

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 903 257**

51 Int. Cl.:

C07K 16/46 (2006.01)
A61K 39/395 (2006.01)
A61P 35/00 (2006.01)
C12N 15/09 (2006.01)
C07K 16/10 (2006.01)
C07K 14/64 (2006.01)
A61P 11/00 (2006.01)
A61P 13/12 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **09.12.2016** **PCT/US2016/065779**

87 Fecha y número de publicación internacional: **15.06.2017** **WO17100540**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **09.12.2016** **E 16873899 (5)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **20.10.2021** **EP 3387019**

54 Título: **Proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina y métodos de uso**

30 Prioridad:

09.12.2015 US 201562265344 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
31.03.2022

73 Titular/es:

THE SCRIPPS RESEARCH INSTITUTE (100.0%)
10550 North Torrey Pines Road
La Jolla, CA 92037 , US

72 Inventor/es:

WANG, FENG;
LIU, YAN;
WANG, YING;
FU, GUANGSEN y
SCHULTZ, PETER G.

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 903 257 T3

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

DESCRIPCIÓN

Proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina y métodos de uso

5 ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

[0001] La relaxina se expresa principalmente en el cuerpo lúteo, tanto en hembras gestantes como no gestantes, elevándose a un pico dentro de aproximadamente 14 días de ovulación y luego disminuyendo en ausencia de embarazo, dando como resultado la menstruación. Durante el primer trimestre del embarazo, los niveles aumentan y la decidua produce más relaxina. La expresión de relaxina alcanza su punto máximo durante las 14 semanas del primer trimestre y en el momento del parto. Se sabe que media los cambios hemodinámicos que ocurren durante el embarazo, como aumento del gasto cardíaco, aumento del flujo sanguíneo renal y aumento de la distensibilidad arterial. También relaja otros ligamentos pélvicos y suaviza la sínfisis púbica. En los hombres, la relaxina mejora la motilidad de los espermatozoides en el semen.

[0002] Fuera del sistema reproductivo, la relaxina afecta el metabolismo del colágeno, inhibiendo la síntesis de colágeno y la mejora de su descomposición mediante el aumento de metaloproteinasas de la matriz. La relaxina también mejora la angiogénesis y es un potente vasodilatador renal.

[0003] La relaxina interactúa con el receptor de relaxina LGR7 (RXFP1) y LGR8 (RXFP2), que pertenecen a la superfamilia de receptores acoplados a proteínas G. Se han encontrado receptores de relaxina en el corazón, el músculo liso, el tejido conectivo y el sistema nervioso central y autónomo.

[0004] El documento WO 2015/006744 describe proteínas de fusión de inmunoglobulina y composiciones de las mismas. El documento WO 02/43660 describe métodos de administración/dosificación de anticuerpos anti-VSR para profilaxis y tratamiento. Wu y col., Journal of Molecular Biology, vol. 368, n.º 3, 6 de abril de 2007, páginas 652-665, describe el desarrollo de motavizumab, un anticuerpo ultrapotente para la prevención de la infección por virus sincitial respiratorio en el tracto respiratorio superior e inferior. Wu y col., Journal of Molecular Biology, vol. 350, N.º 1, 1 de julio de 2005, páginas 126-144, describe anticuerpos ultrapotentes contra el virus sincitial respiratorio: efectos de la cinética de unión y la valencia de unión sobre la neutralización viral. AU 2012 211 451 describe anticuerpos recombinantes de alta potencia y métodos para producirlos.

RESUMEN DE LA INVENCIÓN

[0005] La invención proporciona una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un péptido terapéutico conectado a un dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado configurado para tener una unión reducida al antígeno VSR-F en comparación con un dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado; donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona de SEQ ID NOS: 79 y 80, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 donde la cadena CDR3 comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91; y en donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13, y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9. Otras realizaciones de la invención se definen en las reivindicaciones.

[0006] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina y lo mismo para usos en el tratamiento de diversas enfermedades y condiciones se describen también. La enfermedad o afección puede ser aguda, por ejemplo, insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo con disfunción cardíaca, isquemia reperusión asociada con trasplante de órganos sólidos, derivación cardiopulmonar, accidente cerebrovascular isquémico o preeclampsia. La enfermedad o afección puede ser crónica, por ejemplo, esclerodermia difusa, insuficiencia cardíaca crónica, nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca y cicatrización de heridas diabéticas. Los métodos y composiciones también pueden usarse para mejorar el suministro de un péptido de relaxina a células, tejidos o tumores diana.

[0007] El péptido terapéutico puede ser un péptido de relaxina terapéutico que comprende una cadena de relaxina B conectada a través de un enlazador peptídico a una cadena de relaxina A; en donde el péptido terapéutico de relaxina está conectado al extremo amino del dominio variable del anticuerpo con un péptido de conexión. En algunas formas de realización, la cadena B de relaxina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 46. En algunas formas de realización, la cadena A de relaxina comprende una secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47. En algunas formas de realización, el enlazador peptídico comprende al menos aproximadamente 4 aminoácidos consecutivos que comprenden cualquier combinación de aminoácidos G y S. En algunas formas de realización, el péptido de conexión comprende al menos aproximadamente 4 aminoácidos consecutivos que comprenden cualquier combinación de aminoácidos G y S. En algunas formas de realización, la composición comprende además una región Fc de un anticuerpo y la región Fc comprende una o más mutaciones para reducir la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo. En algunas formas de realización, la región Fc comprende una secuencia de aminoácidos al menos aproximadamente 90% idéntica a SEQ ID NO: 98.

[0008] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en métodos de tratamiento de una enfermedad o

afección en un individuo en necesidad de la misma. En algunas formas de realización, el método comprende administrar al individuo una composición que comprende un péptido terapéutico de relaxina; en donde la composición se administra por vía intravenosa o subcutánea en menos de o igual a 6 horas. En algunas formas de realización, la composición se administra en menos de o igual a 4, 3, 2 o 1 horas. En algunas formas de realización, la composición se administra durante un período de tratamiento de aproximadamente un día a aproximadamente 1 semana. En algunas formas de realización, la composición se administra aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 veces. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección se selecciona de insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo con disfunción cardíaca, isquemia reperfusión asociada con trasplante de órganos sólidos, derivación cardiopulmonar, accidente cerebrovascular isquémico o preeclampsia. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es un trasplante de órganos sólidos y el órgano se selecciona de pulmón, riñón, hígado y corazón. En algunas formas de realización, la composición se administra durante un período de tratamiento que dura al menos aproximadamente una semana. En algunas formas de realización, la composición se administra dos veces por semana, una vez por semana, cuatro veces al mes, tres veces al mes, dos veces al mes, una vez al mes o una vez cada dos meses. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección se selecciona entre esclerodermia difusa, insuficiencia cardíaca crónica, nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca y curación de heridas diabéticas.

[0009] En algunas formas de realización, el método comprende administrar una composición al individuo, que comprende un péptido de relaxina terapéutico; en donde la composición se administra al ojo. En algunas formas de realización, la composición se administra en una solución o suspensión líquida.

[0010] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en métodos de tratamiento de la enfermedad cardiovascular en un individuo en necesidad de la misma, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina descrita en este documento para reducir al menos un síntoma de la enfermedad cardiovascular. En algunas formas de realización, la enfermedad cardiovascular se selecciona de uno o más del grupo que consiste en insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricuspídea, insuficiencia tricuspídea, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar asociada, estenosis pulmonar con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos del almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica, fibrosis del corazón, trastornos tromboembólicos, daño por repetición después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardíaca en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, protección cardíaca en relación con angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, síndrome metabólico, dislipemia, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad e hipercolesterolemia. En algunas formas de realización, la enfermedad cardiovascular es insuficiencia cardíaca. En algunas formas de realización, el síntoma se selecciona de uno o más del grupo que consiste en dolor de pecho, dificultad para respirar, dolor, entumecimiento, debilidad, pulso rápido, pulso lento, aturdimiento, mareo, hinchazón de las extremidades y desmayo.

[0011] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en métodos de tratamiento de la fibrosis en un individuo en necesidad del mismo, que comprende administrar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina proporcionada en este documento suficiente para reducir al menos un síntoma de la fibrosis. En algunas formas de realización, la fibrosis se selecciona de uno o más del grupo que consiste en fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, cirrosis, fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren y capsulitis adhesiva. También se proporciona en el presente documento una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina para su uso en métodos de tratamiento de insuficiencia cardíaca aguda, síndrome coronario agudo con disfunción cardíaca, isquemia reperfusión asociada con trasplante de órganos sólidos, derivación cardiopulmonar, accidente cerebrovascular isquémico, preeclampsia, esclerodermia difusa, insuficiencia cardíaca crónica, nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca, cicatrización de heridas diabéticas o una combinación de las mismas, mediante la administración de una cantidad eficaz de una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina proporcionada en el presente documento.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LOS DIBUJOS

[0012] El resumen anterior, así como la siguiente descripción detallada de la divulgación, se entenderán mejor cuando se lean junto con las figuras adjuntas. Debe entenderse, sin embargo, que la divulgación no se limita a los ejemplos precisos mostrados. Se enfatiza que, de acuerdo con la práctica común, las diversas características de los dibujos no están a

escala. Por el contrario, las dimensiones de las diversas características se amplían o reducen arbitrariamente para mayor claridad. En los dibujos se incluyen las siguientes figuras.

FIG. 1A, FIG. 1B y FIG. 1C muestran geles SDS-PAGE de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina purificadas.

FIG. 2A, FIG. 2B y FIG. 2C representan gráficos de las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

FIG. 3A y FIG. 3B representan gráficos del ensayo de unión de proteína de fusión de palivizumab-relaxina/epítipo de VSR.

FIG. 4 muestra la unión de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina al VSR.

FIG. 5A, FIG. 5B, FIG. 5C, FIG. 5D, la FIG. 5E y FIG. 5F muestran geles SDS-PAGE de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina purificadas.

FIG. 6A, FIG. 6B, FIG. 6C, FIG. 6D, FIG. 6E y FIG. 6F muestran gráficos de las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

FIG. 7A y FIG. 7B muestran gráficos de las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

FIG. 8A y FIG. 8B muestran la caracterización de proteínas de la proteína de fusión de palivizumab-relaxina RLX303.

FIG. 9A, FIG. 9B y FIG. 9C muestran la estabilidad sérica del péptido de relaxina-2 y las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina RLX302 y RLX303.

FIG. 10 muestra el análisis farmacocinético en ratón de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

FIG. 11A y FIG. 11B muestran el análisis farmacocinético de ratas de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

FIG. 12A y FIG. 12B muestran el análisis farmacodinámico de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCION

[0013] La invención proporciona una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un péptido terapéutico conectado a un dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado configurado para tener una unión reducida al antígeno VSR-F en comparación con un dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado; donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona de SEQ ID NO: 79 y 80, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 donde la la cadena CDR3 comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91; y en donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado comprende la región variable de la cadena pesada de la SEQ ID NO: 13, y la región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9. El dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado puede comprender la SEQ ID NO: 79. El dominio de unión al antígeno palivizumab puede comprender SEQ ID NO: 80. La secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91 puede comprender al menos 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 91. La secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91 puede comprender al menos 6 aminoácidos de SEQ ID NO: 91. La secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91 puede comprender al menos 7 aminoácidos de SEQ ID NO: 91. La secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91 puede comprender al menos 8 aminoácidos de la SEQ ID NO: 91. El dominio modificado antígeno palivizumab de unión puede comprender SEQ ID NO: 91.

[0014] Las fusiones de palivizumab amino-terminal de relaxina con unión reducida a las proteínas del virus sincitial respiratorio (VSR) que tienen un péptido de relaxina fusionado al extremo amino de un polipéptido de cadena pesada de palivizumab son útiles en el tratamiento de enfermedades que responden al péptido de relaxina. La reducción de la unión a las proteínas del VSR se logra mediante la mutación de residuos de aminoácidos en las porciones de CDR de la secuencia de aminoácidos de palivizumab. Se obtiene un valor terapéutico adicional reduciendo la ADCC provocada por el palivizumab mediante la mutación de residuos de aminoácidos en la porción Fc de la secuencia de aminoácidos de palivizumab.

[0015] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser una proteína de fusión de inmunoglobulina amino-terminal, que comprende un péptido de relaxina, y también se describen usos de la misma para el tratamiento de una enfermedad o afección sensible a un péptido de relaxina. Según una característica del tema descrito en el presente documento, una proteína de fusión de inmunoglobulina amino-terminal comprende (a) una primera región de inmunoglobulina; y (b) un péptido de relaxina conectado al extremo amino de la primera región de inmunoglobulina con un péptido de conexión. La primera región de inmunoglobulina puede ser parte de una cadena pesada de inmunoglobulina y la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende además una segunda región de inmunoglobulina de una cadena ligera de inmunoglobulina. Como se usa en el presente documento, una región de inmunoglobulina puede incluir un dominio variable de manera que el péptido de relaxina esté conectado al extremo amino de un dominio variable de la región de inmunoglobulina. La primera y/o segunda región de inmunoglobulina puede comprender parte de un dominio variable de anticuerpo que no forma un sitio de unión específico para un antígeno humano. El dominio variable del anticuerpo es un dominio variable modificado a partir de un dominio variable de palivizumab. El dominio variable se modifica de palivizumab para atenuar o eliminar la unión del VSR.

[0016] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina amino-terminal ejemplares se representan en las Fórmulas I-XXXII, en donde T es un péptido terapéutico o una porción de un péptido terapéutico, C es un péptido de conexión, A es una región

de inmunoglobulina, P es un sitio proteasa, L es un enlazador e I es un enlazador interno. El péptido terapéutico puede ser un péptido de relaxina que comprende una o una combinación de cadena B de relaxina, cadena A de relaxina y péptido C o péptido enlazador.

Fórmula	Proteína de fusión de inmunoglobulina
I	T ¹ -A ¹
II	T ¹ -C-A ¹
III	T ¹ -C-P ¹ -A ¹
IV	T ¹ -P ¹ -C-A ¹
V	T ¹ -L ¹ -I-L ² -T ² -A ¹
VI	T ¹ -L ¹ -I-L ² -T ² -C-A ¹
VII	T ¹ -L ¹ -T ² -L ² -T ³ -A ¹
VIII	T ¹ -L ¹ -T ² -L ² -T ³ -C-A ¹
IX	T ¹ -P ¹ -I-L ² -T ² -A ¹
X	T ¹ -P ¹ -I-P ² -T ² -C-A ¹
XI	T ¹ -P ¹ -T ² -P ² -T ³ -A ¹
XII	T ¹ -P ¹ -T ² -P ² -T ³ -C-A ¹
XIII	T ¹ -P ¹ -L ¹ -I-L ² -P ² -T ² -A ¹
XIV	T ¹ -P ¹ -L ¹ -I-L ² -P ² -T ² -C-A ¹
XV	T ¹ -P ¹ -L ¹ -T ² -L ² -P ² -T ³ -A ¹
XVI	T ¹ -P ¹ -L ¹ -T ² -L ² -P ² -T ³ -C-A ¹
XVII	T ¹ -L ¹ -P ¹ -T ² -A ¹
XVIII	T ¹ -P ¹ -L ¹ -T ² -A ¹
XIX	T ¹ -P ¹ -L ¹ -T ² -C-A ¹
XX	T ¹ -P ¹ -I-P ² -P ³ -T ² -A ¹
XXI	T ¹ -P ¹ -P ² -P ³ -T ² -A ¹
XXII	T ¹ -P ¹ -I-T ² -A ¹
XXIII	T ¹ -P ¹ -I-T ² -C-A ¹
XXIV	T ¹ -P ¹ -L-P ² -P ³ -T ² -A ¹
XXV	T ¹ -P ¹ -L-P ² -P ³ -T ² -C-A ¹
XXVI	T ¹ -P ¹ -T ² -P ² -P ³ -T ³ -A ¹
XXVII	T ¹ -P ¹ -T ² -P ² -P ³ -T ³ -C-A ¹
XXVIII	T ¹ -L-T ² -A ¹
XXIX	T ¹ -L-T ² -C-A ¹
XXX	T ¹ -I-T ² -A ¹
XXXI	T ¹ -I-T ² -CA ¹
XXXII	T ¹ -P-T ² -C-A ¹

[0017] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en métodos de tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto en necesidad del mismo. Generalmente, el método comprende administrar al sujeto una proteína de fusión de inmunoglobulina amino-terminal que comprende un péptido terapéutico tal como un péptido de relaxina unido al terminal amino de una región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, una proteína de fusión de inmunoglobulina que tiene la fórmula I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI, XXXII, o cualquier modificación, parte o adición de las mismas, dentro de los límites de las reivindicaciones, se administra a un paciente. En algunas formas de realización, una o más de las proteínas de fusión de inmunoglobulinas I, II, III, IV, V, VI, VII, VIII, IX, X, XI, XII, XIII, XIV, XV, XVI, XVII, XVIII, XIX, XX, XXI, XXII, XXIII, XXIV, XXV, XXVI, XXVII, XXVIII, XXIX, XXX, XXXI o XXXII, que además comprenden una segunda región de inmunoglobulina, se administra a un paciente.

[0018] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en métodos para mejorar la administración de un péptido terapéutico. Los métodos pueden implicar la generación de una proteína de fusión de inmunoglobulina amino-terminal a partir de una construcción genética. La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede producir de forma recombinante a partir de una construcción genética que codifica la proteína de fusión de inmunoglobulina. La construcción puede expresarse in vitro usando técnicas estándar de cultivo de células de mamífero. Una construcción que codifica un péptido terapéutico conectado al extremo amino de una primera región de inmunoglobulina puede coexpresarse con una segunda construcción que comprende una segunda región de inmunoglobulina, para producir una proteína de fusión de inmunoglobulina recombinante. Una construcción que codifica una proteasa puede coexpresarse con una proteína de fusión de inmunoglobulina. El método puede comprender además generar construcciones de fusión genética de inmunoglobulina que comprenden uno o más péptidos de conexión, enlazadores internos, enlazadores y/o sitios de escisión proteolítica.

[0019] Se exponen ejemplos a fin de proporcionar a los expertos ordinarios en la técnica una divulgación y descripción de cómo hacer y usar las proteínas de fusión de inmunoglobulina proporcionadas en este documento, y no se pretende

representar que los experimentos proporcionados abarcan la totalidad de la experimentos realizados. Se han realizado esfuerzos para garantizar la precisión con respecto a los números utilizados, pero deben tenerse en cuenta algunos errores y desviaciones experimentales.

5 **[0020]** Cuando se proporciona un intervalo de valores, se entiende que cada valor intermedio, hasta la décima de la unidad del límite inferior a menos que el contexto claramente dicte otra cosa, entre los límites superior e inferior de ese rango también se describe específicamente. Cada rango más pequeño entre cualquier valor establecido o valor intermedio en un rango establecido y cualquier otro valor establecido o intermedio en ese rango establecido está incluido dentro de la invención. Los límites superior e inferior de estos rangos más pequeños pueden incluirse o excluirse de forma independiente en el rango, y cada rango en donde ninguno o ambos límites están incluidos en los rangos más pequeños también se incluye dentro de la invención, sujeto a cualquier límite específicamente excluido en el rango indicado. Cuando el rango indicado incluye uno o ambos límites, los rangos que excluyen uno o ambos de los límites incluidos también se incluyen en la invención.

15 **[0021]** A menos que se defina lo contrario, todos los términos técnicos y científicos usados en este documento tienen el mismo significado que se entiende comúnmente por un experto ordinario en la técnica a la que pertenece esta invención.

20 **[0022]** Como será evidente para los expertos en la técnica al leer esta descripción, cada una de las formas de realización individuales descrita e ilustrada aquí tiene componentes y características discretas que pueden separarse fácilmente a partir de o combinándose con las características de cualquiera de las otras varias formas de realización. Cualquier método enumerado puede llevarse a cabo en el orden de los eventos enumerados o en cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Cualquier combinación citada de secuencias de aminoácidos puede tener el orden citado, o cualquier otro orden que sea lógicamente posible. Como ejemplo no limitante, una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un péptido terapéutico de insulina, T, y una región de inmunoglobulina, A, incluye, por ejemplo y sin limitación: T-A, A-T, T-A-T y A-T-A.

30 **[0023]** Hay que señalar que, como se usa aquí y en las reivindicaciones adjuntas, las formas singulares "un", "una", "el" y "ella" incluyen referentes plurales a menos que el contexto claramente dicte otra cosa. Así, por ejemplo, la referencia a "una célula" incluye una pluralidad de tales células y la referencia al "péptido" incluye la referencia a uno o más péptidos y equivalentes de los mismos, por ejemplo polipéptidos, conocidos por los expertos en la técnica, y así sucesivamente.

35 **[0024]** Los términos "homólogo", "homología" o "porcentaje de homología", cuando se usan en el presente documento para describir una secuencia de aminoácidos o una secuencia de ácido nucleico, con respecto a una secuencia de referencia, pueden determinarse utilizando la fórmula descrita por Karlin y Altschul (Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 87: 2264-2268, 1990, modificada como en Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU. 90: 5873-5877, 1993). Dicha fórmula se incorpora en los programas de la herramienta de búsqueda de alineación local básica (BLAST) de Altschul et al. (J. Mol. Biol. 215: 403 - 410, 1990). El porcentaje de homología de secuencias se puede determinar utilizando la versión más reciente de BLAST, a partir de la fecha de presentación de esta solicitud.

40 **Proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina**

45 **[0025]** Varias proteínas de fusión de inmunoglobulina de insulina descritas en este documento comprenden una primera región de inmunoglobulina y un péptido terapéutico de relaxina, en donde el péptido terapéutico de relaxina, o una secuencia de aminoácidos del mismo, está conectado a un extremo amino de la primera región de inmunoglobulina. En varios casos, las proteínas de fusión de insulina inmunoglobulina comprenden además una segunda región de inmunoglobulina. La región de inmunoglobulina (primera y/o segunda) puede ser cualquier porción, en parte o en su totalidad, de una inmunoglobulina, dentro de los límites de las reivindicaciones.

50 **[0026]** La inmunoglobulina puede derivar de cualquier tipo conocido para un experto en la técnica incluyendo, pero no limitado a IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, IgY, IGW. La región de inmunoglobulina puede ser una glicoproteína. La región de inmunoglobulina puede comprender una o más unidades funcionales, que incluyen, pero no se limitan a 1, 2, 3, 4 y 5 unidades. La región de inmunoglobulina puede comprender una o más unidades conectadas por uno o más enlaces disulfuro. La región de inmunoglobulina puede comprender una o más unidades conectadas por un péptido enlazador, por ejemplo, una inmunoglobulina scFv. La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina recombinante que incluye inmunoglobulinas con mutaciones, sustituciones y/o delecciones de aminoácidos. La inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina recombinante que comprende modificaciones químicas. La inmunoglobulina es una proteína de fusión que comprende un péptido terapéutico conectado a un dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado, que se define en las reivindicaciones.

60 **[0027]** La fusión de cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que se basa en o se deriva de SEQ ID NO: 13. De acuerdo con la invención, el dominio de unión al antígeno palivizumab modificado comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 en donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona de las SEQ ID NO: 79 y 80. Las secuencias ejemplares son las SEQ ID NO: 14, 16, 20 y 22. La cadena ligera de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que se basa o deriva de la SEQ ID NO: 9. De acuerdo con la invención, el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 en donde la CDR3 de cadena ligera comprende en al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ

ID NO: 91. Secuencias de ejemplo son SEQ ID NO: 9-12.

[0028] La fusión de cadena pesada de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NOs: 5-8, 17-19.

[0029] La fusión de cadena pesada de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que comprende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos basada en o derivada de cualquiera de las SEQ ID NO: 5-8, 17-19.

Proteínas de fusión de inmunoglobulina

[0030] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender (a) una fusión de cadena ligera de inmunoglobulina, y (b) una segunda región de inmunoglobulina derivada de una cadena de inmunoglobulina pesada, dentro de los límites de las reivindicaciones, en donde la fusión de cadena ligera de inmunoglobulina está conectada a la segunda región de inmunoglobulina por uno o más enlaces disulfuro o un péptido de conexión. La fusión de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al aminotérmino de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena ligera de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la segunda región de inmunoglobulina se une a una región que no es de inmunoglobulina, creando una segunda fusión de inmunoglobulina. La región no inmunoglobulina puede comprender un segundo péptido terapéutico. La región no inmunoglobulina puede comprender un péptido enlazador. La región que no es de inmunoglobulina puede comprender un sitio de escisión proteolítica. El segundo péptido terapéutico puede comprender un enlazador interno. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une al extremo amino o carboxilo terminal de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a uno o más aminoácidos internos de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a los aminoácidos de una porción de bucle dentro de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une a la segunda región de inmunoglobulina usando uno o más péptidos enlazadores. La fusión de la cadena ligera de inmunoglobulina puede comprender además uno o más péptidos terapéuticos adicionales.

