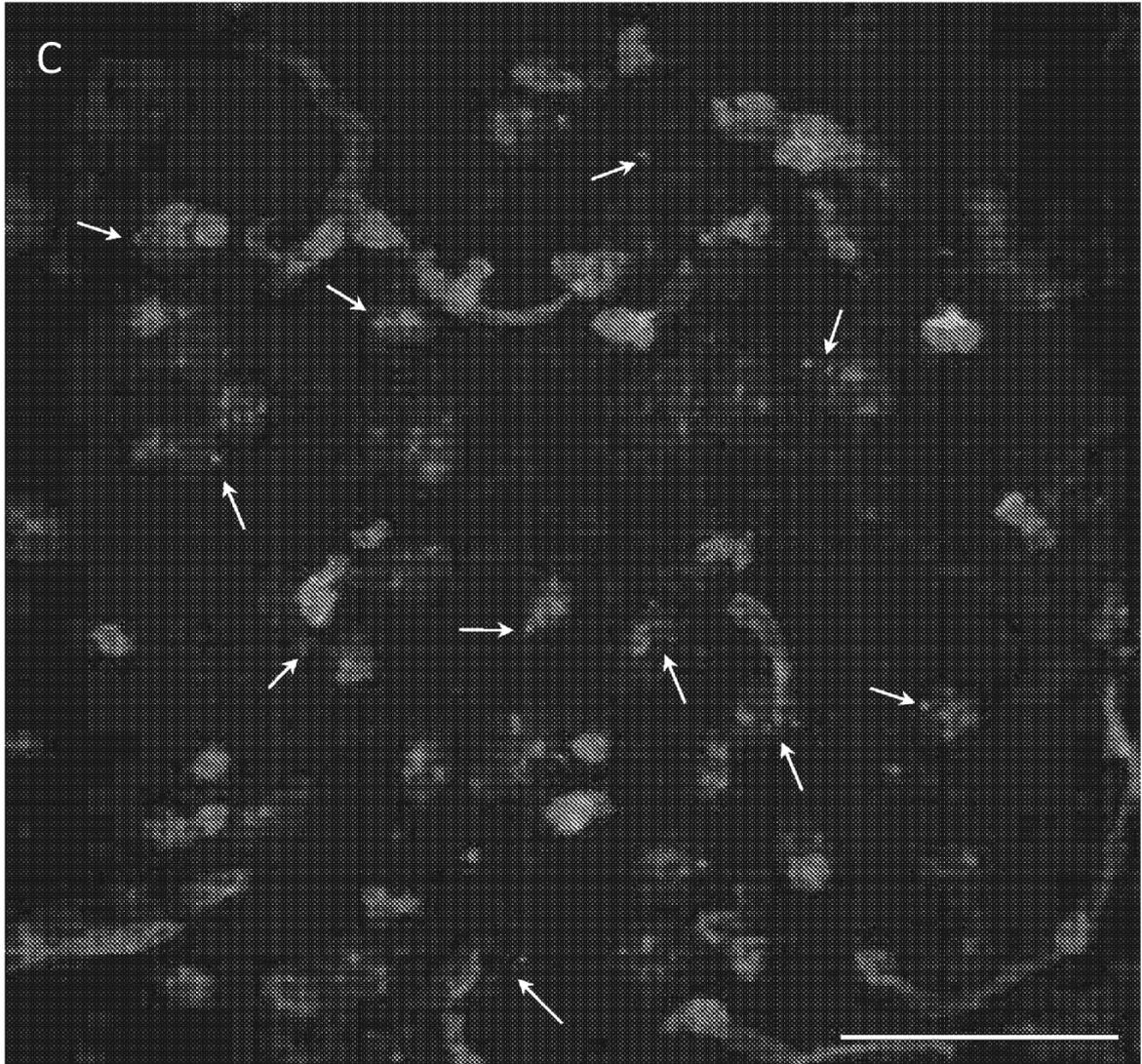


Figura 13