[0031] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender (a) una fusión de cadena pesada de inmunoglobulina, y (b) una segunda región de inmunoglobulina derivada de una cadena ligera de inmunoglobulina, dentro de los límites de las reivindicaciones, en donde la fusión de cadena pesada de inmunoglobulina está conectada a la segunda región de inmunoglobulina por uno o más enlaces disulfuro o un péptido de conexión. La fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al extremo amino de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la segunda región de inmunoglobulina se une a una región que no es de inmunoglobulina, creando una segunda fusión de inmunoglobulina. La región no inmunoglobulina puede comprender un segundo péptido terapéutico. La región no inmunoglobulina puede comprender un péptido enlazador. La región que no es de inmunoglobulina puede comprender un sitio de escisión proteolítica. El segundo péptido terapéutico puede comprender un enlazador interno. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une al extremo amino o carboxilo terminal de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a uno o más aminoácidos internos de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a los aminoácidos de una porción de bucle dentro de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une a la segunda región de inmunoglobulina usando uno o más péptidos enlazadores. La fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender además uno o más péptidos terapéuticos adicionales.

[0032] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender (a) una fusión de cadena ligera de inmunoglobulina, y (b) una fusión de cadena pesada de inmunoglobulina, en los límites de las reivindicaciones. La fusión de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al extremo amino de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena ligera de inmunoglobulina. La fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al extremo amino de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la fusión de la cadena ligera de inmunoglobulina comprende además uno o más péptidos terapéuticos adicionales. En algunas formas de realización, la fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina comprende uno o más péptidos terapéuticos adicionales.

[0033] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender (a) una fusión de inmunoglobulina de la cadena ligera, y (b) una segunda región de inmunoglobulina, dentro de los límites de las reivindicaciones, en donde la fusión de cadena ligera de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al amino-terminal de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena ligera de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede derivarse de una cadena pesada de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede derivarse de una cadena ligera de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede estar conectada a una o más regiones que no son de inmunoglobulina, creando una segunda fusión de inmunoglobulina. La región no inmunoglobulina puede comprender un segundo péptido terapéutico. La región no inmunoglobulina puede comprender un péptido enlazador. La región que no es de inmunoglobulina puede comprender un sitio de escisión proteolítica. El segundo péptido terapéutico puede comprender un enlazador interno. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se

une al extremo amino o carboxilo terminal de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a uno o más aminoácidos internos de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a los aminoácidos de una porción de bucle dentro de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une a la segunda región de inmunoglobulina usando uno o más péptidos enlazadores. La fusión de la cadena ligera de inmunoglobulina puede comprender además uno o más péptidos terapéuticos adicionales.

[0034] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender (a) una fusión de cadena pesada de inmunoglobulina, y (b) una segunda región de inmunoglobulina, dentro de los límites de las reivindicaciones, en donde la fusión de cadena pesada de inmunoglobulina comprende un primer péptido terapéutico conectado al extremo amino de una primera región de inmunoglobulina derivada de una cadena pesada de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede derivarse de una cadena pesada de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede derivarse de una cadena ligera de inmunoglobulina. La segunda región de inmunoglobulina puede estar conectada a una o más regiones que no son de inmunoglobulina, creando una segunda fusión de inmunoglobulina. La región no de inmunoglobulina puede comprender un segundo péptido terapéutico. La región no de inmunoglobulina puede comprender un péptido enlazador. La región no de inmunoglobulina puede comprender un sitio de escisión proteolítica. El segundo péptido terapéutico puede comprender un enlazador interno. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une al extremo amino o carboxilo terminal de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a uno o más aminoácidos internos de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el segundo péptido terapéutico se une a los aminoácidos de una porción de bucle dentro de la segunda región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une a la segunda región de inmunoglobulina usando uno o más péptidos enlazadores. La fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender además uno o más péptidos terapéuticos adicionales.

[0035] En una característica de la invención, la proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender un péptido de relaxina terapéutico conectado a amino-terminal de una región de una cadena de inmunoglobulina pesada, dentro de los límites de las reivindicaciones, en donde la fusión de inmunoglobulina se denomina aquí como una fusión de cadena pesada de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina comprende además una o más regiones de una cadena ligera de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones, donde la fusión de la cadena pesada de inmunoglobulina está conectada a una o más regiones de una cadena ligera de inmunoglobulina mediante enlaces disulfuro o un péptido de conexión. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una cadena B de relaxina y una cadena A de relaxina. Las cadenas de relaxina B y relaxina A pueden estar conectadas por un péptido enlazador. El péptido enlazador puede comprender un sitio de escisión de proteasa.

[0036] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NOS: 17-19.

[0037] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de SEQ ID NO: 19. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser codificada por una secuencia de nucleótidos que es 100% idéntica a las SEQ ID NO: 19.

[0038] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que comprende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más nucleótidos basados o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 17-19. Los nucleótidos pueden ser consecutivos. Alternativa o adicionalmente, los nucleótidos no son consecutivos.

[0039] También se describen en el presente documento construcciones de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de una cualquiera de SEQ ID NOS: 17-19. La construcción de nucleótidos puede ser un plásmido para expresión en una célula huésped. Por ejemplo, un plásmido de expresión de mamífero o bacteriano.

[0040] Se describen además en el presente documento construcciones de nucleótidos que comprenden una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de la SEQ ID NO: 19. La construcción de nucleótidos puede ser un plásmido para la expresión en una célula huésped. Por ejemplo, un plásmido de expresión de mamífero o bacteriano.

[0041] La región de una cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a SEQ ID NOS: 20 o 22. La región de una cadena ligera de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a la SEQ ID NO: 9-12.

[0042] La región de una cadena pesada de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a SEQ ID NO: 22. La región de una cadena ligera de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a la SEQ ID NO: 12.

[0043] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender (a) una región de una cadena de inmunoglobulina pesada codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID NOS: 5-8, 17-19; y (b) una región de una cadena ligera de inmunoglobulina codificada por una secuencia de nucleótidos de SEQ ID

NO: 1-4.

[0044] En algunas formas de realización, proporcionadas en este documento son proteínas de fusión de inmunoglobulina relaxina, dentro de los límites de las reivindicaciones. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina comprenden una región de cadena ligera y/o cadena pesada de inmunoglobulina fusionada en el extremo amino con una relaxina o un péptido derivado de relaxina, que incluye relaxinas que tienen enlaces internos. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina comprenden además una segunda cadena ligera y/o cadena pesada de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, una proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina se refiere a una primera cadena de inmunoglobulina que comprende un péptido de relaxina amino-terminal o derivado del mismo y una segunda cadena de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la primera proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina se coexpresa con la segunda cadena de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende SEQ ID NO: 20 o 22 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende una cualquiera o más de SEQ ID NO: 9-12. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina de relaxina comprende una cadena pesada que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 22 y una cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos que comprende la SEQ ID NO: 12. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina son configuradas para tratar una enfermedad o afección del corazón. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina son para uso en el tratamiento de una enfermedad o condición, incluyendo insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca, enfermedad de la arteria coronaria, la reperfusión de isquemia asociada con trasplante de órganos sólidos (p. ej., pulmón, riñón, hígado, corazón), derivación cardiopulmonar para protección de órganos (p. ej., renal), accidente cerebrovascular isquémico, curación corneal (administración ocular), nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, curación diabética, esclerosis sistémica, maduración cervical en el momento del parto, preeclampsia, hipertensión portal, fibrosis, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperfusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias como infarto de miocardio, accidente cerebrovascular y ataques isquémicos transitorios para cardioprotección en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias (injerto de derivación de arterias coronarias, CABG), angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, y para la protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos. Se proporcionan además los compuestos de la presente divulgación para su uso en la profilaxis y/o el tratamiento de trastornos respiratorios, tales como, por ejemplo, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (bronquitis crónica, EPOC), enfermedad pulmonar intersticial, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, y combinaciones de las mismas. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina están configuradas para tratar una enfermedad o afección del riñón. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina se utilizan en el tratamiento de una enfermedad o afección que incluye enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica, incluidas las etapas aguda y crónica de insuficiencia renal con y sin necesidad de diálisis, así como las enfermedades renales subyacentes o relacionadas tales como hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, primaria, secundaria, así como glomerulonefritis aguda y crónica, membranosa y glomerulonefritis membranoproliferativa, síndrome de Alport, glomeruloesclerosis, enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, tales como enfermedades renales primarias y congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas como rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, así como enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, diabetes y enfermedades renales no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, que se caracterizan y se asocian diagnósticamente con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de las enzimas renales, como la glutamilsintetasa, osmolaridad y volumen urinario, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia, necesidad de diálisis, carcinomas renales, tras resección incompleta del riñón, deshidratación tras uso excesivo de diuréticos, aumento descontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, así como enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, como Lupus eritematoso y enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, así como estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, acidosis tubular renal y combinaciones de los mismos. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina están configuradas para tratar una enfermedad o afección del pulmón. En algunas formas de realización, las proteínas de fusión de inmunoglobulina de relaxina se utilizan en el tratamiento de una enfermedad o afección que incluye trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP) y otras formas de hipertensión pulmonar (HP) que incluyen enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolias (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar (por ejemplo, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo), fibrosis quística (FQ) y combinaciones de los mismos.

Región de inmunoglobulina

[0045] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en el presente documento comprenden una o más regiones de inmunoglobulina. Las regiones de inmunoglobulina pueden comprender un dominio de unión a antígeno, en donde el dominio de unión a antígeno no es específico para un antígeno humano. La región de inmunoglobulina se modifica a partir de un anticuerpo de palivizumab. La modificación puede incluir una o más mutaciones, inserciones o deleciones de aminoácidos en una o más CDR del anticuerpo de palivizumab. Según la invención, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 en donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona entre SEQ ID NOs: 79 y 80.

[0046] La región de inmunoglobulina comprende al menos una porción de una cadena pesada de inmunoglobulina. La cadena pesada de inmunoglobulina comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 en donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona de SEQ ID NO: 79 y 80. Las secuencias ejemplares son SEQ ID NO: 14 o 16. La cadena pesada de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos basada o derivada de las SEQ ID NO: 5-8.

[0047] La región de inmunoglobulina comprende al menos una porción de una cadena ligera de inmunoglobulina. La cadena ligera de inmunoglobulina comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 en donde la CDR3 de cadena ligera comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91. Las secuencias ejemplares son las SEQ ID NO: 9-12.

[0048] La cadena ligera de inmunoglobulina puede ser codificada por una secuencia de nucleótidos basada en o derivada de SEQ ID NOs: 1-4.

[0049] La región de inmunoglobulina puede comprender al menos una porción de un dominio constante. La región de inmunoglobulina puede comprender uno o más dominios constantes o porciones de los mismos. La región de inmunoglobulina puede comprender 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más dominios constantes o porciones de los mismos. La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 120, 140, 160, 180, 200, 225, 250, 275, 300, 350, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000, 1200, 1400 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia de aminoácidos de uno o más dominios constantes. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Los aminoácidos pueden ser no consecutivos.

[0050] La región de inmunoglobulina comprende una cadena pesada CDR1 que tiene la SEQ ID NO: 72. La región de inmunoglobulina comprende una cadena pesada CDR2 que tiene la SEQ ID NO: 73. La región de inmunoglobulina comprende una cadena pesada CDR3 que tiene las SEQ ID NOs: 79 o 80. La región de inmunoglobulina comprende una CDR1 de cadena ligera que tiene SEQ ID NO: 89. La región de inmunoglobulina comprende una CDR2 de cadena ligera que tiene SEQ ID NO: 90. La región de inmunoglobulina comprende una CDR3 de cadena ligera que tiene una secuencia de aminoácidos basada en o derivada de SEQ ID NO: 91, que comprende específicamente al menos 4 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 91.

[0051] La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más aminoácidos basados o derivados de una secuencia de aminoácidos de una CDR. La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 3 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia de aminoácidos de una CDR. La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 5 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia de aminoácidos de una CDR. La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 10 o más aminoácidos basados en o derivados de una secuencia de aminoácidos de una CDR. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Los aminoácidos pueden ser no consecutivos. Según la invención, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región variable de la cadena ligera de la SEQ ID NO: 9 en donde la CDR3 de cadena ligera comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de la SEQ ID NO: 91.

[0052] La región de inmunoglobulina se basa en o se deriva de una inmunoglobulina de palivizumab. La región de inmunoglobulina comprende al menos una parte de una inmunoglobulina de palivizumab.

[0053] La región de inmunoglobulina comprende una secuencia de CDR basada en o derivada de una secuencia de palivizumab CDR. La región de inmunoglobulina comprende una CDR1 de cadena pesada de palivizumab que tiene la SEQ ID NO: 72. La región de inmunoglobulina comprende una CDR2 de cadena pesada de palivizumab que tiene la SEQ ID NO: 73. La región de inmunoglobulina comprende una CDR3 de cadena pesada de palivizumab mutante que tiene la SEQ ID NO: 79 u 80. La región de inmunoglobulina que tiene una CDR3 de cadena pesada de palivizumab mutante tiene una unión más reducida a VSR-F que el palivizumab de tipo salvaje. La región de inmunoglobulina comprende una CDR1 de cadena ligera de palivizumab SEQ ID NO: 89. La región de inmunoglobulina comprende una CDR2 de cadena ligera de palivizumab que tiene la SEQ ID NO: 90. La región de inmunoglobulina comprende una CDR3 de cadena ligera de palivizumab que tiene una secuencia de aminoácidos basada en o derivada de SEQ ID NO: 91. Según la invención, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 en donde la CDR3 de cadena ligera comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91. La región de inmunoglobulina puede por tanto, comprender una CDR3 de cadena ligera de palivizumab mutante que tiene cualquiera de las SEQ ID NO: 92-97. La región de inmunoglobulina que tiene una CDR3 de cadena ligera de palivizumab mutante

tiene una unión más reducida a VSR-F que el palivizumab de tipo salvaje.

[0054] La región de inmunoglobulina puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a una cualquiera de SEQ ID NOs: 10-12 o 14. La región de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que se basa en o se deriva de cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7. La región de inmunoglobulina puede estar codificada, dentro de los límites de las reivindicaciones, por una secuencia de nucleótidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% homólogo a cualquiera de las SEQ ID NO: 3-7.

Péptido terapéutico de relaxina

[0055] En un aspecto de la divulgación, se proporcionan aquí proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se definen en las reivindicaciones, que comprenden un péptido terapéutico y una región de inmunoglobulina. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender dos o más péptidos terapéuticos. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden comprender 3, 4, 5 o más péptidos terapéuticos. El péptido terapéutico puede unirse a una región de inmunoglobulina mediante un péptido de conexión. En algunas formas de realización, uno o más péptidos terapéuticos adicionales se unen a la primera o segunda región de inmunoglobulina. El uno o más péptidos terapéuticos se pueden unir a una o más regiones de inmunoglobulina. Los dos o más péptidos terapéuticos pueden unirse a dos o más regiones de inmunoglobulina. Los dos o más péptidos terapéuticos pueden unirse a una o más cadenas de inmunoglobulina. Los dos o más péptidos terapéuticos pueden unirse a dos o más cadenas de inmunoglobulina. Los dos o más péptidos terapéuticos pueden unirse a una o más unidades dentro de una o más regiones de inmunoglobulina. Los dos péptidos terapéuticos pueden unirse a dos o más unidades dentro de una o más regiones de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se conecta a la región de inmunoglobulina sin la ayuda de un péptido de conexión.

[0056] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones, comprenden uno o más agentes terapéuticos. El agente terapéutico es un péptido. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en este documento pueden comprender dos o más agentes terapéuticos. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en este documento pueden comprender 3, 4, 5, 6 o más agentes terapéuticos. Los dos o más agentes terapéuticos pueden ser iguales. Los dos o más agentes terapéuticos pueden ser diferentes.

[0057] El péptido terapéutico puede comprender cualquier estructura secundaria, por ejemplo hélice alfa o hebra beta o comprender ninguna estructura secundaria regular. El péptido terapéutico puede comprender aminoácidos con una o más modificaciones que incluyen, entre otras, miristoilación, palmitoilación, isoprenilación, glipilación, lipoilación, acilación, acetilación, alquilación, metilación, glicosilación, malonilación, hidroxilación, yodación, adición de nucleótidos, oxidación, fosforilación, adenilación, propionilación, succinilación, sulfatación, selenoilación, biotinilación, pegilación, desaminación, desamidación, eliminación y carbamilación. El péptido terapéutico puede comprender uno o más aminoácidos conjugados con una o más moléculas pequeñas, por ejemplo, un fármaco. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende uno o más aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más aminoácidos no naturales. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una o más sustituciones de aminoácidos. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50 o más sustituciones de aminoácidos.

[0058] En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico está configurada para tratar la insuficiencia cardíaca y/o fibrosis. En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico se configura para tratar la insuficiencia cardíaca y/o afecciones relacionadas con la fibrosis. En algunas formas de realización, 2, 3, 4, 5 o más regiones del péptido terapéutico están configuradas para tratar insuficiencia cardíaca y/o fibrosis. En algunas formas de realización, se configuran 2, 3, 4, 5 o más regiones del péptido terapéutico para tratar la insuficiencia cardíaca y/o afecciones relacionadas con la fibrosis. Las afecciones relacionadas con la insuficiencia cardíaca pueden incluir enfermedad cardíaca coronaria, presión arterial alta, diabetes, miocardiopatía, enfermedad de las válvulas cardíacas, arritmias, defectos cardíacos congénitos, apnea obstructiva del sueño, miocarditis, hipertiroidismo, hipotiroidismo, enfisema, hemocromatosis y amiloidosis. La insuficiencia cardíaca puede ser insuficiencia cardíaca del lado izquierdo, insuficiencia cardíaca del lado derecho, insuficiencia cardíaca sistólica e insuficiencia cardíaca diastólica. La fibrosis puede incluir, entre otros, fibrosis pulmonar, fibrosis pulmonar idiopática, fibrosis quística, cirrosis, fibrosis endomiocárdica, infarto de miocardio, fibrosis auricular, fibrosis mediastínica, mielofibrosis, fibrosis retroperitoneal, fibrosis masiva progresiva, fibrosis sistémica nefrogénica, enfermedad de Crohn, queloide, esclerodermia/esclerosis sistémica, artrofibrosis, enfermedad de Peyronie, contractura de Dupuytren y capsulitis adhesiva.

[0059] En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico comprende una secuencia de aminoácidos basada en o derivada de una secuencia de aminoácidos de un péptido de relaxina. En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico comprende una secuencia de aminoácidos basada en o derivada de una secuencia de aminoácidos de un péptido de relaxina-2.

[0060] En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico está configurada para tratar la

insuficiencia cardíaca. Dicha insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de la válvula cardíaca, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica. En algunas formas de realización, una o más regiones del péptido terapéutico está configurada para tratar enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad fibrótica, enfermedad renal, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del pulmón, corazón, riñón, médula ósea, hígado, fibrosis dermatológica, trastorno fibrótico del ojo, isquemia, enfermedad de Alzheimer, lesión de la córnea, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad fibrótica, insuficiencia, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperfusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardíaca en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, protección cardíaca en conexión con angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, trastornos respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar intersticial, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, enfermedad renal, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica con o sin necesidad de diálisis, subyacente o enfermedades renales relacionadas, hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis crónica (incluyendo primaria, secundaria o aguda), glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, síndrome de Alport, glomeruloesclerosis, enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, enfermedades renales primarias y congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas, rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, enfermedades que se caracterizan y asocian diagnósticamente con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración en la actividad de las enzimas renales que incluyen, sin limitación, glutamilsintetasa, osmolaridad y volumen de orina, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia, enfermedad que requiere diálisis para tratamiento, carcinomas renales, después de resección incompleta del riñón, deshidratación después de uso excesivo de diuréticos, aumento incontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, lupus eritematoso, enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, enfermedad renal poliquística, acidosis tubular renal, enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico, dislipemia, efectos secundarios asociados con enfermedades renales agudas y/o crónicas, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas, hiperpotasemia, hiponatremia, metabolismo óseo y de carbohidratos, enfermedades pulmonares, trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión pulmonar (HP), enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolismos (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo, fibrosis quística (FQ), trastornos fibróticos, trastornos fibróticos de los órganos internos, trastornos fibróticos del pulmón, trastornos fibróticos del corazón, trastornos fibróticos del riñón, trastornos fibróticos de la médula ósea, trastornos fibróticos del hígado, fibrosis dermatológica, trastornos oculares fibróticos, disfunción articular osteodegenerativa, vasoconstricción mediada por angiotensina II (AngII), vasoconstricción mediada por endotelina-1 (ET-1), condiciones isquémicas, isquemia asociada con infarto de miocardio isquemia asociada con heridas, patologías renales, patologías renales relacionadas con vasoconstricción, hipertensión, aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de las arterias coronarias, esclerodermia, accidente cerebrovascular, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia o hipercolesterolemia.

[0061] En algunas formas de realización, los aminoácidos del péptido terapéutico, en su totalidad o en parte, se basan en o derivan de una cualquiera de SEQ ID NOs: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 50% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 70% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un

80% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 50% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 70% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 80% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% homóloga a una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% idéntica a una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una secuencia de aminoácidos que es 100% idéntica a una secuencia de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52.

[0062] El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100 o más aminoácidos basados en o derivados de cualquiera de las SEQ ID NOs: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 125, 150, 175, 200, 225, 250, 275, 300, 325, 350, 375, 400, 425, 450, 475, 500 o más aminoácidos basados en o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 10 o más aminoácidos basados o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 50 o más aminoácidos basados o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 100 o más aminoácidos basados o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. El péptido terapéutico puede comprender una secuencia de aminoácidos que comprende 200 o más aminoácidos basados o derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. Los aminoácidos pueden ser consecutivos. Alternativa o adicionalmente, los aminoácidos no son consecutivos. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico puede comprender aminoácidos derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52 y aminoácidos no derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico puede comprender aminoácidos derivados de una o más de las SEQ ID NO: 37-52 y aminoácidos no derivados de cualquiera de las SEQ ID NO: 37-52. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende aminoácidos derivados de 1, 2, 3 o 4 de las SEQ ID NO: 37-52.

[0063] El péptido terapéutico puede comprender un sitio de escisión de la proteasa. El sitio de escisión de la proteasa puede insertarse dentro del péptido terapéutico. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una primera región peptídica terapéutica y una segunda región peptídica terapéutica. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende un sitio de escisión de proteasa dispuesto entre la primera región del péptido terapéutico y la segunda región del péptido terapéutico. En algunas formas de realización, la primera región de péptido terapéutico y la segunda región de péptido terapéutico derivan de la misma proteína o conjunto de secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, la primera región de péptidos terapéuticos y las segundas regiones de péptidos terapéuticos se derivan de diferentes proteínas o conjuntos de secuencias de aminoácidos. El uno o más sitios de escisión por proteasa se pueden unir al extremo N-terminal, al C-terminal o a ambos extremos N y C de una región de un péptido terapéutico.

[0064] El péptido terapéutico puede comprender uno o más péptidos enlazadores. El péptido terapéutico puede comprender dos o más péptidos enlazadores. El péptido terapéutico puede comprender 3, 4, 5, 6, 7 o más péptidos enlazadores. Los péptidos enlazadores pueden ser diferentes. Los péptidos enlazadores pueden ser los mismos. El péptido conector puede insertarse dentro del péptido terapéutico. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una primera región terapéutica, una segunda región terapéutica, uno o más péptidos enlazadores colocados entre la primera región terapéutica y la segunda región terapéutica. El uno o más péptidos enlazadores se pueden unir al extremo N-terminal, al C-terminal o tanto al N-terminal como al C-terminal de una región de un péptido terapéutico. En algunas formas de realización, el péptido enlazador se deriva de los aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 61-62.

[0065] El péptido terapéutico puede comprender uno o más enlazadores internos. El enlazador interno puede insertarse dentro del péptido terapéutico. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende una primera región peptídica terapéutica y una segunda región peptídica terapéutica. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico comprende un conector interno dispuesto entre la primera región del péptido terapéutico y la segunda región del péptido terapéutico. En algunas formas de realización, la primera región del péptido terapéutico y la segunda región del péptido terapéutico se derivan de la misma proteína o conjunto de secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, la primera región de péptidos terapéuticos y las segundas regiones de péptidos terapéuticos se derivan de diferentes proteínas o conjuntos de secuencias de aminoácidos. En algunas formas de realización, el enlazador interno se deriva de aminoácidos de cualquiera de las SEQ ID NO: 63-71. En algunas formas de realización, el enlazador interno comprende aminoácidos que tienen secuencias repetidas. En algunas formas de realización, el enlazador interno tiene 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más secuencias repetidas. En algunas formas de realización, el enlazador interno es poco inmunogénico. En algunas formas de realización, el enlazador interno es biodegradable.

Enlazadores y péptidos de conexión

[0066] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, las regiones de inmunoglobulina, los péptidos terapéuticos y/o las regiones que no son de inmunoglobulina pueden comprender además uno o más engarces. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, las regiones de inmunoglobulina y/o las regiones que no son de inmunoglobulina pueden comprender además 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más enlazadores.

[0067] El uno o más enlazadores están unidos al N-terminal, C-terminal o en extremos tanto N como C-terminales de un péptido terapéutico. El uno o más enlazadores están unidos al N-terminal, C-terminal o tanto N como C-terminales de un sitio de escisión proteolítica. El uno o más enlazadores pueden unirse a un péptido terapéutico, sitio de escisión proteolítica, región de inmunoglobulina, región no inmunoglobulina o una combinación de los mismos.

[0068] El uno o más enlazadores pueden comprender una secuencia de aminoácidos seleccionada de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 61-62. El uno o más enlazadores pueden comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 50% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 61-62. El uno o más enlazadores pueden comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 61-62. El uno o más enlazadores pueden comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 70% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 61-62. El uno o más enlazadores pueden comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 61-62.

[0069] En algunas formas de realización, el ligador es un ligador de conexión. El conector de conexión puede unir el péptido terapéutico a una región de inmunoglobulina. El conector de conexión puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 50% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 53-60. El enlazador de conexión puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 53-60. El enlazador de conexión puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 53-60. El conector de conexión puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente un 80% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 53-60.

[0070] En algunas formas de realización, el enlazador es un enlazador interno. El enlazador interno puede ser una parte de un péptido terapéutico. El enlazador interno puede enlazar dos regiones de un péptido terapéutico. El enlazador interno puede unir dos péptidos terapéuticos derivados de dos péptidos o proteínas diferentes. El enlazador interno puede enlazar dos péptidos terapéuticos derivados del mismo péptido o proteína. El enlazador interno puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 50% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 63-71. El enlazador interno puede comprender una secuencia de aminoácidos que sea al menos aproximadamente 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o más homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 63-71. El enlazador interno puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente 70% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 63-71. El enlazador interno puede comprender una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 80% homóloga a cualquiera de las SEQ ID NO: 63-71.

Sitio de escisión proteolítica

[0071] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se definen en las reivindicaciones, pueden comprender además uno o más sitios de escisión proteolítica. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden comprender además 2 o más sitios de escisión proteolítica. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden comprender además 3 o más sitios de escisión proteolítica. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas en el presente documento pueden comprender además 4, 5, 6, 7 o más sitios de escisión proteolítica. Los péptidos terapéuticos descritos en el presente documento pueden comprender además uno o más sitios de escisión proteolítica.

[0072] El uno o más sitios de escisión proteolíticas pueden estar unidos al extremo N-terminal, C-terminal o en tanto N como C-terminales de un péptido terapéutico. El uno o más sitios de escisión proteolítica se pueden unir al extremo N-terminal, al C-terminal o a ambos extremos N y C de un enlazador. El uno o más sitios de escisión proteolítica pueden unirse a un péptido terapéutico, enlazador, región de inmunoglobulina, región no inmunoglobulina o una combinación de los mismos.

[0073] En algunas formas de realización, el sitio de escisión proteolítica se encuentra dentro de la secuencia de aminoácidos del péptido terapéutico, región de inmunoglobulina, o una combinación de los mismos. El péptido terapéutico puede comprender uno o más sitios de escisión proteolítica dentro de su secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, las SEQ ID NO: 37-39 describen una proteína de relaxina que comprende dos sitios de escisión proteolítica internos.

[0074] Dos o más sitios de escisión proteolítica pueden rodear un péptido terapéutico, enlazador, región de inmunoglobulina, o combinación de los mismos. La digestión del sitio de escisión proteolítica puede dar como resultado la liberación de un fragmento de péptido ubicado entre los dos o más sitios de escisión proteolítica. Por ejemplo, los sitios

de escisión proteolítica pueden flanquear un péptido enlazador de péptidos terapéuticos. La digestión de los sitios de escisión proteolítica puede resultar en la liberación del enlazador de péptidos terapéuticos.

[0075] El sitio de escisión proteolítica puede ser reconocido por una o más proteasas. La una o más proteasas pueden ser una serina proteasa, treonina proteasa, cisteína proteasa, proteasa aspartato, proteasa glutámica, metaloproteasa, exopeptidasas, endopeptidasas o una combinación de las mismas. Las proteasas se pueden seleccionar del grupo que comprende el factor VII o el factor Xa. Los ejemplos adicionales de proteasas incluyen, pero no se limitan a aminopeptidasas, carboxipeptidasas, tripsina, quimotripsina, pepsina, papaína y elastasa. La proteasa puede ser PC2. En algunas formas de realización, la proteasa reconoce la secuencia de aminoácidos KR. En algunas formas de realización, la proteasa reconoce la secuencia de aminoácidos RKKR.

Vectores, células huésped y métodos recombinantes

[0076] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se definen en las reivindicaciones, pueden expresarse y purificarse mediante métodos conocidos de purificación de proteínas y recombinantes. En algunos casos, la actividad de la proteína de fusión de inmunoglobulina se ve afectada por métodos de expresión y/o purificación. Por ejemplo, la actividad de una proteína de fusión de inmunoglobulina configurada para su uso como terapéutica se mejora o atenúa en función de la identidad del vector de expresión, la identidad del huésped recombinante, la identidad de la línea celular, las condiciones de reacción de expresión, los métodos de purificación, procesamiento de proteína, o cualquier combinación de los mismos. Las condiciones de reacción de expresión incluyen, pero no se limitan a temperatura, % de CO₂, medio, tiempo de expresión, cofactores y acompañantes. Los métodos de purificación incluyen, pero no se limitan a temperaturas de purificación, resinas cromatográficas, inhibidores de proteasa y composiciones de tampón.

[0077] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones, pueden ser expresadas por métodos recombinantes. Generalmente, un ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de inmunoglobulina puede aislarse e insertarse en un vector replicable para clonación adicional (amplificación del ADN) o para la expresión. El ADN que codifica la proteína de fusión de inmunoglobulina puede prepararse mediante amplificación por PCR y secuenciarse usando procedimientos convencionales (p. ej., usando sondas de oligonucleótidos que son capaces de unirse específicamente a nucleótidos que codifican proteínas de fusión de inmunoglobulina). En una realización ejemplar, el ácido nucleico que codifica una proteína de fusión de inmunoglobulina se amplifica por PCR, se digiere con enzima de restricción y se purifica en gel. El ácido nucleico digerido se puede insertar en un vector replicable. El vector replicable que contiene la inserción de la proteína de fusión de inmunoglobulina digerida puede transformarse o transducirse en una célula huésped para clonación adicional (amplificación del ADN) o para expresión. Las células huésped pueden ser células procariotas o eucariotas.

[0078] Las secuencias de polinucleótidos que codifican componentes polipeptídicos (p. ej., región de inmunoglobulina, péptido terapéutico) de las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden obtenerse mediante amplificación por PCR. Las secuencias de polinucleótidos pueden aislarse y secuenciarse a partir de células que contienen ácidos nucleicos que codifican los componentes polipeptídicos. Alternativamente, o adicionalmente, los polinucleótidos se pueden sintetizar usando un sintetizador de nucleótidos o técnicas de PCR. Una vez obtenidas, las secuencias que codifican los componentes polipeptídicos pueden insertarse en un vector recombinante capaz de replicar y expresar polinucleótidos heterólogos en huéspedes procariotas y/o eucariotas.

[0079] Además, los vectores de fago que contienen secuencias de replicón y de control que son compatibles con el microorganismo huésped se pueden utilizar como vectores transformantes en relación con estos huéspedes. Por ejemplo, se puede utilizar un bacteriófago como λGEM™-11 para preparar un vector recombinante que se puede utilizar para transformar células hospedadoras susceptibles como *E. coli* LE392.

[0080] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden ser expresadas intracelularmente (p. ej., el citoplasma) o extracelularmente (p. ej., secreción). Para la expresión extracelular, el vector puede comprender una señal de secreción que permite la translocación de las proteínas de fusión de inmunoglobulina al exterior de la célula.

[0081] Las células huésped adecuadas para la clonación o expresión de vectores que codifican proteínas de fusión de inmunoglobulina incluyen células procariotas o eucariotas. La célula huésped puede ser eucariota. Ejemplos de células eucariotas incluyen, pero no se limitan a células de riñón embrionario humano (HEK), células de ovario de hámster chino (CHO), hongos, levaduras, células de invertebrados (p. ej., células vegetales y células de insectos), células linfoides (p. ej., YO, NSO, célula Sp20). Otros ejemplos de líneas celulares huésped de mamíferos adecuadas son la línea CV1 de riñón de mono transformada por SV40 (COS-7); células renales de crías de hámster (BHK); células de sertoli de ratón; células de riñón de mono (CV1); Células de riñón de mono verde africano (VERO-76); células de carcinoma de cuello uterino humano (HELA); células de riñón canino (MDCK); células de hígado de rata búfalo (BRL 3A); células de pulmón humano (W138); células de hígado humano (Hep G2); tumor mamario de ratón (MMT 060562); células TR1; células MRC 5; y células FS4. La célula huésped puede ser una célula procariota (p. ej., *E. coli*).

[0082] Las células huésped pueden transformarse con vectores que contienen nucleótidos que codifican proteínas de fusión de inmunoglobulina. Las células huésped transformadas pueden cultivarse en medios de comunicación. Los medios de comunicación pueden complementarse con uno o más agentes para inducir promotores, seleccionar transformantes,

o amplificar o expresar los genes que codifican las secuencias deseadas. Los métodos para transformar células huésped son conocidos en la técnica y pueden incluir electroporación, cloruro de calcio, o polietilenglicol/DMSO.

[0083] Alternativamente, las células huésped pueden transfectarse o transducirse con vectores que contienen nucleótidos que codifican proteínas de fusión de inmunoglobulina. Las células huésped transfectadas o transducidas pueden cultivarse en medio. El medio puede complementarse con uno o más agentes para inducir los promotores, seleccionando células transfectadas o transducidas, o expresando genes que codifican las secuencias deseadas.

[0084] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina expresadas pueden ser secretadas en y recuperadas a partir del periplasma de las células huésped o transportadas en los medios de cultivo. La recuperación de proteínas del periplasma puede implicar la alteración de la célula huésped. La alteración de la célula huésped puede comprender choque osmótico, sonicación o lisis. Se puede usar centrifugación o filtración para eliminar restos celulares o células completas. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina se pueden purificar más, por ejemplo, mediante cromatografía de resina de afinidad.

[0085] Alternativamente, las proteínas de fusión de inmunoglobulina que son secretadas en los medios de cultivo se pueden aislar en los mismos. Las células se pueden eliminar del cultivo y el sobrenadante del cultivo se puede filtrar y concentrar para una mayor purificación de las proteínas producidas. Los polipéptidos expresados pueden aislarse e identificarse adicionalmente usando métodos comúnmente conocidos tales como electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE) y ensayo de transferencia Western.

[0086] La producción de proteínas de fusión de inmunoglobulinas puede realizarse en grandes cantidades mediante un proceso de fermentación. Se encuentran disponibles varios procedimientos de fermentación por lotes alimentados a gran escala para la producción de proteínas recombinantes. Las fermentaciones a gran escala tienen al menos 1.000 litros de capacidad, preferiblemente alrededor de 1.000 a 100.000 litros de capacidad. Estos fermentadores utilizan impulsores agitadores para distribuir oxígeno y nutrientes, especialmente glucosa (una fuente preferida de carbono/energía). La fermentación a pequeña escala se refiere generalmente a la fermentación en un fermentador que no tiene más de aproximadamente 100 litros de capacidad volumétrica y puede oscilar entre aproximadamente 1 litro y aproximadamente 100 litros.

[0087] En un proceso de fermentación, la inducción de la expresión de proteínas se inicia típicamente después de que las células se han cultivado en condiciones adecuadas hasta una densidad deseada, por ejemplo, una OD₅₅₀ de aproximadamente 180-220, en cuya fase las células están en la fase estacionaria temprana. Puede usarse una variedad de inductores, de acuerdo con la construcción de vector empleada, como se conoce en la técnica y se describe en el presente documento. Las células pueden cultivarse durante períodos más cortos antes de la inducción. Las células se inducen habitualmente durante aproximadamente 12 a 50 horas, aunque se puede usar un tiempo de inducción más largo o más corto.

[0088] Para mejorar el rendimiento de producción y la calidad de las proteínas de fusión de inmunoglobulina descritas aquí, varias condiciones de fermentación pueden ser modificadas. Por ejemplo, para mejorar el ensamblaje y plegado adecuados de los polipéptidos de proteínas de fusión de inmunoglobulina secretadas, vectores adicionales que sobreexpresan proteínas chaperonas, como las proteínas Dsb (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD o DsbG) o FkpA (una peptidilprolil cis,trans-isomerasa con actividad de chaperona) se pueden utilizar para co-transformar las células procariontes del huésped. Se ha demostrado que las proteínas chaperonas facilitan el plegamiento y la solubilidad adecuados de las proteínas heterólogas producidas en las células huésped bacterianas.

[0089] Para minimizar la proteólisis de proteínas heterólogas expresadas (especialmente aquellas que son proteolíticamente sensibles), ciertas cepas huésped deficientes para enzimas proteolíticas se pueden usar para la presente descripción. Por ejemplo, las cepas de células hospedadoras pueden modificarse para efectuar mutaciones genéticas en los genes que codifican proteasas bacterianas conocidas tales como Proteasa III, OmpT, DegP, Tsp, Proteasa I, Proteasa Mi, Proteasa V, Proteasa VI y combinaciones de las mismas. Se encuentran disponibles algunas cepas de *E. coli* deficientes en proteasa.

[0090] Pueden emplearse métodos estándar de purificación de proteínas conocidos en la técnica. Los siguientes procedimientos son ejemplos de procedimientos de purificación adecuados: fraccionamiento en columnas de inmunoafinidad o de intercambio iónico, precipitación con etanol, HPLC de fase inversa, cromatografía en sílice o en una resina de intercambio catiónico como DEAE, cromatografía de exclusión, SDS-PAGE, precipitación con sulfato de amonio, cromatografía con hidroxipatita, electroforesis en gel, diálisis y cromatografía de afinidad y filtración en gel usando, por ejemplo, Sephadex G-75.

[0091] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden ser concentradas usando un filtro de concentración de proteínas disponible comercialmente, por ejemplo, una unidad de ultrafiltración Amicon o Millipore Pellicon®.

[0092] Los inhibidores de proteasa o cócteles inhibidores de la proteasa se pueden incluir en cualquiera de los pasos anteriores para inhibir la proteólisis de las proteínas de fusión de inmunoglobulina.

[0093] En algunos casos, una proteína de fusión de inmunoglobulina puede no ser biológicamente activa tras el aislamiento. Se pueden usar varios métodos para "replegar" o convertir un polipéptido en su estructura terciaria y generar enlaces disulfuro para restaurar la actividad biológica. Dichos métodos incluyen exponer el polipéptido solubilizado a un pH normalmente superior a 7 y en presencia de una concentración particular de un caótropro. La selección del caótropro es muy similar a las opciones utilizadas para la solubilización de cuerpos de inclusión, pero normalmente el caótropro se utiliza en una concentración más baja y no es necesariamente el mismo que los caotrópicos utilizados para la solubilización. En la mayoría de los casos, la solución de replegamiento/oxidación también contendrá un agente reductor o el agente reductor más su forma oxidada en una proporción específica para generar un potencial redox particular que permita que se produzca una mezcla de disulfuro en la formación de los puentes de cisteína de la proteína. Algunas de las parejas redox comúnmente utilizadas incluyen cisteína/cistamina, glutatión (GSH)/ditiobis GSH, cloruro cúprico, ditiotreitól (DTT)/ditiato DTT y 2-mercaptoetanol (bME)/di-tio-b (ME). En muchos casos, se puede usar un codisolvente para aumentar la eficacia del replegamiento, y los reactivos comunes usados para este propósito incluyen glicerol, polietilenglicol de varios pesos moleculares, arginina y similares.

Composiciones

[0094] Se describen en el presente documento composiciones que comprenden una proteína de fusión de inmunoglobulina y/o un componente de una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones. Las composiciones pueden comprender 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más proteínas de fusión de inmunoglobulinas. Las proteínas de fusión de inmunoglobulinas pueden ser diferentes. Alternativamente, las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden ser iguales o similares. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina pueden comprender diferentes regiones de inmunoglobulina, péptidos terapéuticos o una combinación de los mismos.

[0095] Las composiciones pueden comprender además una o más sales, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables. Las sales, excipientes o vehículos farmacéuticamente aceptables para su uso en las presentes composiciones farmacéuticas incluyen vehículos, excipientes, diluyentes, antioxidantes, conservantes, agentes colorantes, aromatizantes y diluyentes, agentes emulsionantes, agentes de suspensión, disolventes, cargas, agentes de carga, tampones, vehículos de administración, agentes de tonicidad, codisolventes, agentes humectantes, agentes complejantes, agentes tamponantes, antimicrobianos y tensioactivos.

[0096] Solución salina tamponada neutra o solución salina mezclada con albúmina de suero son vehículos apropiados ejemplares. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir antioxidantes tales como ácido ascórbico; polipéptidos de bajo peso molecular; proteínas, como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos como polivinilpirrolidona; aminoácidos como glicina, glutamina, asparagina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos que incluyen glucosa, manosa o dextrinas; agentes quelantes como EDTA; alcoholes de azúcar como manitol o sorbitol; contraiones formadores de sal tales como sodio; y/o tensioactivos no iónicos tales como Tween, pluronics o polietilenglicol (PEG). También a modo de ejemplo, los agentes potenciadores de la tonicidad adecuados incluyen haluros de metales alcalinos (preferiblemente cloruro de sodio o potasio), manitol, sorbitol y similares. Los conservantes adecuados incluyen cloruro de benzalconio, timerosal, alcohol fenético, metilparabeno, propilparabeno, clorhexidina, ácido sórbico y similares. El peróxido de hidrógeno también se puede utilizar como conservante. Los codisolventes adecuados incluyen glicerina, propilenglicol y PEG. Los agentes complejantes adecuados incluyen cafeína, polivinilpirrolidona, beta-ciclodextrina o hidroxipropil-beta-ciclodextrina. Los tensioactivos o agentes humectantes adecuados incluyen ésteres de sorbitán, polisorbatos tales como polisorbato 80, trometamina, lecitina, colesterol, tiloxapal y similares. Los tampones pueden ser tampones convencionales tales como acetato, borato, citrato, fosfato, bicarbonato o Tris-HCl. El tampón acetato puede tener un pH de 4-5,5 y el tampón Tris puede tener un pH de 7-8,5. Agentes farmacéuticos adicionales se exponen en Remington Pharmaceutical Sciences, 18ª edición, AR Gennaro, ed., Mack Publishing Company, 1990.

[0097] La composición puede estar en forma líquida o en una forma liofilizada o congelada en seco y puede incluir uno o más lioprotectores, excipientes, tensioactivos, aditivos estructurales de alto peso molecular y/o agentes de carga (véanse, por ejemplo, las patentes estadounidenses números 6.685.940, 6.566.329 y 6.372.716). En una forma de realización, se incluye un lioprotector, que es un azúcar no reductor como sacarosa, lactosa o trehalosa. La cantidad de lioprotector generalmente incluida es tal que, tras la reconstitución, la formulación resultante será isotónica, aunque también pueden ser adecuadas las formulaciones hipertónicas o ligeramente hipotónicas. Además, la cantidad de lioprotector debería ser suficiente para evitar una cantidad inaceptable de degradación y/o agregación de la proteína tras la liofilización. Las concentraciones de lioprotector ejemplares para azúcares (p. ej., sacarosa, lactosa, trehalosa) en la formulación pre-liofilizada son de aproximadamente 10 mM a aproximadamente 400 mM. En otra forma de realización, se incluye un tensioactivo, como por ejemplo tensioactivos no iónicos y tensioactivos iónicos como polisorbatos (p. ej., polisorbato 20, polisorbato 80); poloxámeros (p. ej., poloxámeros 188); éteres de poli(etilenglicol)fenilo (p. ej., Triton); dodecil sulfato de sodio (SDS); laurel sulfato de sodio; octilglicósido de sodio; lauril-, miristil-, linoleil- o estearilsulfobetaina; lauril, miristil, linoleil o estearil sarcosina; linoleilo, miristil- o cetil-betaína; lauroamidopropil-, cocamidopropil-, linoleamidopropil-, miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-betaína (p. ej., lauroamidopropil); miristamidopropil-, palmidopropil- o isoestearamidopropil-dimetilamina; metil cocoil sodio, o metil ofeil-taurato disódico; la serie MONAQUAT™ (Mona Industries, Inc., Paterson, N.J.), polietilenglicol, polipropilglicol y copolímeros de etileno y propilenglicol (p. ej., Pluronic, PF68, etc.). Cantidades ejemplares de tensioactivo que pueden estar presentes en la formulación pre-

liofilizada son de aproximadamente 0,001-0,5%. Los aditivos estructurales de alto peso molecular (p. ej., rellenos, aglutinantes) pueden incluir, por ejemplo, goma arábica, albúmina, ácido algínico, fosfato cálcico (dibásico), celulosa, carboximetilcelulosa, carboximetilcelulosa sódica, hidroxietilcelulosa, hidroxipropilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, celulosa microcristalina, dextrano, dextrina, dextratos, sacarosa, tilosa, almidón pregelatinizado, sulfato de calcio, amilosa, glicina, bentonita, maltosa, sorbitol, fosbitol de disodio, polifosfato de disodio, polifosfato de disodio gelatina, glucosa, goma guar, glucosa líquida, azúcar comprimible, silicato de magnesio y aluminio, maltodextrina, óxido de polietileno, polimetacrilatos, povidona, alginato de sodio, celulosa microcristalina de tragacanto, almidón y zeína. Las concentraciones ejemplares de aditivos estructurales de alto peso molecular son del 0,1% al 10% en peso. En otras realizaciones, se puede incluir un agente de carga (p. ej., manitol, glicina).

[0098] Las composiciones pueden ser adecuadas para la administración parenteral. Las composiciones ejemplares son adecuadas para inyección o infusión en un animal por cualquier vía disponible para el experto, tal como vía intraarticular, subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, intracerebral (intraparenquimatosa), intracerebroventricular, intramuscular, intraocular, intraarterial o intralesional. Una formulación parenteral será típicamente una solución acuosa isotónica estéril, libre de pirógenos, que contiene opcionalmente conservantes farmacéuticamente aceptables.

[0099] Los ejemplos de disolventes no acuosos son propilenglicol, polietilenglicol, aceites vegetales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables como oleato de etilo. Los vehículos acuosos incluyen agua, soluciones, emulsiones o suspensiones alcohólicas/acuosas, incluidos medios salinos y tamponados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio, lactato de Ringer o aceites fijos. Los vehículos intravenosos incluyen reponedores de líquidos y nutrientes, reponedores de electrolitos, tales como los basados en dextrosa de Ringer y similares. También pueden estar presentes conservantes y otros aditivos, tales como, por ejemplo, antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes, gases inertes y similares. Véase, en general, *Pharmaceutical Science* de Remington, 16ª Ed., Mack Eds., 1980.

[0100] Las composiciones descritas en este documento se pueden formular para la administración controlada o sostenida de una manera que se proporciona una concentración local del producto (p. ej., bolo, efecto de depósito) y/o mayor estabilidad o semivida en un entorno local particular. Las composiciones pueden comprender la formulación de proteínas de fusión de inmunoglobulinas, polipéptidos, ácidos nucleicos o vectores descritos en este documento con preparaciones particuladas de compuestos poliméricos como ácido poliláctico, ácido poliglicólico, etc., así como agentes como una matriz biodegradable, microesferas inyectables, partículas microcapsulares, microcápsulas, perlas de partículas bioerosionables, liposomas y dispositivos de administración implantables que proporcionan la liberación controlada o sostenida del agente activo que luego puede administrarse como una inyección de depósito. Se conocen técnicas para formular tales medios de administración sostenida o controlada y se han desarrollado y utilizado una variedad de polímeros para la liberación y administración controladas de fármacos. Estos polímeros son típicamente biodegradables y biocompatibles. Los hidrogeles poliméricos, incluidos los formados por complejación de polímeros enantioméricos o segmentos polipeptídicos, y los hidrogeles con propiedades sensibles a la temperatura o al pH, pueden ser deseables para proporcionar un efecto de depósito de fármaco debido a las condiciones suaves y acuosas implicadas en la captura de agentes proteicos bioactivos. Véase, por ejemplo, la descripción de micropartículas poliméricas porosas de liberación controlada para el suministro de composiciones farmacéuticas en el documento WO 93/15722.

[0101] Los materiales adecuados para este propósito incluyen polilactidas (véase, p. ej., la Patente de Estados Unidos Nº 3.773.919), polímeros de ácidos poli-(a-hidroxicarboxílicos), tales como ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico (EP 133.988A), copolímeros de ácido L-glutámico y gamma etil-L-glutamato (Sidman et al., *Biopolymers*, 22: 547-556 (1983)), poli(2-hidroxietilo-metacrilato) (Langer et al., *J. Biomed. Mater. Res.*, 15: 167-277 (1981), y Langer, *Chem. Tech.*, 12: 98-105 (1982)), etileno acetato de vinilo o ácido poli-D(-)-3-hidroxibutírico. Otros polímeros biodegradables incluyen poli(lactonas), poli(acetales), poli(ortoésteres) y poli(ortocarbonatos). Las composiciones de liberación sostenida también pueden incluir liposomas, que pueden prepararse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica (véase, p. ej., Eppstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. EE. UU.*, 82: 3688-92 (1985)). El portador en sí, o sus productos de degradación, no deben ser tóxicos en el tejido diana y no deben agravar más la condición. Esto puede determinarse mediante cribado de rutina en modelos animales del trastorno diana o, si tales modelos no están disponibles, en animales normales.

[0102] Las proteínas de fusión de inmunoglobulina, tal como se definen en las reivindicaciones, pueden ser microencapsuladas.

[0103] Una composición farmacéutica descrita en el presente documento puede administrarse a un sujeto por cualquier vía de administración adecuada, incluyendo pero no limitado a administración parenteral (intravenosa, subcutánea, intraperitoneal, intramuscular, intravascular, intratecal, intravítrea, infusión, o local), tópica, oral o nasal.

[0104] Las formulaciones adecuadas para inyección intramuscular, subcutánea, peritumoral o intravenosa pueden incluir soluciones, dispersiones, suspensiones o emulsiones acuosas o no acuosas estériles fisiológicamente aceptables y polvos estériles para reconstitución en soluciones o dispersiones inyectables estériles. Ejemplos de portadores, diluyentes, disolventes o vehículos acuosos y no acuosos adecuados que incluyen agua, etanol, polioles (propilenglicol, polietilenglicol, glicerol, cremofor y similares), mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales (como aceite de oliva) y orgánicos inyectables, ésteres como el oleato de etilo. La fluidez adecuada se mantiene, p. ej., mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones

y mediante el uso de tensioactivos. Las formulaciones adecuadas para inyección subcutánea también contienen aditivos opcionales como agentes conservantes, humectantes, emulsionantes y dispensadores.

[0105] Para las inyecciones por vía intravenosa, un agente activo puede formularse opcionalmente en soluciones acuosas, preferiblemente en tampones fisiológicamente compatibles tales como solución de Hank, solución de Ringer, o tampón de solución salina fisiológica.

[0106] Inyecciones parenterales implican opcionalmente inyección en bolo o infusión continua. Las formulaciones para inyección opcionalmente son presentadas en forma de dosificación unitaria, p. ej., en ampollas o en recipientes de dosis múltiples, con un conservante añadido. La composición farmacéutica descrita en este documento puede estar en una forma adecuada para inyección parenteral como suspensiones, soluciones o emulsiones estériles en vehículos aceitosos o acuosos, y contener agentes de formulación tales como agentes de suspensión, estabilizantes y/o dispersantes. Las formulaciones farmacéuticas para administración parenteral incluyen soluciones acuosas de un agente activo en forma soluble en agua. Además, las suspensiones se preparan opcionalmente como suspensiones de inyección aceitosas apropiadas.

[0107] Alternativamente o adicionalmente, las composiciones se pueden administrar localmente a través de la implantación en el área afectada de una membrana, esponja, u otro material apropiado sobre el que una proteína de fusión de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones, se ha absorbido o encapsulado. Cuando se utiliza un dispositivo de implantación, el dispositivo puede implantarse en cualquier tejido u órgano adecuado, y la administración de una proteína de fusión de inmunoglobulina, ácido nucleico o vector descrito en este documento puede ser directamente a través del dispositivo mediante bolo, o mediante administración continua, o vía catéter mediante infusión continua.

[0108] Una composición farmacéutica que comprende una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones se puede formular para inhalación, tal como, p. ej., como un polvo seco. Las soluciones de inhalación también se pueden formular en un propulsor licuado para la administración en aerosol. En otra formulación más, las soluciones se pueden nebulizar. Las composiciones farmacéuticas adicionales para la administración pulmonar incluyen las descritas, p. ej., en el documento WO 94/20069, que describe la administración pulmonar de proteínas químicamente modificadas. Para el suministro pulmonar, el tamaño de partícula debe ser adecuado para el suministro al pulmón distal. Por ejemplo, el tamaño de partícula puede ser de 1 µm a 5 µm; sin embargo, se pueden usar partículas más grandes, p. ej., si cada partícula es bastante porosa.

[0109] Ciertas formulaciones que comprenden una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones se pueden administrar por vía oral. Las formulaciones administradas de esta manera se pueden formular con o sin los vehículos que se usan habitualmente en la combinación de formas de dosificación sólidas tales como comprimidos y cápsulas. Por ejemplo, se puede diseñar una cápsula para liberar la parte activa de la formulación en el punto del tracto gastrointestinal en donde se maximiza la biodisponibilidad y se minimiza la degradación presistémica. Pueden incluirse agentes adicionales para facilitar la absorción de un agente aglutinante selectivo. También se pueden emplear diluyentes, aromatizantes, ceras de bajo punto de fusión, aceites vegetales, lubricantes, agentes de suspensión, agentes desintegradores de comprimidos y aglutinantes.

[0110] Otra preparación puede implicar una cantidad eficaz de una proteína de fusión de inmunoglobulina en una mezcla con excipientes no tóxicos que son adecuados para la fabricación de comprimidos. Disolviendo los comprimidos en agua esterilizada u otro vehículo apropiado, se pueden preparar soluciones en forma de dosis unitaria. Los excipientes adecuados incluyen, pero sin limitación, diluyentes inertes, tales como carbonato cálcico, carbonato o bicarbonato sódico, lactosa o fosfato cálcico; o agentes aglutinantes, como almidón, gelatina o goma arábiga; o agentes lubricantes tales como estearato de magnesio, ácido esteárico o talco.

[0111] Las formulaciones farmacéuticas adecuadas y/o preferidas pueden determinarse en vista de la presente descripción y el conocimiento general de la tecnología de la formulación, dependiendo de la vía de administración pretendida, el formato de administración y la dosificación deseada. Independientemente de la forma de administración, se puede calcular una dosis eficaz de acuerdo con el peso corporal del paciente, el área de superficie corporal o el tamaño de los órganos.

[0112] El refinamiento adicional de los cálculos para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones descritas en el presente documento se hace rutinariamente en la técnica y está dentro del ámbito de las tareas llevadas a cabo rutinariamente en la técnica. Las dosis apropiadas pueden determinarse mediante el uso de datos de dosis-respuesta apropiados.

[0113] Las composiciones según la invención pueden ser útiles para proporcionar pronóstico o proporcionar información de diagnóstico.

[0114] "Farmacéuticamente aceptable" puede referirse a aprobado o aprobable por una agencia reguladora del gobierno federal o estatal o enumerado en la Farmacopea de EE. UU. u otra farmacopea generalmente reconocida para uso en animales, incluidos humanos.

[0115] "Sal farmacéuticamente aceptable" puede referirse a una sal de un compuesto que es farmacéuticamente aceptable y que posee la actividad farmacológica deseada del compuesto original.

[0116] "Excipiente, portador o adyuvante farmacéuticamente aceptable" puede referirse a un excipiente, portador o adyuvante que puede administrarse a un sujeto, junto con al menos una inmunoglobulina de la presente divulgación, y que no destruye su actividad farmacológica y no es tóxico cuando se administra en dosis suficientes para administrar una cantidad terapéutica del compuesto.

[0117] "Vehículo farmacéuticamente aceptable" puede referirse a un diluyente, adyuvante, excipiente, o vehículo con el que se administra al menos una inmunoglobulina de la presente descripción.

Kits

[0118] Además, en el presente documento se describen kits que comprenden una o más proteínas de fusión de inmunoglobulina o componentes de las mismas, como se define en las reivindicaciones. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina se pueden empaquetar de una manera que facilite su uso para practicar los métodos de la presente divulgación. Por ejemplo, un kit comprende una proteína de fusión de inmunoglobulina descrita en este documento empaquetada en un recipiente con una etiqueta adherida al recipiente o un prospecto que describe el uso de la proteína de fusión de inmunoglobulina en la práctica del método. Los recipientes adecuados incluyen, p. ej., botellas, viales, jeringas, etc. Los recipientes se pueden formar a partir de una variedad de materiales tales como vidrio o plástico. El recipiente puede tener un puerto de acceso estéril (p. ej., el recipiente puede ser una bolsa de solución intravenosa o un vial que tiene un tapón perforable por una aguja de inyección hipodérmica). El kit puede comprender un recipiente con una proteína de fusión de inmunoglobulina contenida en el mismo. El kit puede comprender un recipiente con (a) una región de inmunoglobulina de una proteína de fusión de inmunoglobulina. El kit puede comprender además un prospecto que indique que la primera composición y la segunda composición pueden usarse para tratar una afección particular. Alternativa o adicionalmente, el kit puede comprender además un segundo (o tercer) recipiente que comprende un tampón farmacéuticamente aceptable (p. ej., agua bacteriostática para inyección (BWI), solución salina tamponada con fosfato, solución de Ringer y solución de dextrosa). Puede comprender además otros materiales deseables desde un punto de vista comercial y de usuario, incluidos, entre otros, otros tampones, diluyentes, filtros, agujas y jeringas. La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede empaquetar en una forma de dosificación unitaria. El kit puede comprender además un dispositivo adecuado para administrar la proteína de fusión de inmunoglobulina de acuerdo con una vía de administración específica o para practicar un ensayo de cribado. El kit puede contener una etiqueta que describe el uso de la composición de proteína de fusión de inmunoglobulina.

[0119] La composición que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina puede formularse de acuerdo con procedimientos de rutina como una composición farmacéutica adaptada para administración intravenosa a mamíferos, tales como seres humanos, bovinos, felinos, caninos y murinos. Normalmente, las composiciones para administración intravenosa comprenden soluciones en tampón acuoso isotónico estéril. Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente solubilizante y/o anestésicos locales como lidocaína para aliviar el dolor en el lugar de la inyección. Generalmente, los ingredientes se pueden suministrar por separado o mezclados en forma de dosis unitaria. Por ejemplo, la proteína de fusión de inmunoglobulina se puede suministrar como un polvo liofilizado seco o un concentrado libre de agua en un recipiente herméticamente cerrado como una ampolla o bolsita que indique la cantidad de proteína de fusión de inmunoglobulina. Cuando la composición se va a administrar por infusión, puede dispensarse con una botella de infusión que contenga agua o solución salina estéril de calidad farmacéutica. Cuando la composición se administra mediante inyección, se puede proporcionar una ampolla de agua estéril para inyección o solución salina para que los ingredientes se puedan mezclar antes de la administración.

[0120] La cantidad de la composición descrita en el presente documento que será eficaz en el tratamiento, inhibición y/o prevención de una enfermedad o trastorno asociado con la expresión y/o actividad de un péptido terapéutico aberrante se puede determinar mediante técnicas clínicas estándar. Además, pueden emplearse opcionalmente ensayos in vitro para ayudar a identificar los intervalos de dosificación óptimos. La dosis precisa a emplear en la formulación también puede depender de la vía de administración y la gravedad de la enfermedad o trastorno, y debe decidirse según el criterio del médico y las circunstancias de cada paciente. Las dosis efectivas se pueden extrapolar a partir de las curvas de dosis-respuesta derivadas de sistemas de prueba de modelos animales o ensayos clínicos in vitro.

Uso terapéutico

[0121] Se describen además en el presente documento proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se definen en las reivindicaciones, para su uso en métodos de tratamiento, alivio, inhibición y/o prevención de una o más enfermedades y/o afecciones. El método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una o más proteínas de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones. La proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región de inmunoglobulina unida a un péptido terapéutico. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender una región de inmunoglobulina unida a una región que no es de inmunoglobulina. La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. Alternativamente, el mamífero es un bovino. El péptido terapéutico puede ser un

péptido o derivado o variante del mismo. Alternativamente, el péptido terapéutico es una molécula pequeña. El péptido terapéutico puede ser relaxina o derivado o variante del mismo. La región de inmunoglobulina puede comprender uno o más dominios de inmunoglobulina. La región de inmunoglobulina puede ser una inmunoglobulina A, una inmunoglobulina D, una inmunoglobulina E, una inmunoglobulina G o una inmunoglobulina M. La proteína de fusión de inmunoglobulina, la región de inmunoglobulina y/o el péptido terapéutico pueden comprender además uno o más enlazadores. El enlazador puede unir un sitio de escisión proteolítica a la región de inmunoglobulina o péptido terapéutico. El enlazador puede ser un enlazador de conexión. El conector de conexión puede conectar el péptido terapéutico al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina.

[0122] También se describen en el presente documento proteínas de fusión a inmunoglobulina, tal como se define en las reivindicaciones, para su uso en métodos de tratamiento, aliviar, inhibir y/o prevenir una o más enfermedades y/o afecciones. El método puede comprender administrar a un sujeto que lo necesite una composición que comprende una o más proteínas de fusión de inmunoglobulina, como se define en las reivindicaciones. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender una región de inmunoglobulina de acuerdo con las reivindicaciones unida a un péptido de relaxina, en donde el péptido terapéutico está unido al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender una fusión de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 20 y 22 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10-12. La composición puede comprender además un vehículo farmacéuticamente aceptable. El sujeto puede ser un mamífero. El mamífero puede ser un ser humano. Alternativamente, el mamífero es un bovino.

[0123] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad heteroinmunitaria o afección, enfermedad inflamatoria, infección patógena, trastorno tromboembólico, enfermedad o estado respiratorio, enfermedad metabólica, trastorno del sistema nervioso central (SNC), enfermedad ósea o cáncer. En otros casos, la enfermedad o afección es un trastorno sanguíneo. En algunos casos, la enfermedad o afección es obesidad, diabetes, osteoporosis, anemia o dolor. En algunos casos, la enfermedad está relacionada con el corazón, p. ej., insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca o enfermedad de las arterias coronarias. En algunas formas de realización, la insuficiencia cardíaca es insuficiencia cardíaca aguda no isquémica, insuficiencia cardíaca crónica, insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca compensada estable, insuficiencia cardíaca aguda o insuficiencia cardíaca crónica. Ejemplos adicionales no limitantes de enfermedades y afecciones incluyen, reperusión de isquemia asociada con trasplante de órganos sólidos (p. ej., pulmón, riñón, hígado, corazón), derivación cardiopulmonar para protección de órganos (p. ej., renal), accidente cerebrovascular isquémico, curación corneal (administración ocular), nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, cicatrización del dolor diabético, esclerosis sistémica, maduración cervical en el momento del parto, preeclampsia, hipertensión portal y fibrosis.

[0124] En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es la exendina-4 y la enfermedad o afección es la obesidad, condiciones relacionadas con la obesidad, diabetes, y/o condiciones relacionadas con el diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es leptina y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es glucagón y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es un análogo de glucagón, por ejemplo ZP1, y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es insulina y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es oxintomodulina y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es una proteína similar al glucagón, por ejemplo GLP-1 o GLP-2, y la enfermedad o afección es obesidad, afecciones relacionadas con la obesidad, diabetes y/o afecciones relacionadas con la diabetes.

[0125] En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es la relaxina y la enfermedad o afección es la insuficiencia cardíaca, condiciones relacionadas con la insuficiencia cardíaca, fibrosis, condiciones relacionadas con fibrosis, u otra enfermedad. La relaxina incluye relaxina2 y relaxinas que comprenden ligadores internos como relaxina2 (XT100), relaxina2 (XT35), relaxina2 (única), relaxina2 (péptido de insulina C), relaxina2 (XT21), relaxina2 (30GS), relaxina2 (9GS) y relaxina2 (GGGPRR). En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es relaxina y la enfermedad o afección es insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca o enfermedad de las arterias coronarias. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es relaxina y la enfermedad o afección es reperusión isquémica asociada con trasplante de órganos sólidos (p. ej., pulmón, riñón, hígado, corazón), derivación cardiopulmonar para protección de órganos (p. ej., renal), accidente cerebrovascular isquémico, curación corneal (administración ocular), nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, cicatrización del diabético, esclerosis sistémica, maduración cervical en el momento del parto, preeclampsia, hipertensión portal o fibrosis. En algunas formas de realización, la insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda,

miocarditis viral, diabético insuficiencia cardíaca, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es relaxina y la enfermedad o afección es enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad fibrótica, enfermedad renal, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del pulmón, corazón, riñón, médula ósea, hígado, fibrosis dermatológica, trastorno fibrótico del ojo, isquemia, enfermedad de Alzheimer, lesión de la córnea, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad fibrótica, insuficiencia, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardíaca en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, protección cardíaca en relación con angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, trastornos respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar intersticial, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, enfermedad renal, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica con o sin necesidad de diálisis, subyacente o enfermedades renales relacionadas, hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis crónica (incluyendo primaria, secundaria o aguda), glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, síndrome de Alport, glomeruloesclerosis, diseminación tubular intersticiales, enfermedades nefropáticas, enfermedades renales primarias y congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas, rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, enfermedades que se caracterizan y asocian diagnósticamente con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de las enzimas renales que incluyen, entre otras, glutamilsintetasa, osmolaridad y volumen de orina, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolares, dilatación tubular, hiperfosfatemia, enfermedad que requiere diálisis para el tratamiento, carcinomas renales, después de resección incompleta del riñón, deshidratación después del uso excesivo de diuréticos, aumento incontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, lupus eritematoso, enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, enfermedad renal poliquística, acidosis tubular renal, enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico, dislipemia, efectos secundarios asociados con enfermedades renales agudas y/o crónicas, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas, hiperpotasemia, hiponatremia, metabolismo óseo y de carbohidratos, enfermedades pulmonares, trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión pulmonar (HP), enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolismos (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo, fibrosis quística (FQ), trastornos fibróticos, trastornos fibróticos de los órganos internos, trastornos fibróticos del pulmón, trastornos fibróticos del corazón, trastornos fibróticos del riñón, trastornos fibróticos de la médula ósea, trastornos fibróticos del hígado, fibrosis dermatológica, trastornos oculares fibróticos, disfunción articular osteodegenerativa, vasoconstricción mediada por angiotensina-II (AngII), vasoconstricción mediada por endotelina-1 (ET-1), condiciones isquémicas, isquemia asociada con infarto de miocardio, isquemia asociada con heridas, patologías renales, patologías renales relacionadas con vasoconstricción, hipertensión, aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de las arterias coronarias, esclerodermia, accidente cerebrovascular, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia o hipercolesterolemia.

[0126] La enfermedad y/o afección puede ser una enfermedad o afección crónica. Alternativamente, la enfermedad y/o afección es una enfermedad o afección aguda. La enfermedad o afección puede ser recurrente, refractaria, acelerada o en remisión. La enfermedad o afección puede afectar a uno o más tipos de células. La una o más enfermedades y/o afecciones pueden ser una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad inflamatoria, enfermedad cardiovascular, trastorno metabólico, embarazo y trastorno proliferativo celular.

[0127] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria. En algunos casos, la enfermedad autoinmunitaria puede ser esclerodermia, esclerodermia difusa o esclerodermia sistémica.

[0128] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad inflamatoria. En algunos casos, la enfermedad inflamatoria puede ser hepatitis, fibromialgia o psoriasis.

[0129] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad reumática. En algunos casos, la enfermedad reumática puede ser espondilitis anquilosante, dolor de espalda, bursitis, tendinitis, dolor de hombro, dolor de muñeca, dolor de

bíceps, dolor de pierna, dolor de rodilla, dolor de tobillo, dolor de cadera, dolor de Aquiles, capsulitis, dolor de cuello, osteoartritis, lupus sistémico, eritematoso, artritis reumatoide, artritis juvenil, síndrome de Sjogren, polimiositis, enfermedad de Behçet, síndrome de Reiter o artritis psoriásica. La enfermedad reumática puede ser crónica. Alternativamente, la enfermedad reumática es aguda.

[0130] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad cardiovascular. En algunos casos, la enfermedad cardiovascular puede ser insuficiencia cardíaca aguda, insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca compensada, insuficiencia cardíaca descompensada, hipercolesterolemia, aterosclerosis, enfermedad coronaria o accidente cerebrovascular isquémico. La enfermedad cardiovascular puede ser hipertrofia cardíaca.

[0131] La enfermedad o condición puede ser un trastorno metabólico. En algunos casos, el trastorno metabólico puede ser hipercolesterolemia, hipobetalipoproteinemia, hipertrigliceridemia, hiperlipidemia, dislipidemia, cetosis, hipolipidemia, anemia refractaria, control del apetito, vaciamiento gástrico, enfermedad del hígado graso no alcohólico, obesidad, diabetes mellitus tipo I, diabetes mellitus tipo II, diabetes mellitus gestacional, síndrome metabólico. El trastorno metabólico puede ser diabetes tipo I. El trastorno metabólico puede ser diabetes tipo II.

[0132] La enfermedad o afección puede ser el embarazo. Las proteínas de fusión de inmunoglobulina se pueden usar para tratar la preeclampsia o inducir el parto.

[0133] En el presente documento se describen composiciones que comprenden una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones, para su uso en métodos de tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesita, comprendiendo el método administrar al sujeto la composición que comprende la proteína de fusión de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina comprende un péptido terapéutico unido a una región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une a la región de inmunoglobulina mediante un enlazador químico denominado péptido de conexión. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico se une al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, el péptido terapéutico es relaxina. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región de inmunoglobulina de acuerdo con las reivindicaciones unidas a un péptido de relaxina, en donde el péptido terapéutico está unido al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una fusión de cadena pesada con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 20 y 22 y una cadena ligera con una secuencia de aminoácidos seleccionada de SEQ ID NO: 10-12. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad cardiovascular. La enfermedad cardiovascular puede ser insuficiencia cardíaca aguda. Las enfermedades cardiovasculares adicionales incluyen, pero no se limitan a insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca compensada o insuficiencia cardíaca descompensada. La enfermedad o afección puede ser un trastorno autoinmunitario. El trastorno autoinmunitario puede ser esclerodermia, esclerodermia difusa o esclerodermia sistémica. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria puede ser fibromialgia. La enfermedad o afección puede ser fibrosis. Alternativamente, la enfermedad o condición es el embarazo. La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede usar para tratar la preeclampsia o inducir el parto. En algunas formas de realización, la insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, diabético insuficiencia cardíaca, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina puede usarse para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad fibrótica, enfermedad renal, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del pulmón, corazón, riñón, médula ósea, hígado, fibrosis dermatológica, trastorno fibrótico del ojo, isquemia, enfermedad de Alzheimer, lesión de la córnea, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad fibrótica, insuficiencia, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperfusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardiovascular en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, cardioprotección en relación con angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación coronaria, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, trastornos respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, enfermedad renal, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica con o sin necesidad de diálisis, enfermedades renales subyacentes o relacionadas, hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis crónica (incluyendo primaria, secundaria o aguda), glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, Síndrome de Alport, glomerulosclerosis, enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, enfermedades renales primarias y

congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas, rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, enfermedades que se caracterizan y asocian diagnósticamente con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de las enzimas renales incluyendo, sin limitación, glutamilsintetasa, osmolaridad y volumen de orina, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia, enfermedad que requiere diálisis para el tratamiento, carcinomas renales, después de resección incompleta del riñón, deshidratación por uso excesivo de diuréticos, aumento incontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, lupus eritematoso, enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, enfermedad renal poliquística, acidosis tubular renal, enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico, dislipemia, efectos secundarios asociados con enfermedades renales agudas y/o crónicas, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas, hiperpotasemia, hiponatremia, metabolismo óseo y de carbohidratos, enfermedades pulmonares, trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión pulmonar (HP), enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolismos (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo, fibrosis quística (FQ), trastornos fibróticos, trastornos fibróticos de los órganos internos, trastornos fibróticos del pulmón, trastornos fibróticos del corazón, trastornos fibróticos del riñón, trastornos fibróticos de la médula ósea, trastornos fibróticos del hígado, fibrosis dermatológica, trastornos oculares fibróticos, disfunción articular osteodegenerativa, vasoconstricción mediada por angiotensina-II (AngII), vasoconstricción mediada por endotelina-1 (ET-1), condiciones isquémicas, isquemia asociada con infarto de miocardio, isquemia asociada con heridas, patologías renales, patologías renales relacionadas con vasoconstricción, hipertensión, aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de las arterias coronarias, esclerodermia, accidente cerebrovascular, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia e hipercolesterolemia.

[0134] Se describen en el presente documento composiciones que comprenden una o más proteínas de fusión de inmunoglobulina como se definen en las reivindicaciones, para su uso en un método de prevención o tratamiento de una enfermedad o afección en un sujeto que lo necesite que comprende administrar al sujeto la composición que comprende una o más proteínas de fusión de inmunoglobulina. La proteína de fusión de inmunoglobulina comprende una región de inmunoglobulina unida al péptido terapéutico. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender además uno o más enlazadores. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender además uno o más enlazadores internos. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede comprender además uno o más sitios de escisión proteolítica. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad o afección heteroinmunitaria, enfermedad inflamatoria, infección patógena, trastorno tromboembólico, enfermedad o afección respiratoria, enfermedad metabólica, trastorno del sistema nervioso central (SNC), enfermedad ósea o cáncer. La enfermedad o afección puede ser un trastorno sanguíneo. En algunos casos, la enfermedad o afección puede ser obesidad, diabetes, osteoporosis, anemia o dolor. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca o enfermedad de las arterias coronarias. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es isquemia reperusión asociada con trasplante de órganos sólidos (p. ej., pulmón, riñón, hígado, corazón), derivación cardiopulmonar para protección de órganos (p. ej., renal), accidente cerebrovascular isquémico, curación corneal (administración ocular), nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, cicatrización diabética, esclerosis sistémica, maduración cervical en el momento del parto, preeclampsia, hipertensión portal o fibrosis. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección puede ser insuficiencia cardíaca. Dicha insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de la válvula cardíaca, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad fibrótica, enfermedad renal, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del pulmón, corazón, riñón, médula ósea, hígado, fibrosis dermatológica, trastorno fibrótico del ojo, isquemia, enfermedad de Alzheimer, lesión de la córnea, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad fibrótica, insuficiencia, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardíaca en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, protección cardíaca en relación con

angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, trastornos respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar intersticial, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, enfermedad renal, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica con o sin necesidad de diálisis, enfermedades renales subyacentes o relacionadas, hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis crónica (incluyendo primaria, secundaria o aguda), glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, síndrome de Alport, glomerulosclerosis, enfermedades tubulares interestatales, enfermedades nefropáticas primarias, enfermedades renales congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas, rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, enfermedades que son caracterizadas y asociadas para el diagnóstico con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración en la actividad de las enzimas renales que incluyen, sin limitación, glutamilsíntesis, osmolaridad y volumen de orina, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia, enfermedad que requiere diálisis para el tratamiento, carcinomas renales, después de resección incompleta del riñón, deshidratación por uso excesivo de diuréticos, aumento descontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, lupus eritematoso, enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, enfermedad renal poliquística, acidosis tubular renal, enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico, dislipemia, efectos secundarios asociados con enfermedades renales agudas y/o crónicas, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas, hiperpotasemia, hiponatremia, metabolismo óseo y de carbohidratos, enfermedades pulmonares, trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión pulmonar (HP), enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolias (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo, fibrosis quística (FQ), trastornos fibróticos, trastornos fibróticos del sistema interno órganos, trastornos fibróticos del pulmón, trastornos fibróticos del corazón, trastornos fibróticos del riñón, trastornos fibróticos de la médula ósea, trastornos fibróticos del hígado, fibrosis dermatológica, trastornos oculares fibróticos, disfunción articular osteodegenerativa, vasoconstricción mediada por angiotensina-II (AngII), vasoconstricción mediada por endotelina-1 (ET-1), condiciones isquémicas, isquemia asociada con infarto de miocardio, isquemia asociada con heridas, patologías renales, patologías renales relacionadas con vasoconstricción, hipertensión, aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de las arterias coronarias, esclerodermia, accidente cerebrovascular, disfunción diastólica, hipercolesterolemia familiar, hipertensión arterial sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con la obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia o hipercolesterolemia.

[0135] La insuficiencia cardíaca puede comprender una o más de insuficiencia aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, cardiomiopatía isquémica, cardiomiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos congénitos del corazón, insuficiencia cardíaca asociada con defectos en las válvulas del corazón, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica.

[0136] Se proporcionan proteínas de fusión de inmunoglobulinas como se definen en las reivindicaciones, o composiciones farmacéuticas que comprenden proteínas de fusión de inmunoglobulinas como se definen en las reivindicaciones, para su uso en métodos de tratamiento, inhibición y prevención de una enfermedad o afección en un sujeto que las necesita mediante administración al sujeto de una cantidad eficaz de la proteína de fusión de inmunoglobulina o la composición farmacéutica. La proteína de fusión de inmunoglobulina puede estar sustancialmente purificada (p. ej., sustancialmente libre de sustancias que limitan su efecto o producen efectos secundarios no deseados). El sujeto puede ser un animal, incluidos, entre otros, animales como vacas, cerdos, ovejas, cabras, conejos, caballos, pollos, gatos, perros, ratones, etc. El sujeto puede ser un mamífero. El sujeto puede ser un ser humano. El sujeto puede ser un primate no humano. Alternativamente, el sujeto puede ser un bovino. El sujeto puede ser un ave, un reptil o un anfibio.

[0137] Los métodos de tratamiento descritos en el presente documento comprenden administrar una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende una región de inmunoglobulina de acuerdo con las reivindicaciones adjuntas a un péptido de relaxina, en donde el péptido terapéutico se une al extremo amino terminal de la región de inmunoglobulina de

acuerdo con un programa. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra dos veces por semana. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra una vez por semana. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra una vez cada dos semanas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra cuatro veces al mes. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra tres veces al mes. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra una vez al mes. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra en una infusión que dura una cantidad de tiempo indicada. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante seis horas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante cinco horas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante cuatro horas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante tres horas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante dos horas. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra durante una hora. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra por vía subcutánea. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra por vía intramuscular. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina se administra por vía intravenosa.

Usos adicionales

[0138] La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede usar en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad o afección heteroimunitaria, enfermedad inflamatoria, infección patógena, trastorno tromboembólico, enfermedad o afección respiratoria, enfermedad metabólica, trastorno del sistema nervioso central (SNC), enfermedad ósea o cáncer. En otros casos, la enfermedad o afección es un trastorno sanguíneo. En algunos casos, la enfermedad o afección es obesidad, diabetes, osteoporosis, anemia o dolor. La enfermedad o afección puede ser un trastorno del crecimiento. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca o enfermedad de las arterias coronarias. En algunas formas de realización, la enfermedad o afección es isquemia de reperusión asociada con trasplante de órganos sólidos (p. ej., pulmón, riñón, hígado, corazón), derivación cardiopulmonar para protección de órganos (p. ej., renal), accidente cerebrovascular isquémico, curación corneal (administración ocular), nefropatía diabética, cirrosis, hipertensión portal, cicatrización diabética, esclerosis sistémica, maduración cervical en el momento del parto, preeclampsia, hipertensión portal o fibrosis.

[0139] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad cardiovascular. La enfermedad cardiovascular puede ser insuficiencia cardíaca aguda. Las enfermedades cardiovasculares adicionales incluyen, pero no se limitan a insuficiencia cardíaca congestiva, insuficiencia cardíaca compensada o insuficiencia cardíaca descompensada. La enfermedad o afección puede ser un trastorno autoinmunitario. El trastorno autoinmunitario puede ser esclerodermia, esclerodermia difusa o esclerodermia sistémica. La enfermedad o afección puede ser una enfermedad inflamatoria. La enfermedad inflamatoria puede ser fibromialgia. La enfermedad o afección puede ser fibrosis. Alternativamente, la enfermedad o condición es el embarazo. La proteína de fusión de inmunoglobulina se puede usar para tratar la preeclampsia o inducir el parto. En algunas formas de realización, la insuficiencia cardíaca puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica. En algunas formas de realización, la proteína de fusión de inmunoglobulina puede usarse para tratar una enfermedad seleccionada del grupo que consiste en enfermedad cardiovascular, enfermedad pulmonar, enfermedad fibrótica, enfermedad renal, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, fibrosis del pulmón, corazón, riñón, médula ósea, hígado, fibrosis dermatológica, trastorno fibrótico del ojo, isquemia, enfermedad de Alzheimer, lesión de la córnea, enfermedad neurodegenerativa, enfermedad cardiovascular, enfermedad fibrótica, insuficiencia, pancreatitis, inflamación, cáncer, esclerodermia, fibrosis pulmonar, fibrosis renal, fibrosis hepática, trastornos tromboembólicos, daño por reperusión después de isquemia, lesiones micro y macrovasculares (vasculitis), trombosis arteriales y venosas, edemas, isquemias, infarto de miocardio, accidente cerebrovascular, ataque isquémico transitorio, protección cardiovascular en relación con operaciones de derivación de arterias coronarias, cardioprotección en relación con angioplastias coronarias transluminales percutáneas primarias (ACTP), ACTP después de trombólisis, ACTP de rescate, trasplantes de corazón y operaciones a corazón abierto, protección de órganos en relación con trasplantes, operaciones de derivación, exámenes con catéter y otros procedimientos quirúrgicos, trastornos respiratorios, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, bronquitis crónica, enfermedad pulmonar, asma, enfisema pulmonar, bronquiectasias, fibrosis quística (mucoviscidosis) e hipertensión pulmonar, en particular hipertensión arterial pulmonar, enfermedad renal, enfermedades renales agudas y crónicas e insuficiencia renal aguda y crónica, así como insuficiencia renal aguda y crónica con o sin necesidad de diálisis, enfermedades renales subyacentes o relacionadas, hipoperfusión renal, hipotensión inducida por diálisis, glomerulopatías, proteinuria glomerular y tubular, edema renal, hematuria, glomerulonefritis crónica (incluyendo primaria, secundaria o aguda), glomerulonefritis membranosa y membranoproliferativa, Síndrome de Alport, glomerulosclerosis,

enfermedades tubulares intersticiales, enfermedades nefropáticas, enfermedades renales primarias y congénitas, inflamación renal, enfermedades renales inmunológicas, rechazo de trasplante renal, enfermedades renales inducidas por inmunocomplejos, enfermedades nefropáticas inducidas por intoxicación, enfermedades renales diabéticas y no diabéticas, pielonefritis, riñones quísticos, nefroesclerosis, nefroesclerosis hipertensiva, síndrome nefrótico, enfermedades que se caracterizan y asocian diagnósticamente con una reducción anormal del aclaramiento de creatinina y/o excreción de agua, aumento anormal de las concentraciones sanguíneas de urea, nitrógeno, potasio y/o creatinina, alteración de la actividad de las enzimas renales incluyendo, sin limitación, glutamilsintetasa, osmolaridad y volumen de orina, aumento de microalbuminuria, macroalbuminuria, lesiones glomerulares y arteriolas, dilatación tubular, hiperfosfatemia, enfermedad que requiere diálisis para el tratamiento, carcinomas renales, después de resección incompleta del riñón, deshidratación por uso excesivo de diuréticos, aumento incontrolado de la presión arterial con hipertensión maligna, obstrucción e infección del tracto urinario, amiloidosis, enfermedades sistémicas asociadas con daño glomerular, lupus eritematoso, enfermedades sistémicas inmunológicas reumáticas, estenosis de la arteria renal, trombosis de la arteria renal, trombosis de la vena renal, nefropatía inducida por analgésicos, enfermedad renal poliquística, acidosis tubular renal, enfermedades renales intersticiales agudas y crónicas inducidas por medio de contraste e inducidas por fármacos, síndrome metabólico, dislipemia, efectos secundarios asociados con enfermedades renales agudas y/o crónicas, edema pulmonar, insuficiencia cardíaca, uremia, anemia, alteraciones electrolíticas, hiperpotasemia, hiponatremia, metabolismo óseo y de carbohidratos, enfermedades pulmonares, trastornos asmáticos, hipertensión arterial pulmonar (HAP), hipertensión pulmonar (HP), enfermedad del corazón izquierdo, VIH, anemia de células falciformes, tromboembolismos (HPTEC), sarcoidosis, hipertensión pulmonar asociada a EPOC, hipertensión pulmonar asociada a fibrosis pulmonar, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), síndrome de dificultad respiratoria aguda (SDRA), lesión pulmonar aguda (LPA), deficiencia de alfa-1-antitripsina (AATD), fibrosis pulmonar, enfisema pulmonar, enfisema pulmonar inducido por el humo del cigarrillo, fibrosis quística (FQ), trastornos fibróticos, trastornos fibróticos de los órganos internos, trastornos fibróticos del pulmón, trastornos fibróticos del corazón, trastornos fibróticos del riñón, trastornos fibróticos de la médula ósea, trastornos fibróticos del hígado, fibrosis dermatológica, trastornos oculares fibróticos, disfunción articular osteodegenerativa, vasoconstricción mediada por angiotensina-II (AngII), vasoconstricción mediada por endotelina-1 (ET-1), condiciones isquémicas, isquemia asociada con infarto de miocardio isquemia asociada con heridas, patologías renales, patologías renales relacionadas con vasoconstricción, hipertensión, aterosclerosis, diabetes tipo 1, diabetes tipo 2, enfermedad de las arterias coronarias, esclerodermia, accidente cerebrovascular, disfunción diastólica, hipercolesterolemia, hipertensión sistólica aislada, hipertensión primaria, hipertensión secundaria, hipertrofia ventricular izquierda, rigidez arterial asociada con el tabaquismo a largo plazo, rigidez arterial asociada con obesidad, rigidez arterial asociada con la edad, lupus eritematoso sistémico, preeclampsia e hipercolesterolemia.

[0140] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser utilizada en la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o afección cardiovascular. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser insuficiencia cardíaca aguda. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser hipertrofia cardíaca. La enfermedad cardiovascular puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de las válvulas cardíacas, inflamación del miocardio (miocarditis), crónica miocarditis, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica.

[0141] La enfermedad o afección puede ser una enfermedad autoinmunitaria, enfermedad heteroinmunitaria o afección, enfermedad inflamatoria, la infección patógena, trastorno tromboembólico, la enfermedad o estado respiratorio, enfermedad metabólica, trastorno del sistema nervioso central (SNC), enfermedades de los huesos o cáncer. En otros casos, la enfermedad o afección es un trastorno sanguíneo. En algunos casos, la enfermedad o afección es obesidad, diabetes, osteoporosis, anemia o dolor. La enfermedad o afección puede ser un trastorno del crecimiento.

[0142] La proteína de fusión de inmunoglobulina puede ser para uso en el tratamiento de una enfermedad cardiovascular o afección en un sujeto en necesidad del mismo. La enfermedad o afección se puede seleccionar entre insuficiencia cardíaca, síndrome coronario agudo, fibrilación auricular, fibrosis cardíaca y enfermedad de las arterias coronarias. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser insuficiencia cardíaca aguda. La enfermedad o afección cardiovascular puede ser hipertrofia cardíaca. La enfermedad cardiovascular puede comprender uno o más de: insuficiencia cardíaca aguda descompensada, insuficiencia cardíaca derecha, insuficiencia cardíaca izquierda, insuficiencia global, miocardiopatía isquémica, miocardiopatía dilatada, insuficiencia cardíaca asociada con defectos cardíacos congénitos, insuficiencia cardíaca asociada con defectos de las válvulas cardíacas, estenosis mitral, insuficiencia mitral, estenosis aórtica, insuficiencia aórtica, estenosis tricúspide, insuficiencia tricúspide, estenosis pulmonar, insuficiencia de la válvula pulmonar, insuficiencia cardíaca asociada con defectos combinados de la válvula cardíaca, inflamación del miocardio (miocarditis), miocarditis crónica, miocarditis aguda, miocarditis viral, insuficiencia cardíaca diabética, miocardiopatía alcohólica, insuficiencia cardíaca asociada con trastornos de almacenamiento cardíaco, insuficiencia cardíaca diastólica e insuficiencia cardíaca sistólica.

Propiedades farmacológicas

[0143] Se puede usar una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones en métodos para mejorar una o más propiedades farmacológicas de un péptido terapéutico. El método puede comprender producir una proteína de fusión de inmunoglobulina como se define en las reivindicaciones. Los ejemplos de propiedades farmacológicas pueden incluir, pero no se limitan a vida media, estabilidad, solubilidad, inmunogenicidad, toxicidad, biodisponibilidad, absorción, liberación, distribución, metabolización y excreción. La liberación puede referirse al proceso de liberación de un péptido terapéutico de la formulación farmacéutica. La absorción puede referirse al proceso de una sustancia que ingresa a la circulación sanguínea. La distribución puede referirse a la dispersión o diseminación de sustancias por los fluidos y tejidos del cuerpo. La metabolización (o biotransformación o inactivación) puede referirse al reconocimiento por parte de un organismo de la presencia de una sustancia extraña y la transformación irreversible de compuestos parentales en metabolitos hijas. La excreción puede referirse a la eliminación de sustancias del cuerpo.

[0144] La vida media de un péptido terapéutico puede ser mayor que la vida media del péptido no conjugado terapéutico. La vida media del péptido terapéutico puede ser mayor de 4 horas, mayor de 6 horas, mayor de 12 horas, mayor de 24 horas, mayor de 36 horas, mayor de 2 días, mayor de 3 días, mayor de 4 días, mayor de 5 días, mayor de 6 días, mayor de 7 días, mayor de 8 días, mayor de 9 días, mayor de 10 días, mayor de 11 días, mayor de 12 días, mayor de 13 días o mayor de 14 días cuando se administra a un sujeto. La vida media del péptido terapéutico puede ser superior a 4 horas cuando se administra a un sujeto. La vida media del péptido terapéutico puede ser superior a 6 horas cuando se administra a un sujeto.

[0145] La vida media del péptido terapéutico puede aumentar en al menos aproximadamente 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, o 20 o más horas. La vida media del péptido terapéutico puede aumentar al menos aproximadamente 2 horas. La vida media del péptido terapéutico puede aumentar al menos aproximadamente 4 horas. La vida media del péptido terapéutico puede aumentar al menos aproximadamente 6 horas. La vida media del péptido terapéutico puede aumentar al menos aproximadamente 8 horas.

[0146] La vida media de un péptido terapéutico puede ser al menos aproximadamente 1,5, 2, 2,5, 3, 3,5, 4, 4,5, 5, 5,5, 6, 6,5, 7, 7,5, 8, 8,5, 9, 9,5, o 10 veces mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en este documento puede ser al menos aproximadamente 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45 o 50 veces mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 2 veces mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 5 veces mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 10 veces mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado.

[0147] La vida media de un péptido terapéutico e inmunoglobulina descrita en este documento puede ser al menos aproximadamente 5%, 10%, 15%, 20%, 25%, 30%, 35%, 40%, 45%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 95% o 97% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico e inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente un 10% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 20% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 30% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 40% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado. La vida media de un péptido terapéutico y una inmunoglobulina descrita en el presente documento puede ser al menos aproximadamente 50% mayor que la vida media del péptido terapéutico no conjugado.

EJEMPLOS

[0148] Los datos de actividad proporcionados en los siguientes ejemplos se obtienen generalmente usando las proteínas de fusión de inmunoglobulina definidas en el ejemplo y ejemplificadas por la SEQ ID proporcionada. Debe entenderse que las actividades de cualquier proteína de fusión de inmunoglobulina descrita en el presente documento pueden potenciarse o atenuarse dependiendo de las condiciones que no se relacionen con la secuencia de la proteína de fusión de inmunoglobulina, p. ej., las condiciones de expresión y purificación. Los siguientes ejemplos que describen o se basan en una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende todas las características de la reivindicación independiente son ilustrativos de la invención; los otros ejemplos no son ilustrativos de la invención.

Ejemplo 1: Construcción de vectores de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina para la expresión en células de mamífero

[0149] Las secuencias de ácido nucleico de relaxina fueron sintetizadas por IDT (IA, EE. UU.), y se amplificaron por reacción en cadena de la polimerasa (PCR).

[0150] La relaxina2 (9GS) (SEQ ID NO: 33) se fusionó genéticamente a los ácidos nucleicos que codifican para cadenas pesadas de palivizumab 1, 2 o 3 (SEQ ID NOs: 6, 7, 8, respectivamente), utilizando una secuencia de ácido nucleico de conexión que codifica el péptido de conexión 16GS (SEQ ID NO: 60) mediante PCR solapada para generar palivizumab (NH1, 2 o 3, 16GS)-relaxina2(9GS) (SEQ ID NO: 18, 18, 19, respectivamente). Los vectores de expresión de mamíferos Palivizumab (NH1, 2 o 3, 16GS)-relaxina2 (9GS) que codifican palivizumab (NH1, 2 o 3, 16GS)-relaxina2 (9GS) se crearon mediante la ligadura en el marco del palivizumab amplificado (NH1, 2 o 3, 16GS)-relaxina2 (9GS) al vector de la columna vertebral pFuse (InvivoGen, CA).

[0151] El gen que codifica para la cadena ligera de palivizumab (SEQ ID NO: 1) se amplificó y cerró en el vector pFuse para generar un vector de expresión de mamífero pPalivizumab (L). Los vectores de expresión de mamíferos resultantes se verificaron mediante secuenciación de ADN.

Ejemplo 2: Expresión y purificación de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina

[0152] Proteínas de fusión de cadena pesada de palivizumab-relaxina fueron expresadas a través de co-transfección de células HEK293 de estilo libre con la cadena pesada de vectores de expresión de mamífero palivizumab-relaxina descritos en el Ejemplo 1 y un vector de expresión de mamíferos en cadena ligera de palivizumab. Las células se cultivaron en matraces agitadores a 125 rpm con medio de expresión de estilo libre 293 (Life Technologies) a 37°C con 5% de CO₂. Las proteínas expresadas se secretaron en el medio de cultivo y se recolectaron dos veces cada 48 horas después de la transfección. Las proteínas de fusión se purificaron mediante cromatografía de proteína A/G (Thermo Fisher Scientific, IL) y se analizaron mediante gel SDS-PAGE. Las proteínas de fusión de cadena pesada purificadas expresadas con la cadena ligera de palivizumab se muestran en los geles SDS-PAGE de la FIG. 1A, FIG. 1B y FIG. 1C. Para cada gel, el primer carril corresponde a un marcador molecular, el segundo carril corresponde a proteína purificada y el tercer carril corresponde a proteína purificada tratada con el agente reductor DTT. FIG. 1A muestra palivizumab purificado (NH1, 16GS)-relaxina2 (9GS) (SEQ ID NO: 20) y palivizumab L (SEQ ID NO: 9), colectivamente, SCX1. FIG. 1B muestra palivizumab purificado (NH2, 16GS)-relaxina2 (9GS) (SEQ ID NO: 21) y palivizumab L (SEQ ID NO: 9), colectivamente, SCX2. FIG. 1C muestra palivizumab purificado (NH3, 16GS)-relaxina2 (9GS) (SEQ ID NO: 22) y palivizumab L (SEQ ID NO: 9), colectivamente, SCX3.

Ejemplo 3: Actividad de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina para activar receptores de relaxina

[0153] Las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina purificadas en el Ejemplo 2 se examinaron por un ensayo de luciferasa. Las células HEK293 sobreexpresadas con el receptor de relaxina (LGR7) y el gen indicador del elemento sensible a AMPc (CRE)-luciferasa (Luc) se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% a 37°C con CO₂ al 5%. Las células se sembraron en placas de 384 pocillos durante 24 horas y posteriormente se trataron de forma independiente con diversas concentraciones de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina purificadas del Ejemplo 2 (SCX1, SCX2 o SCX3) o péptido de relaxina2 durante 24 horas más. A continuación, se midieron las intensidades de luminiscencia usando reactivo de luciferasa One-Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante. Los valores CE₅₀ se determinaron ajustando los datos a una función sigmoide logística: $y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$, donde A1 es el valor inicial, A2 es el valor final, x0 es el punto de inflexión de la curva y p es la potencia. La CE₅₀ para la relaxina-2 fue de 22,3 pM.

[0154] La CE₅₀ para SCX1 era 69,1 pM. La CE₅₀ para SCX2 era 61,2 pM. La CE₅₀ para SCX3 era 129 pM. Los curados correspondientes se muestran en la FIG. 2A (SCX1), FIG. 2B (SCX2) y FIG. 2C (SCX3).

Ejemplo 4: Unión de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina a epítipo de VSR

[0155] Para probar la reducción de la unión de proteína de fusión de palivizumab-relaxina a epítipo de VSR, un ensayo de unión VSR era realizado. Brevemente, se revistieron 0,1 µg de proteína VSR F en una placa de 96 pocillos. Se añadieron proteínas de fusión de palivizumab-relaxina como se describe en el Ejemplo 2, SCX1, SCX2 y SCX3, y un anticuerpo de palivizumab nulo a pocillos separados. Se añadió a cada pocillo IgG antihumana (específica de Fc) a una dilución 1:2000 en BSA al 2%, PBS. La intensidad de la fluorescencia se midió después de 25 y 50 minutos. Los gráficos de intensidad de fluorescencia frente a concentración de proteína de fusión se muestran en la FIG. 3A (25 min) y la FIG. 3B (50 min). Las tablas 11 y 12 muestran los datos correspondientes para cada constructo probado.

Tabla 11. Ensayo de unión de proteínas de fusión al epítipo de VSR (25 min)						
Nombre de la proteína	Cadena pesada	Cadena de luz	Rendimiento (mg/L)	LGR7 (nM)	LGR8 (nM)	Kd (nM)
SCX1	Palivizumab (NH1, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18,7	0.1285	939,2	111,9
SCX2	Palivizumab (NH2, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18	0.1154	326,6	14,4
SCX3	Palivizumab (NH3, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18	0,1146	16290	163,3
SC3	Palivizumab (nulo, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	25	0,205	177,1	0,425
Palivizumab nulo	Palivizumab (nulo)	Palivizumab L	11,6	N/D	N/D	0,80

Tabla 12. Ensayo de unión de proteínas de fusión al epítipo de VSR (50 min)						
Nombre de la proteína	Cadena pesada	Cadena de luz	Rendimiento (mg/L)	LGR7 (nM)	LGR8 (nM)	Kd (nM)
SCX1	Palivizumab (NH1, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18,7	0.1285	939,2	83,1
SCX2	Palivizumab (NH2, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18	0.1154	326,6	9.034
SCX3	Palivizumab (NH3, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	18	0,1146	16290	107,1
SC3	Palivizumab (nulo, 16GS)-relaxina2 (9GS)	Palivizumab L	25	0,205	177,1	0,249
Palivizumab nulo	Palivizumab (nulo)	Palivizumab L	11,6	N/D	N/D	0,49

Ejemplo 5: Construcción de anticuerpos de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizados

[0156] Los anticuerpos de proteína de fusión de palivizumab-relaxina optimizados fueron creados por el emparejamiento de varias mutaciones de la cadena pesada con diversas mutaciones de cadena ligera. Las mutaciones de cadena pesada incluyeron: NO (SEQ ID NO: 13), N99F, W100G, Y100_aG (SEQ ID NO: 22) y W100A (SEQ ID NO: 20). Las mutaciones de la cadena ligera incluyeron la línea germinal (SEQ ID NO: 10), S92N (SEQ ID NO: 11) y G91Y (SEQ ID NO: 12). Las mutaciones de Fc incluyeron WT y E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S. Los componentes de la construcción se resumen en la Tabla 13 a continuación.

Tabla 13. Resumen de proteínas de fusión optimizadas			
Constructos	Mutaciones de cadena pesada (CDR3H)	Mutaciones de cadenas ligeras (CDR3L)	Fc
RLX300 (SC3.s)	NO	*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX100	NO	*	WT
RLX303 intacto	N99F, W100G, Y100 _a G*	S92N*	WT
RLX301	N99F, W100G, Y100 _a G*	*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX302	N99F, W100G, Y100 _a G*	G91Y*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX303	N99F, W100G, Y100 _a G*	S92N*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX304	W100A	*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX305	W100A	G91Y*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
RLX306	W100A	S92N*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
SYN100	NO	*	WT
SYN200	NO	*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S
SYN300	N99F, W100G, Y100 _a G*	S92N*	E233P, L234V, L235A, ΔG236, A327G, A330S y P331S

Ejemplo 5: Medida de unión de VSR por los anticuerpos de proteína de fusión de palivizumab-relaxina

optimizados

[0157] Los anticuerpos de proteína de fusión palivizumab-relaxina optimizados se ensayaron para la unión a VSR mediante el ensayo de ELISA. Se revistieron 100 ng/pocillo de proteína VSR F en una placa de 96 pocillos en PBS a 4°C durante la noche. La placa se bloqueó con BSA/PBS al 2% a temperatura ambiente durante 1 hora, luego se lavó dos veces con 200 µL de PBS. Los anticuerpos de fusión se incubaron a diversas concentraciones (como se indica en la FIG. 4) en BSA/PBS al 2% a temperatura ambiente durante 1 hora. Las placas se lavaron con PBS (Tween-20 al 0,025% en PBS) cuatro veces y se lavaron con PBS una vez. Luego, las placas se incubaron con IgG antihumano conjugado con peroxidasa de rábano picante (específico de Fc) en PBS a temperatura ambiente durante 1 hora, se lavaron con PBS (Tween-20 al 0,025% en PBS) cinco veces, se desarrollaron con sustrato de peroxidasa fluorogénica QuantaBlu (Thermo Fisher Scientific, IL). La unión se cuantificó usando un lector de placas de fluorescencia Spectramax con excitación a 325 nm y emisión a 420 nm. Las curvas de unión se muestran en la FIG. 5. Se determinaron los valores de Kd de unión (Tabla 14).

Tabla 14. Ensayo de unión a proteínas de fusión (10 min)	
Proteína	Kd (nM)
RLX300 (sin mutaciones)	,301
RLX301	79,3
RLX302	37,7
RLX303	52,1
RLX304	38,2
RLX305	75,2
RLX306	82,7
Herceptin	1351

Ejemplo 6: Medición de la estabilidad térmica de anticuerpos de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizados

[0158] Se determinó la estabilidad térmica de anticuerpos de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizados. Los resultados de este ensayo se muestran en la Tabla 15 a continuación. Las estabilidades térmicas se midieron usando un colorante de unión a proteínas fluorescente (ensayo de cambio térmico de proteínas, Life Technologies Co., CA). Brevemente, se prepararon muestras con un volumen de trabajo de 20 µl por pocillo mezclando 5 µl de tampón de desplazamiento térmico de proteína, 2,5 µl de tinte de desplazamiento térmico de 8 x proteínas con 12,5 µl de anticuerpo (0,5 mg/ml) en tampón DPBS, cargado en una placa de PCR de pared delgada de 0,2 de 96 pocillos y sellado con película adhesiva óptica S MicroAmp®. Luego, se ejecutó una curva de fusión en un instrumento de PCR en tiempo real. Los datos se recopilaron a intervalos de 1°C desde 25°C hasta 99°C en el sistema de PCR en tiempo real StepOnePlus™ y se analizaron utilizando el software Protein Thermal Shift™.

Tabla 15. Estabilidad térmica de la proteína de fusión		
Proteína	1° Tm (°C)	2° Tm (°C)
RLX301	67,83 ± 0,19	85,4 ± 0,76
RLX302	67,95 ± 0,0	83,25 ± 0,38
RLX303	67,82 ± 0,19	83,66 ± 0,19
RLX304	67,82 ± 0,19	85,53 ± 0,57
RLX305	68,09 ± 0,19	83,39 ± 0,19
RLX306	68,09 ± 0,19	85,52 ± 0,0

Ejemplo 7: Expresión y purificación de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizadas

[0159] Proteínas de fusión de cadena pesada de palivizumab-relaxina se expresaron a través de cada co-transfección de células HEK293 de estilo libre con la cadena pesada de vectores de expresión de mamífero palivizumab-relaxina descritos en el Ejemplo 5. Las células se cultivaron en matraces agitadores a 125 rpm con medio de expresión de estilo libre 293 (Life Technologies) a 37°C con 5% de CO₂. Las proteínas expresadas se secretaron en el medio de cultivo y se recolectaron dos veces cada 48 horas después de la transfección. Las proteínas de fusión se purificaron mediante cromatografía de proteína A/G (Thermo Fisher Scientific, IL) y se analizaron mediante gel SDS-PAGE. Las proteínas de fusión de cadena pesada purificadas expresadas con la cadena ligera de palivizumab se muestran en los geles SDS-PAGE de las FIGs. 5A-F. Para cada gel, el primer carril corresponde a un marcador molecular, el segundo carril corresponde a proteína purificada y el tercer carril corresponde a proteína purificada tratada con el agente reductor DTT. FIG. 5A muestra RLX301 purificado (SEQ ID NO: 22) y (SEQ ID NO: 10). FIG. 5B muestra RLX302 purificado (SEQ ID NO: 22) y (SEQ ID NO: 12). FIG. 5C muestra RLX303 purificado (SEQ ID NO: 22) y (SEQ ID NO: 11). FIG. 5D muestra RLX304 purificado (SEQ ID NO: 20) y (SEQ ID NO: 10). FIG. 5E muestra RLX305 purificado (SEQ ID NO: 20) y (SEQ ID NO: 12). FIG. 5F muestra RLX306 purificado (SEQ ID NO: 20) y (SEQ ID NO: 11).

Ejemplo 8: Actividad de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizadas para activar los receptores de relaxina

[0160] Las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizadas purificadas en el Ejemplo 7 se examinaron por un ensayo de luciferasa. Las células HEK293 sobreexpresadas con el receptor de relaxina (LGR7) y el gen indicador del elemento sensible a AMPc (CRE)-luciferasa (Luc) se cultivaron en DMEM suplementado con FBS al 10% a 37°C con CO₂ al 5%. Las células se sembraron en placas de 384 pocillos durante 24 horas y posteriormente se trataron de forma independiente con diversas concentraciones de proteínas de fusión de palivizumab-relaxina purificadas del Ejemplo 7 (RLX301, RLX302, RLX303, RLX304, RLX305 o RLX306) o péptido de relaxina2 durante 24 horas más. A continuación, se midieron las intensidades de luminiscencia usando reactivo de luciferasa One-Glo (Promega) siguiendo las instrucciones del fabricante.

[0161] Los valores CE₅₀ se determinaron ajustando los datos a una función sigmoideal logística: $y = A2 + (A1-A2)/(1 + (x/x0)^p)$, donde A1 es el valor inicial, A2 es el valor final, x0 es el punto de inflexión de la curva y p es la potencia. La CE₅₀ para la relaxina-2 fue de 22 pM. La CE₅₀ para RLX301 era 72 pM. La CE₅₀ para RLX302 era 179 pM. La CE₅₀ para RLX303 era 86 pM. La CE₅₀ para RLX304 fue de 78 pM. La CE₅₀ para RLX305 fue de 98 pM. La CE₅₀ para RLX306 fue de 153 pM. Los curados correspondientes se muestran en la FIG. 6A (RLX301), FIG. 6B (RLX302), FIG. 6C (RLX303), FIG. 6D (RLX304), FIG. 6E (RLX305) y FIG. 6F (RLX306).

[0162] Las actividades de las proteínas de fusión de palivizumab-relaxina optimizadas, RLX 302 y RLX303, se examinaron adicionalmente usando la línea celular indicadora UL-hLGR7-Cre-Luc. La CE₅₀ para la relaxina-2 fue de 20 pM y SA fue de 1.000 unidades/μg. La CE₅₀ para RLX302 era 130 pM y SA fue de 5,9 unidades/μg. La CE₅₀ para RLX303 fue 93 pM y SA fue de 8,0 unidades/μg. Las curvas correspondientes se muestran en la FIG. 7A (RLX302) y FIG. 7B (RLX303).

Ejemplo 9: Caracterización de proteína RLX303

[0163] RLX303 se caracterizó por cromatografía de exclusión analítica y espectroscopia de masas-cromatografía líquida. Se confirmó que RLX303 contenía 96% de proteína monomérica RLX303 con masas correctas de cadena ligera y cadena pesada. Se encontró que la concentración de proteína era 26-29 mg/ml en PBS (pH 7,4). La cromatografía analítica de intercambio de tamaño se muestra en la FIG. 8A. La cromatografía líquida-espectroscopia de masas se muestra en la FIG. 8B.

Ejemplo 10: Estabilidad en suero de fusión de Relaxina-Ig

[0164] Se determinó la estabilidad en suero del péptido de relaxina-2, RLX302, y RLX303. Las proteínas se incubaron con suero, luego se midió la actividad en ensayos basados en células. Las fusiones de relaxina-Ig permanecieron estables durante 5 días en suero humano con aproximadamente un 15% de pérdida de actividad en suero cino. Más del 95% del péptido de relaxina-2 humana desaparece después de 5 días y la degradación es más rápida en suero cino que en suero humano. Las concentraciones de las muestras se determinaron mediante ELISA y se utilizó CL/EM para evaluar la estabilidad química de las fusiones Relaxina-Ig en suero. Las curvas de estabilidad se muestran en la FIG. 9A (péptido de relaxina-2), FIG. 9B (RLX302) y FIG. 9C (RLX303).

Ejemplo 11: Análisis PK de fusión Ig de relaxina

[0165] Propiedades farmacocinéticas de RLX302 y RLX303 se evaluaron en ratones usando una sola inyección IV en ratones CD1 a una dosis de 3,7 mg/kg (n=3). Se encontró una exposición y una vida media comparables entre las proteínas de fusión RLX302 y RLX303. Los datos farmacocinéticos para los experimentos con ratones se encuentran en la Tabla 16. Las curvas farmacocinéticas para los experimentos con ratones se muestran en la FIG. 10.

Tabla 16 Análisis PK de ratón				
Proteína	T _{1/2} (h)	T _{max} (h)	C _{max} . (nmol/L)	AUC (nmol·h/L)
RLX302	63,78	0,5	137,06	3023,74
RLX303	68,18	0,5	178,29	2372,33

[0166] Propiedades farmacocinéticas de RLX302 y RLX303 se evaluaron a través de una única inyección i.v. o s.c en ratas SD1 a una dosis de 2,1 mg/kg (n=3). Se encontró una exposición y una vida media comparables entre las proteínas de fusión RLX302 y RLX303. Para la dosificación s.c., en los animales dosificados con RLX302, las muestras de 2 de cada 3 ratas en el punto de tiempo 336 h estaban fuera del rango de detección. En los animales dosificados con RLX303 s.c., todos los animales estaban por debajo de la detección del ensayo en el punto de tiempo 336 h. Los datos farmacocinéticos para los experimentos con ratas se encuentran en la Tabla 17. Las curvas farmacocinéticas para los experimentos con ratas se muestran en la FIG. 11A y FIG. 11B.

Tabla 17 Análisis PK en ratas					
Ruta de dosificación	Proteína	T _{1/2} (hora)	T _{max} (hora)	C _{max} . (Nmol/L)	AUC (nmol·h/L)
IV	RLX302	68	0,33	226	1756
	RLX303	85	0,33	176	1750
S.C.	RLX302	91	48	11	1780
	RLX303	91	48	17	2795

Ejemplo 12: Análisis de farmacodinámica de ratón

[0167] Propiedades farmacodinámicas de RLX302 y RLX303 fueron evaluadas usando una dosis s.c. entre 0,02 a 0,6 mg/kg en ratones hembra estimulados con estrógenos CD1 (n=8-12). Los ratones se trataron con péptido de relaxina-2 humana como control. Se midió la anchura del ligamento interpúbico 1 semana después de la dosificación. Los datos farmacodinámicos se muestran en la FIG. 12A. Los ratones se trataron con péptido de relaxina-2 humana como control y se midió la amplitud de la sínfisis púbica 24 horas después de la inyección. Los datos de control se muestran en la FIG. 12B.

Ejemplo 13: Ensayos clínicos de fase 1

[0168] Se reclutan cohortes de 10 voluntarios, 8 'activos' y 2 de placebo, para evaluación de seguridad de dosis única ascendente y medidas de DP de RLX302 y RLX303 en voluntarios sanos. Se utilizan cinco niveles de dosis que tienen una dosis inicial ~0,1 mg/kg IV, grupos de dosis crecientes de medio logaritmo (0,1, 0,3, 1,0, 3,0, 10 mg/kg). Las dosis intravenosas se utilizan inicialmente para respaldar futuras indicaciones agudas/subagudas en las que se prefiere un inicio de acción rápido (según las diferencias observadas preclínicamente); también permite la interrupción de la infusión si ocurren eventos adversos agudos. Se utilizan 2-3 niveles de dosis (alto, medio, +/- bajo) con dosificación subcutánea (SC) para establecer la seguridad SC, la tolerabilidad local, la farmacocinética y la biodisponibilidad. Se especifican sujetos adicionales (opcionales) en el protocolo para agregar hasta 2 grupos de dosis inferior o intermedia según la seguridad/tolerabilidad/efectos de la EP. Los pacientes son seguidos durante 3 meses por PK, seguridad.

[0169] Para la evaluación de seguridad de dosis múltiple ascendente, se utilizan 5 grupos de dosis: dosificación de 1, 3, 10 mg/kg SC Q2w y 1,5 mg/kg Q1w. El grupo Q2w recibe 7 inyecciones SC durante 12 semanas; El grupo Q1w recibe 13 inyecciones durante 12 semanas. Cohortes de diez voluntarios sanos, 8 "activos" y 2 placebo, evaluación de seguridad y medidas de DP en voluntarios sanos. El objetivo es establecer la seguridad/tolerabilidad/PK y PD en todos los rangos de dosis en voluntarios sanos. El potencial de inmunogenicidad (ADA) se evalúa utilizando datos agrupados. Sujetos adicionales (2 cohortes opcionales) especificados en el protocolo para explorar frecuencias bajas, intermedias y alternas (Q mes, grupos adicionales Q1w) Seguimiento total durante 5 meses (desde la dosis inicial) para PK, seguridad.

Ejemplo 14: Ensayos clínicos de Fase 1b

[0170] Fusión de relaxina-inmunoglobulina de acción prolongada, RLX302 se estudia en un ensayo clínico de Fase 1b para reducir hospitalización por insuficiencia cardíaca, muerte cardiovascular, y disnea. El objetivo principal es, mediante el uso de grupos paralelos, un estudio aleatorizado, de seguridad controlada con Pbo, de tolerabilidad, PK y PD en sujetos con HFrEF estable compensada para respaldar la evaluación de la seguridad y la selección del rango de dosis para un programa de fase 2 de dosificación crónica en insuficiencia cardíaca crónica mediante: 1) Caracterizar la seguridad y tolerabilidad del RLX302 subcutáneo en pacientes con HFrEF estable compensada y 2) Caracterizar la PK de RLX302 subcutáneo en pacientes con HFrEF. El objetivo secundario es: 1) caracterizar los efectos de la EP cardíaca de RLX302 utilizando marcadores sanguíneos y de imágenes en una población de pacientes con HFrEF con NT-proBNP basal elevado (>600 pg/ml - TBD) y 2) caracterizar los efectos de la EP renal de RLX302 en una población de pacientes con HFrEF con NT-proBNP elevado al inicio (>600 pg/ml - TBD). Los objetivos terciarios incluyen caracterizar los efectos de RLX302 en los marcadores de daño cardíaco y los resultados clínicos relacionados con el efecto de RLX302 en la fisiología cardíaca y renal. Los criterios de valoración primarios son: 1) Medidas de seguridad que incluyen evaluaciones clínicas y de laboratorio estándar (BP, laboratorios clínicos, ECG, etc.), 2) PK y 3) evaluaciones de inmunogenicidad (ADA, EA). Los criterios de valoración secundarios incluyen: 1) Biomarcadores cardíacos: NT-proBNP, 2) Imágenes cardíacas (ecocardiografía transtorácica): Tamaño de la aurícula izquierda, FE, tensión, función diastólica, índices de remodelación y 3) Marcadores de fisiología/lesión renal: flujo sanguíneo renal, TFG, cistatina C, KIM1, BUN plasmático y creatinina. Los criterios de valoración terciarios incluyen: 1) eventos MACE, hospitalización por IC, muerte CV, mortalidad por todas las causas; 2) evaluación clínica compuesta (clasificación NYHA, Pt Global Assessment, MACE); 3) Hospitalización por insuficiencia renal; y 4) Ajustes en diuréticos y otros medicamentos para la HF (evidencia de intensificación de la terapia o posible efecto ahorrador de diuréticos) desde el inicio. Los objetivos estratégicos son: 1) Captura temprana de posibles beneficios biológicos y clínicos basados en mecanismos para permitir una inversión acelerada en actividades de desarrollo adicionales (toxina crónica, inicio de Ph 2, etc.) y 2) Activar puntos de transición en colaboración. El fundamento del estudio es evaluar la seguridad, la tolerabilidad y los primeros signos de eficacia de RLX302 en la principal población objetivo eventual de pacientes con HFrEF. Las fuertes señales biológicas y/o clínicas de los beneficios del tratamiento aumentarían la confianza para una mayor inversión y una posible aceleración de la línea de tiempo. Los objetivos clave

de los biomarcadores incluyen una reducción $\geq 30\%$ en NT-proBNP durante la primera semana de tratamiento. Los criterios de inclusión clave son: HFrEF, clase II-III de la NYHA, hospitalización reciente por IC dentro de los 3-6 meses, otros criterios de enriquecimiento para la IC de alto riesgo, p. ej., NT-proBNP ≥ 600 -900 pg/ml y eGFR (el límite se determinará según impacto proyectado en la matrícula). Los criterios de exclusión clave son HFpEF, CrCl < 30 (disfunción renal avanzada) y restricciones de PA similares a las de Pre-RELAX AHF/RELAX AHF/PARADIGM (p. ej. PAS < 100). Las características clave del ensayo son: 1) dosis múltiple aleatoria, doble ciego; 2) pacientes con HFrEF, 3) exposición de cuatro semanas (2 dosis S.C.), punto de tiempo de 4 semanas desde el inicio = criterio de valoración principal; las evaluaciones continuaron en las semanas 8 y 12 (finalización del estudio); 4) 2-3 niveles de dosis + placebo (aproximadamente 120 sujetos en total); y 5) análisis intermedio basado en datos de seguimiento de 1 o 2 semanas y reclutamiento del 75% - potencial para desencadenar inversiones en toxinas crónicas y/o fabricación de productos farmacéuticos. Los brazos de tratamiento incluirán PBO, niveles de dosis MTD, dosis media y baja guiadas por SAD en HV. Los tamaños de las muestras serán de 30 a 40 sujetos por brazo según las indicaciones de los datos disponibles.

[0171] Cambios clínicamente significativos dependientes de dosis en múltiples aspectos de potencial beneficio terapéutico se observan (como se describe en los objetivos claves de biomarcadores y abajo). Las señales son concordantes y de magnitud suficiente para excluir razonablemente un resultado casual. Los beneficios terapéuticos incluyen: reducción de NT-proBNP, reducción de hs-TnI/T, mejora de los parámetros de Echo, p. ej., reducción del tamaño de LA (en pacientes con un aumento del tamaño de LA al inicio del estudio), reducción de los signos clínicos de congestión (signos clínicos/uso de diuréticos, LFT), disminución de la creatinina sérica y BUN, mejoría de la hemodinámica renal (mejoría de la RPF con fracción de filtración reducida de GFR $\pm$ estable o mejorada), mejoría de la disnea (puntuaciones de síntomas; incluye DOE, PND), empeoramiento de la IC a lo largo de 4-12 semanas (durante la fase de tratamiento activo y/o período de seguimiento), ingreso hospitalario por ICA o insuficiencia renal durante 4 semanas (durante la fase de tratamiento activo y/o período de seguimiento). El tratamiento con RLX302 produce mejores resultados con esquemas de dosificación más convenientes que los tratamientos actuales basados en relaxina (p. ej., serelaxina).

Tabla 1. Secuencia de nucleótidos de cadena ligera (CL) y cadena pesada (CP) de inmunoglobulina

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab L	1	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCCGTGG GCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCTGTCCGTGGGCT ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGC TGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGTTACCCCTGACCATCTCCTCC CTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGGGCTCCG GCTACCCCTTACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGTCCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
Palivizumab L (línea germinal)	2	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCCGTGG GCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCTGTCCGTGGGCT ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGC TGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCAGCTTACCCCTGACCATCTCCTCC CTGCAGCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGGGCTCCG GCTACCCCTTACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGTCCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab L (G91Y)	3	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCCGTGG GCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCTGTCCGTGGGCT ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGC TGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGCCTTCACCCTGACCATCTCCTCC CTGCAGCCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGTACTCCG GCTACCCCTTCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAAAC GAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGA GCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAAC TTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCC CTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAA GCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCAT CAGGGCCTGTCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAG TGT
Palivizumab L (S92N)	4	GACATCCAGATGACCCAGTCCCCCTCCACCCTGTCCGCCTCCGTGG GCGACCGCGTGACCATCACCTGCAAGTGCCAGCTGTCCGTGGGCT ACATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCCGGCAAGGCCCCCAAGCTGC TGATCTACGACACCTCCAAGCTGGCCTCCGGCGTGCCCTCCCGCTT CTCCGGCTCCGGCTCCGGCACCGCCTTCACCCTGACCATCTCCTCC CTGCAGCCCCGACGACTTCGCCACCTACTACTGCTTCCAGGGCAAC GGCTACCCCTTCACCTTCGGCGGCGGCACCAAGCTGGAGATCAAA CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATG AGCAGTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTCTGTGCCTGCTGAATAA CTTCTATCCCAGAGAGGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGC CCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAG CAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAA AGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCA TCAGGGCCTGTCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGA GTGT

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab H	5	CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAGCCCACC CAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCA CCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTGGTGGGACGACAAGAAGGACT ACAACCCCTCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTC CAAGAACCAGGTGGTGTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGA CACCGCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCAACTGGTAC TTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCT CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTGCGACAAAACCTCACA CATGCCCACCGTGCCAGCACCTCCAGTCGCCGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCTCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTGAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab H2	6	CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAGCCCACC CAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCA CCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGAAGG CCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTGGTGGGACGACAAGAAGGACT ACAACCCCTCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTC CAAGAACCAGGTGGTGTCTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGA CACCGCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCAACGCCTAC TTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCCT CCACCAAGGGCCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGAAGTCAAGGCGCCCTGAC CAGCGCGGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGAAGTGTGCCCTTAGCAGCTTGGGCA CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA AGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTGCGACAAAACCTCACA CATGCCACCGTGCCAGCACCTCCAGTCGCCGGACCGTCAGTCTT CCTCTTCCCTCCAAAACCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG TGTGGTCAGCGTCCTACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTC CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC CACAGGTGTACACCCTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA ACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCAGCG ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGAGAACAAC TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab H3	7	<u>CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAGCCCACC</u> <u>CAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCA</u> <u>CCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGG</u> <u>CCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTGGTGGGACGACAAGAAGGACT</u> <u>ACAACCCCTCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTC</u> <u>CAAGAACCAGGTGGTGCTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGA</u> <u>CACCGCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCAACGGCTAC</u> <u>TTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCCT</u> <u>CCACCAAGGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAG</u> <u>CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA</u> <u>CTTCCCGAACCAGGTGACGGTGTCTGTGGAATCAGGCGCCCTGAC</u> <u>CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCTCAGGACTC</u> <u>TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCA</u> <u>CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA</u> <u>AGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTGCGACAAAATCACA</u> <u>CATGCCACCGTGCCAGCACCTCCAGTCGCCGGACCGTCAGTCTT</u> <u>CCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACC</u> <u>CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT</u> <u>GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT</u> <u>GCCAAGACAAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG</u> <u>TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGG</u> <u>CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTC</u> <u>CATCGAGAAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC</u> <u>CACAGGTGTACACCCTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA</u> <u>ACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG</u> <u>ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAAC</u> <u>TACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTCC</u> <u>TCTACAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG</u> <u>AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT</u> <u>ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA</u>

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab H4	8	<u>CAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACTGGTGAAGCCCACC</u> <u>CAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCCGGCTTCTCCCTGTCCA</u> <u>CCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCCGGCAGCCTCCCGGCAAGG</u> <u>CCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTGGTGGGACGACAAGAAGGACT</u> <u>ACAACCCCTCCCTGAAGTCCCGCCTGACCATCTCCAAGGACACCTC</u> <u>CAAGAACCAGGTGGTGCTGAAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGA</u> <u>CACCGCCACCTACTACTGCGCCCGCTCAATGATTACCTTCGGGGGC</u> <u>TTCGACGTGTGGGGAGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCCT</u> <u>CCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCTCCTCCAAGAG</u> <u>CACCTCTGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTA</u> <u>CTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGAC</u> <u>CAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTC</u> <u>TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCA</u> <u>CCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCA</u> <u>AGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTTCGACAAAACCTCACA</u> <u>CATGCCCACCGTGCCAGCACCTCCAGTCGCCGGACCGTCAGTCTT</u> <u>CCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCTCATGATCTCCCGGACC</u> <u>CCTGAGGTACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCT</u> <u>GAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAAT</u> <u>GCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCG</u> <u>TGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCTTGCACCAAGGACTGGCTGAATGG</u> <u>CAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAAAGGCCCTCCCAAGCTC</u> <u>CATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAAC</u> <u>CACAGGTGTACACCTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGA</u> <u>ACCAGGTACGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCG</u> <u>ACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAAAC</u> <u>TACAAGACCACGCCTCCCGTGTCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCC</u> <u>TCTACAGCAAGCTACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGG</u> <u>AACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACT</u> <u>ACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA</u>

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de cadena ligera (CL) y cadena pesada (CP) de inmunoglobulina

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Palivizumab L	9	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPDDEFATYYCFQGSYGYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Palivizumab L (línea germinal)	10	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISLQPDDEFATYYCFQGSYGYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

(Continuación)

Tabla 2. Secuencia de aminoácidos de cadena ligera (CL) y cadena pesada (CP) de inmunoglobulina		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Palivizumab L (G91Y)	11	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYYCFQYSGYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Palivizumab L (S92N)	12	DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCKCQLSVGYMHWYQQKPGKAPKLLI YDTSKLASGVPSRFSGSGSGTAFTLTISSLQPDDFATYYCFQNGYPFT FGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
Palivizumab H	13	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALE WLADIWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTAT YYCARSMITNWFYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Palivizumab H1	14	QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALE WLADIWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTAT YYCARSMITNAYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
Palivizumab H2	15	<u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALE</u> <u>WLADIWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTAT</u> <u>YYCARSMITNGYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG</u> <u>TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV</u> <u>VTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPP</u> <u>VAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDG</u> <u>VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK</u> <u>GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPS</u> <u>DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN</u> <u>VFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

(Continuación)

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Palivizumab H3	16	<u>QVTLRESGPALVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQPPGKALE</u> <u>WLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTAT</u> <u>YYCARSMITFGGFDVWGAGTTVTYSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGT</u> <u>AALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVV</u> <u>TVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV</u> <u>AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV</u> <u>EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKG</u> <u>LPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSD</u> <u>IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF</u> <u>SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK</u>

Tabla 3. Proteína de fusión de inmunoglobulina-secuencia de nucleótidos

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab (NH1, 16GS) Relaxina2 (9GS)	17	<i>GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGCGGGTCGTGAACCTGG</i> <i>TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG</i> <i>GGGTGGGAGCGGGGGAGGCGGACAGCTGTACTCTGCTCTGGCTA</i> <i>ACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTT</i> <i>CTGC</i><u><i>GGCGGAGGCGGATCCGGAGGCGGAGGTTCCGGCGGGGG</i></u> <u><i>TGGGAGCGGGCAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACT</i></u> <u><i>GGTGAAGCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCC</i></u> <u><i>GGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCC</i></u> <u><i>GGCAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTG</i></u> <u><i>GTGGGACGACAAGAAGGACTACAACCCTCCCTGAAGTCCCG</i></u> <u><i>CCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGCTG</i></u> <u><i>AAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTACT</i></u> <u><i>GCGCCCGCTCAATGATTACCAACGCCTACTTCGACGTGTGGGG</i></u> <u><i>AGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGC</i></u> <u><i>CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG</i></u> <u><i>GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC</i></u> <u><i>CGAACC</i></u><i>GGTGACGGTGTCTGGA</i><u><i>ACTCAGGCGCCCTGACCAG</i></u> <u><i>CGGCGTGCACACCTTCCCCGGCTGTCTTACAGTCTCAGGACTC</i></u> <u><i>TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGA</i><u><i>CTGTGCCCTCTAGCAGCTTGG</i></u> <u><i>GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCA</i></u> <u><i>ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGA</i><u><i>ACCCAAATCTTGCGACA</i></u> <u><i>AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTCCAGTCGCCCG</i></u> <u><i>ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTC</i></u> <u><i>ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACG</i></u> <u><i>TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG</i></u> <u><i>ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG</i></u> <u><i>AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCTCACCCT</i></u> <u><i>CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA</i></u> <u><i>GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTCCATCGAGAAAACCATC</i></u> <u><i>TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC</i></u> <u><i>CTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTGAGCC</i></u> <u><i>TGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGT</i></u> <u><i>GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACTACAAGAC</i></u> <u><i>CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA</i></u> <u><i>GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG</i></u> <u><i>ICTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA</i></u> <u><i>CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA</i></u> </u></u>

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Palivizumab (NH2, 16GS) Relaxina2 (9GS)	18	----- GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG GGGTGGGAGCGGGGGAGGCGGACAGCTGTACTCTGCTCTGGCTA ACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCACAAACGTTCTCTGGCTCGTTT CTGCGGCGGAGGCGGATCCGGAGGCGGAGGTTCCGGCGGGGG TGGGAGCGGGCAGGTGACCCTGCGCGAGTCCGGCCCTGCACT GGTGAAGCCACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCTCC GGCTTCTCCCTGTCCACCTCCGGCATGTCCGTGGGCTGGATCC GGCAGCCTCCCGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCTGACATCTG GTGGGACGACAAGAAGGACTACAACCCCTCCCTGAAGTCCCG CCTGACCATCTCCAAGGACACCTCCAAGAACCAGGTGGTGCTG AAGGTGACCAACATGGACCCCGCCGACACCGCCACCTACTACT GCGCCCGCTCAATGATTACCAACGGCTACTTCGACGTGTGGGG AGCCGGTACCACCGTGACCGTGTCTTCCGCCTCCACCAAGGGC CCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTG GGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCC CGAACCGGTGACGGTGTCTGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAG CGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCCTCAGGACTC TACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGG GCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCAGCA ACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAACCCAAATCTTGCACACA AAACTCACACATGCCACCGTGCCAGCACCTCCAGTCGCCCGG ACCGTCAGTCTTCTCTTCCCTCCAAAACCCAAGGACACCCTC ATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTACACATGCGTGGTGGTGGACG TGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGG ACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGG AGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGT CCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAA GGTCTCCAACAAAGGCCTCCCAAGCTCCATCGAGAAAACCATC TCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGAACCACAGGTGTACACC CTGCCTCCATCCCGGGATGAGCTGACCAAGAACCAGGTACGCC TGACCTCCCTGCTCAAAAGCCTGCTATCCGACGGACATCCGGCT GGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACCTACAAGAC CACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTACA GCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACG TCTTCTCATGCTCCGTGATGCATGAGGCTCTGCACAACCACTA CACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGATAA

45

Tabla 4. Proteína de fusión de inmunoglobulina-Secuencia de aminoácidos		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Palivizumab (NH1, 16GS) Relaxina2 (9GS)	20	DSWMEEVIKLCGRELVRQAIAICGMSTWSGGGGSGGGGQLYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC<u>GGGGSGGGSGGGSG</u>QVTLRESGPALV KPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRPPGKALEWLADIWWD DKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARS MITNAYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Palivizumab (NH2, 16GS) Relaxina2 (9GS)	21	DSWMEEVIKLCGRELVRQAIAICGMSTWSGGGGSGGGGQLYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC<u>GGGGSGGGSGGGSG</u>QVTLRESGPALV KPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRPPGKALEWLADIWWD DKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARS MITNGYFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Palivizumab (NH3, 16GS) Relaxina2 (9GS)	22	DSWMEEVIKLCGRELVRQAIAICGMSTWSGGGGSGGGGQLYSALAN KCCHVGCTKRSLARFC<u>GGGGSGGGSGGGSG</u>QVTLRESGPALV KPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMSVGWIRPPGKALEWLADIWWD DKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQVVLKVTNMDPADTATYYCARS MITFGGFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAAL GCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVT VPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP PVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTC LVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTV DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
Para las SEQ ID NO: 20-22 Región de inmunoglobulina = <u>subrayado punteado</u> Péptido / péptido terapéutico = en <i>cursiva</i> péptido/péptido terapéutico enlazador interno = <i>cursiva</i> Péptido de conexión = <u>negrita, subrayado grueso</u>		
Linker = <u>doble subrayado</u>		
Sitio de proteasa: <u>subrayado</u>		

Tabla 5. Secuencia de péptidos-nucleótidos terapéuticos

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Relaxina2	23	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTAAACG TTCTCTGTCTCAGGAAGACGCTCCGCAGACCCCGCGTCCGGTTGC TGAAATCGTTCCGTCTTTCATCAACAAAGACACCGAAACCATCAACA TGATGTCTGAATTCGTTGCTAACCTGCCGCAGGAACTGAAACTGAC CCTGTCTGAAATGCAGCCGGTCTGCCGCAGCTGCAGCAGCACGT TCCGGTTCTGAAAGACTCTTCTCTGCTGTTTGAAGAATTCAAAAAAC TGATCCGTAACCGTCAGTCTGAAGCTGCTGACTCTTCTCCGTCTGA ACTGAAATACCTGGGTCTGGACACCCACTCTCGTAAAAAACGTCAG CTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCACCA AACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2 (XT100)	24	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTAAACG <u>TGGAGGTGGCGGGAGCGGCACTTCTGAGTCTGCTACTCCAGAAAG</u> <u>CGGCCAGGTTCTGAACCAGCAACTTCTGGCTCTGAGACTCCAGG</u> <u>CACTTCTGAGTCCGCAACGCCTGAATCCGGTCTGGTTCTGAACCA</u> <u>GCTACTTCCGGCAGCGAAACCCAGGTACCGGAGGTGGCGGGAG</u> <u>CCACCATCACCACCACCGAGGTGGCGGGAGCTCTGAGTCTGC</u> <u>GACTCCAGAGTCTGGTCTTCCACTGAGCCTAGCGAGGG</u> <u>TTCCGCACCAGGTTCTCCGGCTGGTAGCCCGACCAGCACGGAGGA</u> <u>GGGTACGTCTGAATCTGCAACGCCGGAATCGGGCCCAGGTTCCGA</u> <u>GGGAGGAGGTGGCGGGAGCCGTAAAAAACGTCAGCTGTACTCTG</u> <u>CTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCT</u> <u>GGCTCGTTTCTGC</u>
Relaxina2 (XT35)	25	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTAAACG <u>TGGAGGTGGCGGGAGCTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCG</u> <u>AATCTGCTACACCGGAAAGCGGTGGAGGTGGCGGGAGCCACCAT</u> <u>CACCACCACCACCGAGGTGGCGGGAGCCCTGGCAGCCCTGGTCC</u> <u>GGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGGGCTCCGCACCAGGAGGTG</u> <u>GCGGGAGCCGTAAAAAACGTCAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACA</u> <u>AATGCTGCCACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTG</u> <u>C</u>
Relaxina2 (sencillo)	26	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTTCTGG <u>CAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTACACCGGAAAGCGG</u> <u>TCCTGGCAGCCCTGGTCCGGGCACTAGCACCGAGCCATCGGAGG</u> <u>GCTCCGCACCACAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCA</u> <u>CGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC</u>

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Relaxina2 (péptido de insulina C)	27	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTCGTCG TGAAGCTGAAGACCTGCAGGTTGGTCAGGTTGAACTGGGTGGTGG TCCGGGTGCTGGTTCTCTGCAGCCGCTGGCTCTGGAAGGTTCTCT GCAGAAACGTCAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCAC GTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2 (XT21)	28	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTAC CTGGTCTTCTGGCAGCGAAACCCCGGGTACCTCCGAATCTGCTAC ACCGGAAAGCGGTCTTGGCAGCCCTCAGCTGTACT CTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCACCAAACGTTT TCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2a	29	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTAAACG T
Relaxina2b	30	CGTAAAAAACGTCAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCC ACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2 (30GS)	31	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG GGGAGGCAGCGGGGGAGGCGGGTCCGGAGGCGGGGGATCTGGC GGGGGAGGCAGTGGGGGAGGCGGGAGCGGAGGCGGGGGCTCT CAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCA CCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2 Q60A (30GS)	32	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG GGGAGGCAGCGGGGGAGGCGGGTCCGGAGGCGGGGGATCTGGC GGGGGAGGCAGTGGGGGAGGCGGGAGCGGAGGCGGGGGCCCT GCGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGTTGGTTGCA CCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC
Relaxina2 (9GS)	33	GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACGTGTCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG GGGTGGGAGCGGGGGAGGCGGACAGCTGTACTCTGCTCTGGCTA ACAATGCTGCCACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTT CTGC
Relaxina2c (9GS)	34	GATTCATGGATGGAGGAGGTCATCAAACGTGTGTGGCAGGGAGCTG GTGAGAGCACAGATCGCTATCTGTGGGATGAGCACCTGGAGTGGC GGGGGAGGGAGCGGGGGAGGCGGACAGCTGTACTCTGCACTGG CCAATAAATGCTGCCACGTTGGGATGTACCAAGAGATCTCTGGCAC GGTTTTGT

(Continuación)

NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
Relaxina2 (GGGPRR)	35	<i>GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG AGGGCCCCGCCGGCAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTG CCACGTTGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC</i>
Relaxina2 (18GS)	36	<i>GACTCTTGGATGGAAGAAGTTATCAAACCTGTGCGGTCGTGAACTGG TTCGTGCTCAGATCGCTATCTGCGGTATGTCTACCTGGTCTGGCGG AGGCGGATCCGGGGGCGGGGGTTCCGGCGGGGGTGGGAGCGG GGGAGGCCAGCTGTACTCTGCTCTGGCTAACAAATGCTGCCACGT TGGTTGCACCAAACGTTCTCTGGCTCGTTTCTGC</i>
Para SEQ ID NO: 23-36 Región de inmunoglobulina = <u>subrayado discontinuo</u> Péptido/péptido terapéutico = <i>cursiva</i> Péptido/péptido terapéutico enlazador interno = <i>cursiva</i> Péptido de conexión = <u>subrayado grueso y en negrita</u> Enlazador = <u>subrayado doble</u> Sitio de proteasa: <u>subrayado</u>		

Tabla 6. Péptidos terapéuticos-Secuencia de aminoácidos		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Relaxina2	37	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRSLSQEDAPQTTPRVAEI VPSFINKDTETINMMSEFVANLPQELKLTSEMOPALPQLQOHVPVL KDSSLLFEFVKLRNRQSEAADSSPSELKYLGLDTHSRKKRQLYSALA NKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (XT100)	38	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRGGGSGTSESATPESG PGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTGGGGSHHHH HHGGGSSSESATPESGPGTSTEPSEGSAPGSPAGSPTSTEEGTSESATP ESGPGSEGGGGSRKKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (XT35)	39	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKRGGGSSGSETPGTSESA TPESGGGGGSHHHHHHGGGGSPGSPGPGTSTEPSEGSAPGGGSR KKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (sencillo)	40	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGSETPGTSESATPESGPG SPGPGTSTEPSEGSAPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (péptido de insulina C)	41	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSRREAEDLOVGOVELGGGP GAGSLQPLALEGSLQKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (XT21)	42	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGSETPGTSESATPESGPG SPQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2a	43	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSKR</i>
Relaxina2b	44	<i>RKKRQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
cadena relaxin A	45	<i>QLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>

(Continuación)

Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
cadena relaxina B	46	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWS</i>
Relaxina2 (30GS)	47	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGGSGGGSGGGSGGGGGSGG</i> <i>GGSGGGSGGGGSQLYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 Q60A (30GS)	48	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGGSGGGSGGGSGGGGGSGG</i> <i>GGSGGGSGGGGPPALYSALANKCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (9GS)	49	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGGSGGGGQLYSALAN</i> <i>KCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2c (9GS)	50	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGGSGGGGQLYSALAN</i> <i>KCCHVGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (GGGPRR)	51	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGPRRQLYSALANKCCH</i> <i>VGCTKRSLARFC</i>
Relaxina2 (18GS)	52	<i>DSWMEEVIKLCGRELVRAQIAICGMSTWSGGGGSGGGSGGGSGGGGGSGG</i> <i>GQLYSALANKCCHVGCTKRSLARF</i>
Para SEQ ID NO: 37-52 Región de inmunoglobulina = <u>subrayado discontinuo</u> Péptido/péptido terapéutico = <u>enlazador en cursiva</u> = <i>cursiva</i> Péptido/péptido terapéutico interno Péptido de conexión = <u>negrita, subrayado grueso</u> Enlazador = <u>subrayado doble</u> Sitio de la proteasa: <u>subrayado</u>		

Tabla 7. Conexión de secuencias de péptidos		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
(GGGGS) _n	53	<u>GGGGS</u> n = 1-10
(GGGGG) _n	54	<u>GGGGG</u> n = 1-10
CEXa	55	<u>NGGPSSGAPPPSGGGGG</u>
CEXb	56	<u>GGPSSGAPPPSGGGGG</u>
EAAAK	57	<u>EAAAKEAAAKEAAAK</u>
CEXGGGGS	58	<u>GGPSSGAPPPSGGGGS</u>
XT21	59	<u>SGSETPGTSESATPESGPGSP</u>
16GS	60	<u>GGGGSGGGSGGGGGSG</u>

Tabla 8.-Secuencias de enlaces		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
Enlazador a	61	<u>GGGGG</u>
Enlazador b	62	<u>GGGGS</u>

Tabla 9.-Secuencias del enlazador interno		
Nombre	SEQ ID NO	Secuencia
XT100	63	<u>GTSESATPESGPGSEPATSGSETPGTSESATPESGPGSEPATSGS</u> <u>ETPGTGGGGSHHHHHHGGGGSESATPESGPGTSTEPSEGSAP</u> <u>GSPAGSPTSTEEGTSESATPESGPGSEG</u>
XT35	64	<u>SGSETPGTSESATPESGGGGSHHHHHHGGGGSPGSPGPGTS</u> <u>TEPSEGSAP</u>
Péptido de insulina C	65	RREAEDLQCGQVELGGGPGAGSLQPLALEGSLQKR
XT21	66	SGSETPGTSESATPESGPGSP
XT35 (noHIS)	67	SGSETPGTSESATPESGPGSPGPGTSTEPSEGSAP
30GS	68	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
9GS	69	GGGGSGGGG
18GS	70	GGGGSGGGGSGGGGSGGG
GGGPRR	71	GGGPRR.

Tabla 10.-Secuencias de aminoácidos de inmunoglobulina		
NOMBRE	SEQ ID NO	SECUENCIA
CP CDR1	72	TFSGFSLSTSGMSVG
CP CDR2	73	DIWWDDKKDYNPSLKS
CP CDR3 original	74	SMITNWYFDV
CP CDR3	75	SMITX(1)X(2)X(3)FDV; X(1) es F, A, G o P; X(2) es G, A, S, T o P; X(3) es G, A, V, L o P
CP CDR3	76	SMITX(1)X(2)X(3)FDV; X(1) es F, A, G o P; X(2) es W, G, A, S, T o P; X(3) es Y, G, A, V, L o P
CP CDR3	77	SMITX(1)X(2)X(3)FDV; X(1) es N, F, A, G o P; X(2) es G, A, S, T o P; X(3) es Y, G, A, V, L o P
CP CDR3	78	SMITX(1)X(2)X(3)FDV; X(1) es N, F, A, G o P; X(2) es W, G, A, S, T o P; X(3) es G, A, V, L o P
CP CDR3	79	SMITFGGFDV
CP CDR3	80	SMITNAYFDV
CP CDR3	81	SMITNGYFDV
CP CDR3	82	SMITFWYFDV
CP CDR3	83	SMITFGYFDV
CP CDR3	84	SMITFAYFDV
CP CDR3	85	SMITFAGFDV
CP CDR3	86	SMITNGGFDV
CP CDR3	87	SMITNAGFDV
CP CDR3	88	SMITNWGFDV
CL CDR1	89	KCQLSVGYMH
CL CDR2	90	DTSKLAS
CL CDR3 (original)	91	FQSGGYPFT
CL CDR3	92	FQX(4)X(5) GYPFT; X(4) es G, Y, F, W, P, L, V o A; X(5) es S, N, G, A, V, L o P
CL CDR3	93	FQX(4)X(5) GYPFT; X(4) es Y, F, W, P, L, V o A; X(5) es S, N, G, A, V, L o P
CL CDR3	94	FQX(4)X(5) GYPFT; X(4) es G, Y, F, W, P, L, V o A; X(5) es N, G, A, V, L o P
CL CDR3	95	FQYSGYPFT
CL CDR3	96	FQGNGYPFT
CL CDR3	97	FQYNGYPFT
HCF _C	98	DKTHTCPPCPAPPVAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGK

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína de fusión de inmunoglobulina que comprende un péptido terapéutico conectado a un dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado configurado para tener una unión reducida al antígeno VSR-F en comparación con un dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado;

10 donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende una región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13 donde la CDR3 de cadena pesada se selecciona de SEQ ID NOS: 79 y 80, y una región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9 donde la la cadena CDR3 comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91; y

 donde el dominio de unión al antígeno de palivizumab no modificado comprende la región variable de cadena pesada de SEQ ID NO: 13, y la región variable de cadena ligera de SEQ ID NO: 9.
- 15 2. La proteína de fusión de inmunoglobulina de la reivindicación 1, en la que el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende la SEQ ID NO: 79.
- 20 3. La proteína de fusión de inmunoglobulina de la reivindicación 1, en la que el dominio de unión al antígeno de palivizumab modificado comprende la SEQ ID NO: 80.
- 25 4. La proteína de fusión de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, donde la secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos consecutivos de SEQ ID NO: 91 comprende al menos 5 aminoácidos de SEQ ID NO: 91.
5. La proteína de fusión de inmunoglobulina de una cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos de SEQ ID NO: 91 comprende al menos 6 aminoácidos de SEQ ID NO: 91.
6. La proteína de fusión de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos de SEQ ID NO: 91 comprende al menos 7 aminoácidos de SEQ ID NO: 91.
- 30 7. La proteína de fusión de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que la secuencia que comprende al menos 4 aminoácidos de SEQ ID NO: 91 comprende al menos 8 aminoácidos de SEQ ID NO: 91.
8. La proteína de fusión de inmunoglobulina de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, en la que el dominio de unión del antígeno de palivizumab modificado comprende la SEQ ID NO: 91.

35

FIG. 1A

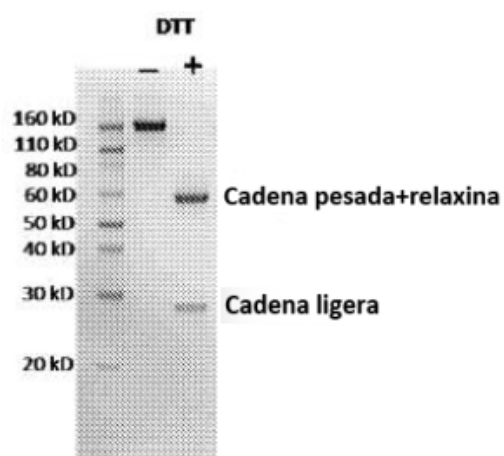


FIG. 1B

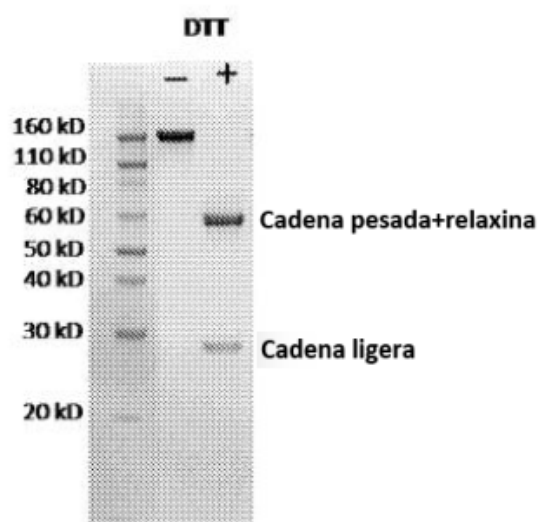


FIG. 1C

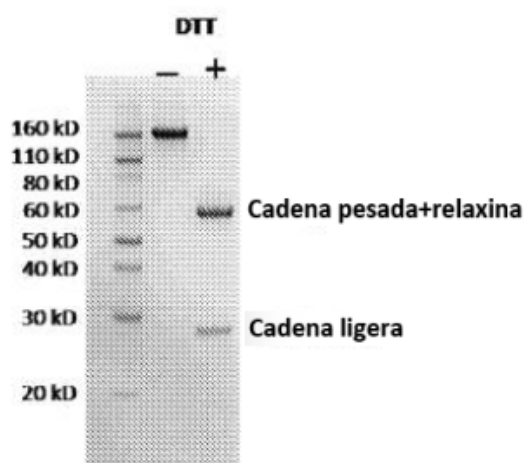


FIG. 2A

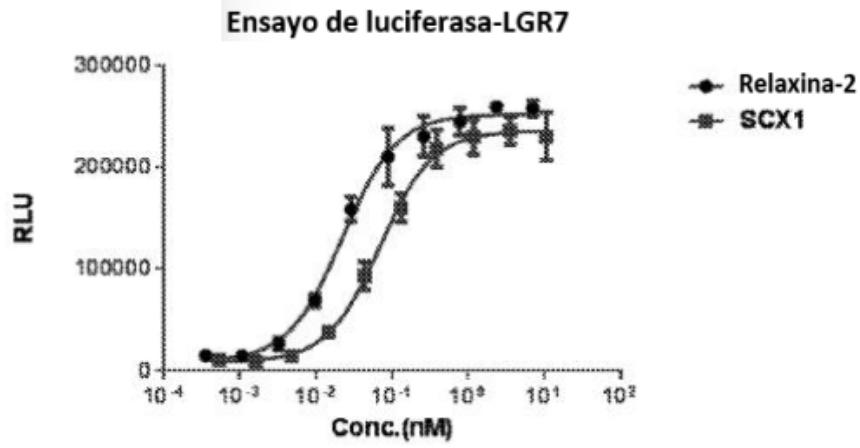


FIG. 2B

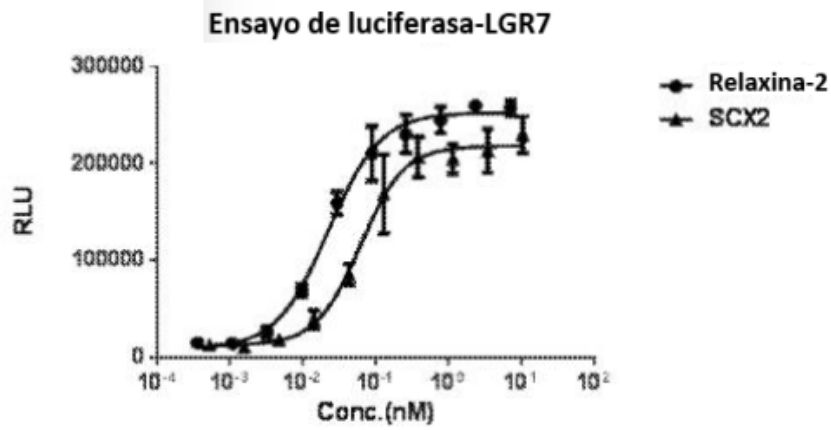


FIG. 2C

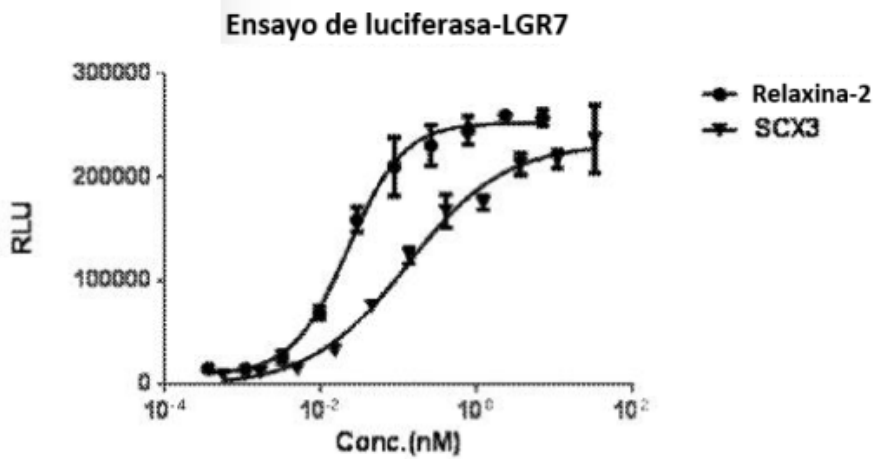


FIG. 3A

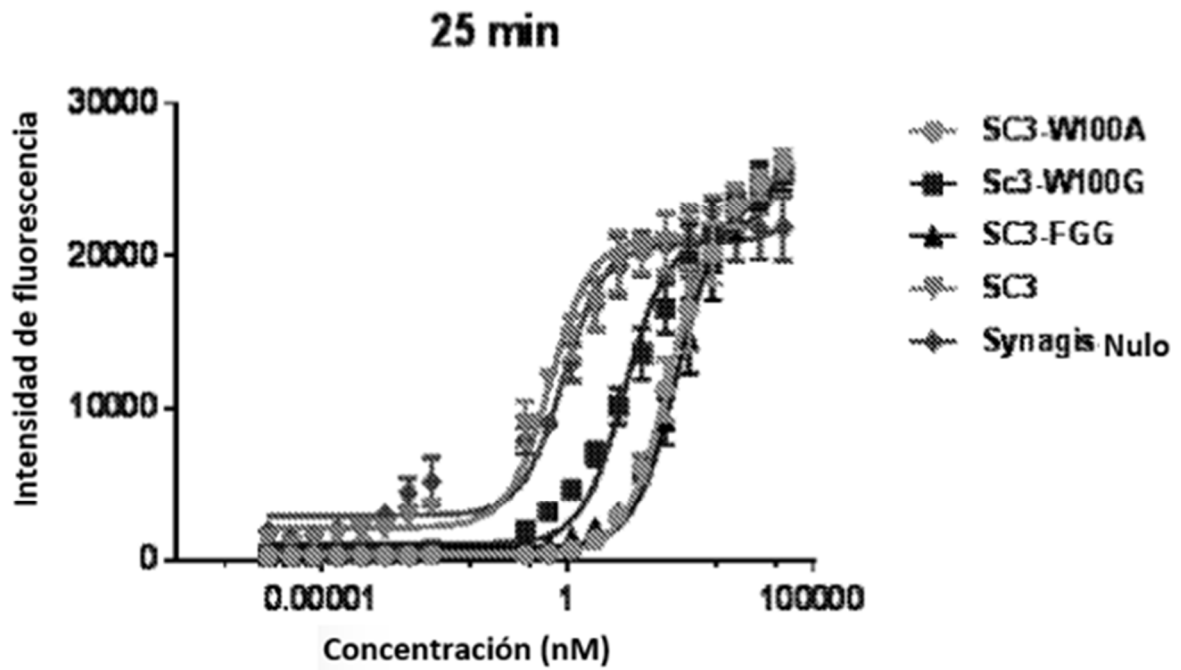


FIG. 3B

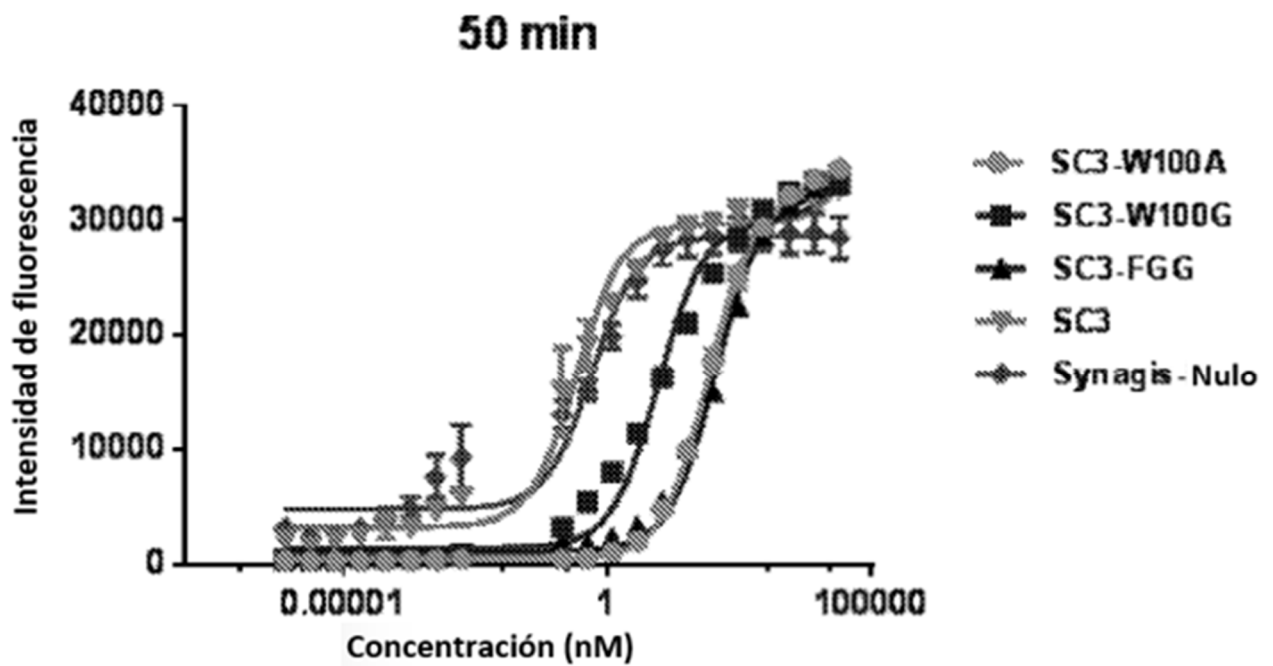


FIG. 4

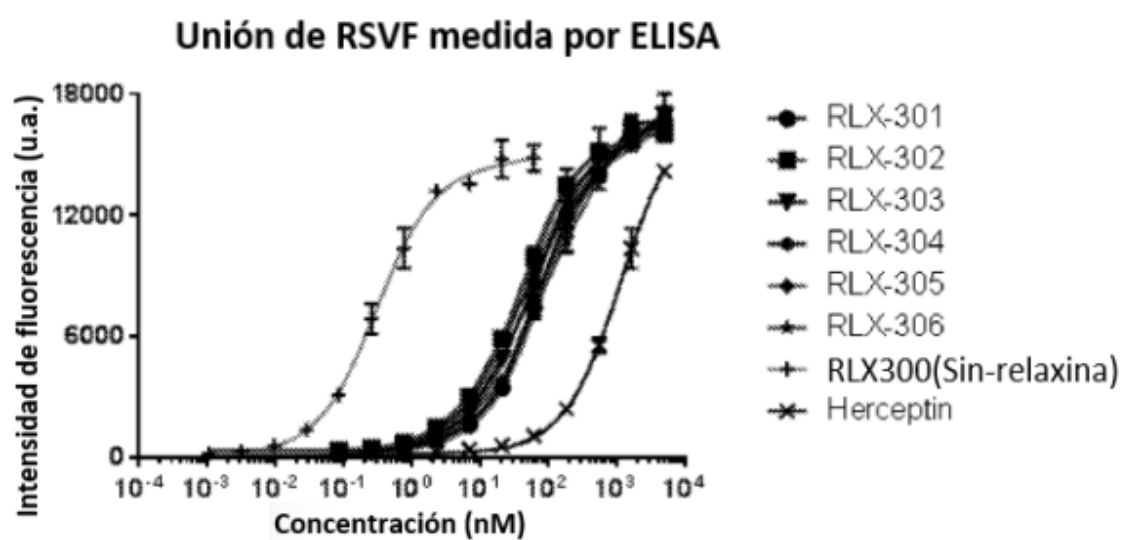


FIG. 5A

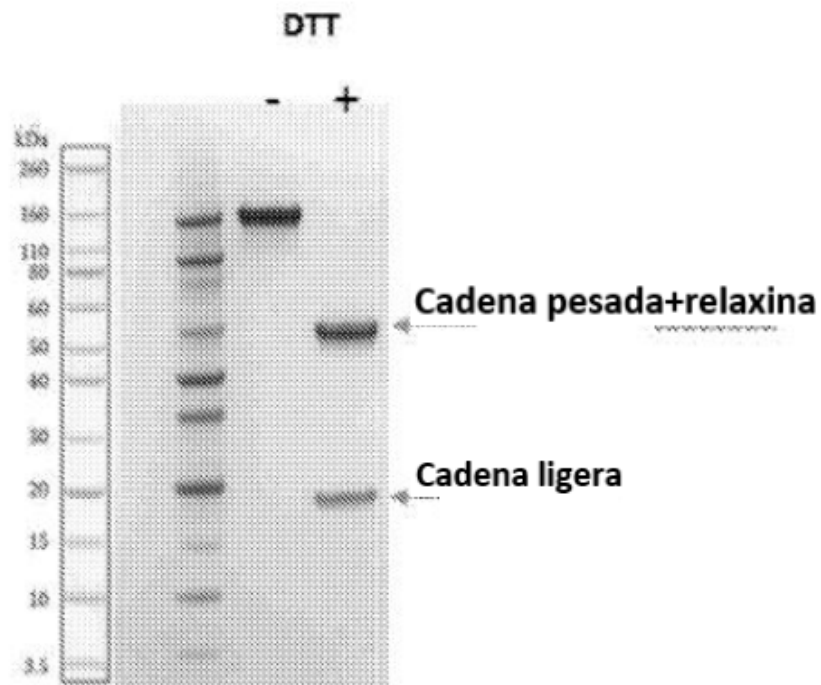


FIG. 5B

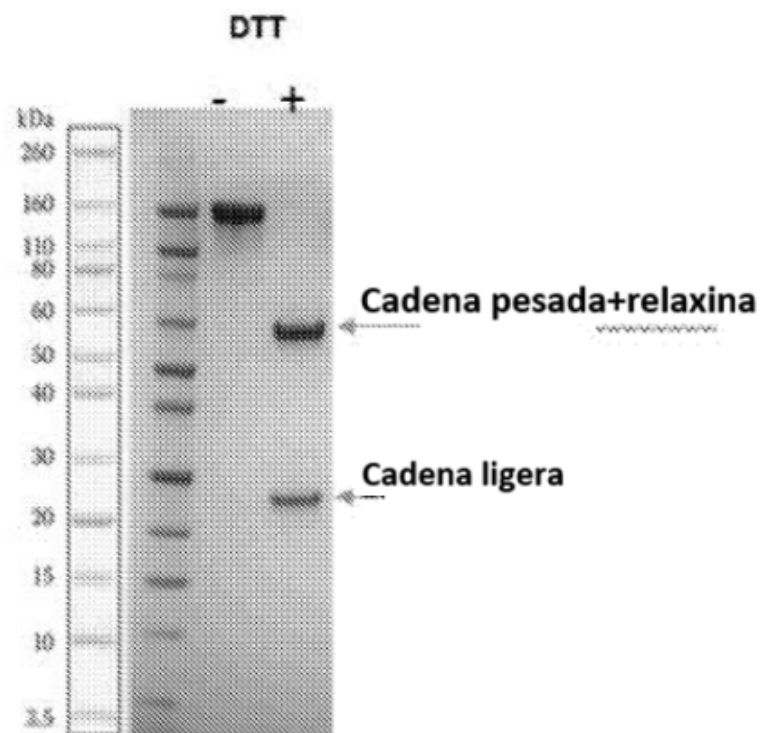


FIG. 5C

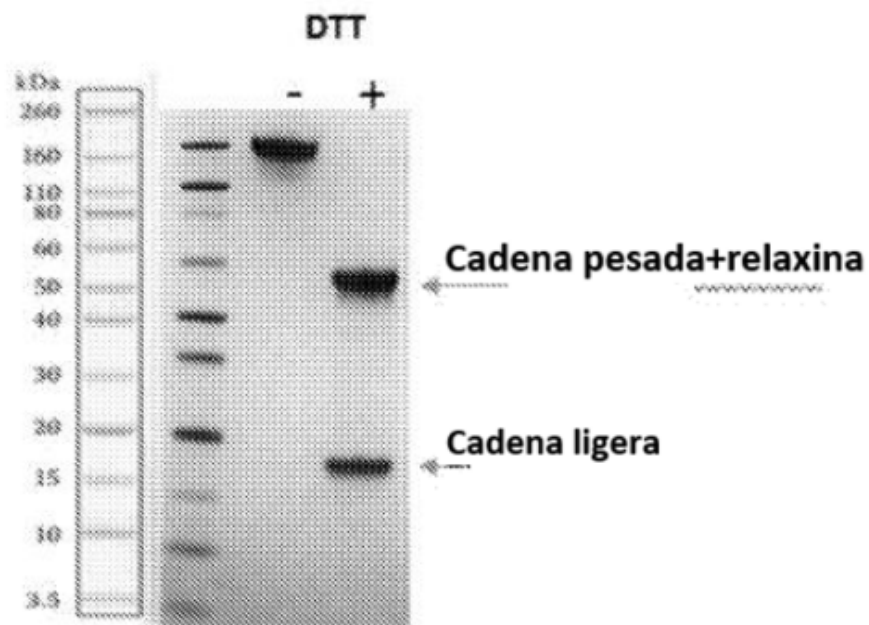


FIG. 5D

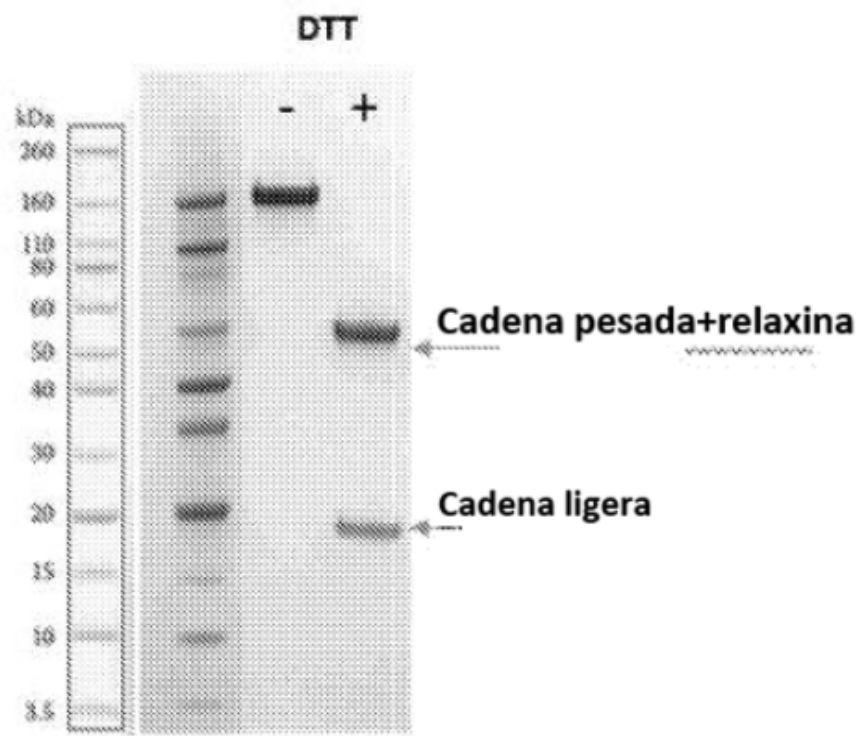


FIG. 5E

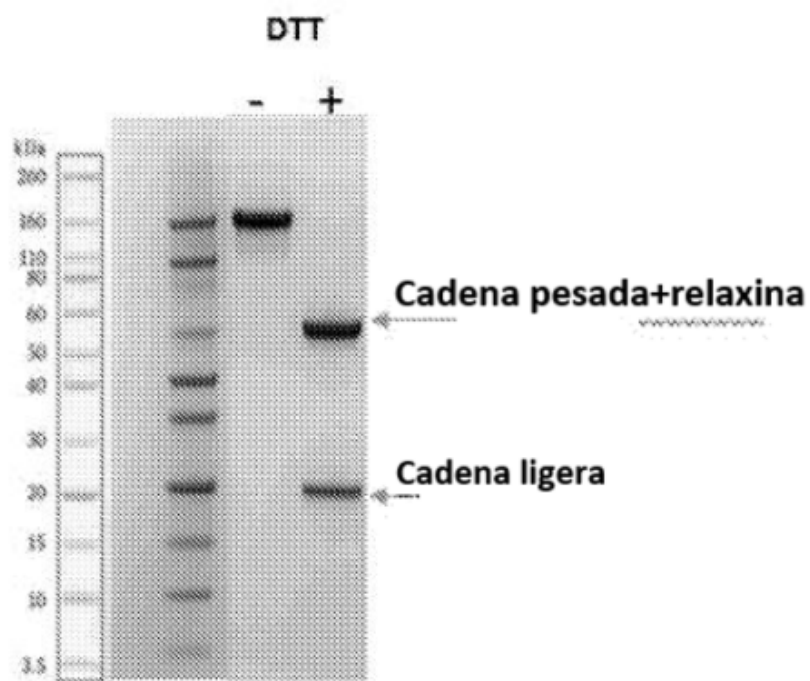


FIG. 5F

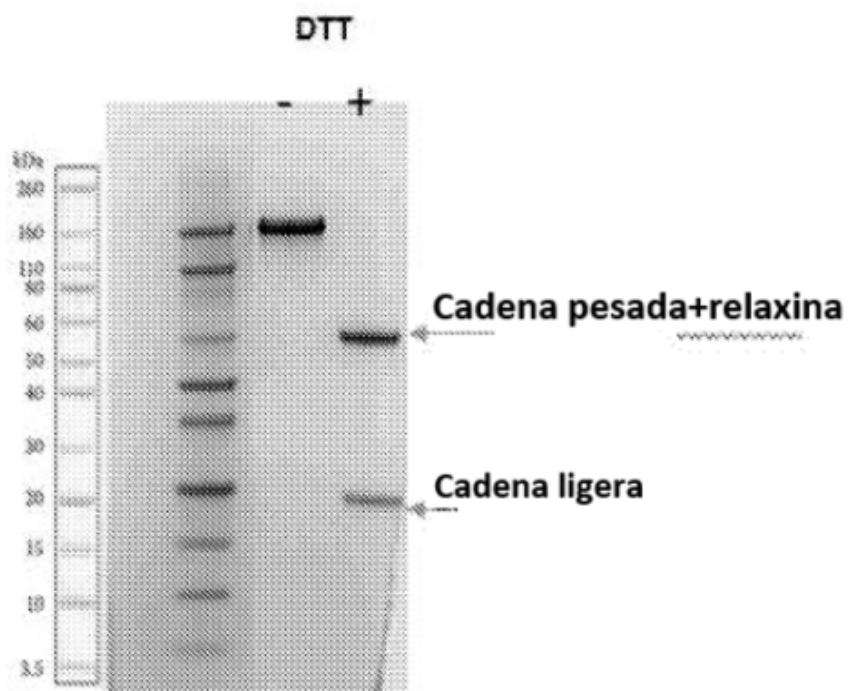


FIG. 6A

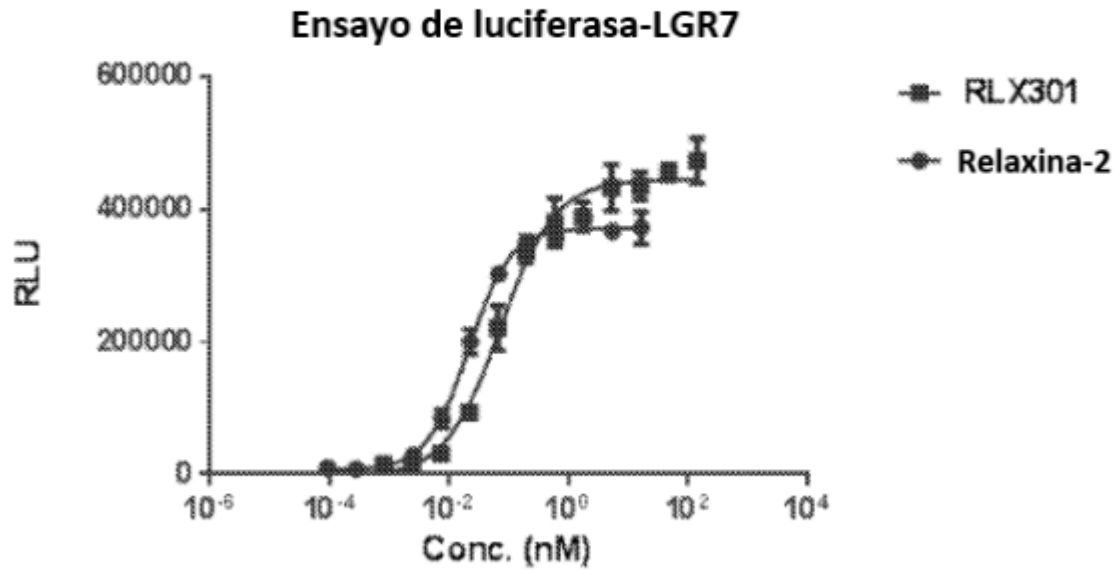


FIG. 6B

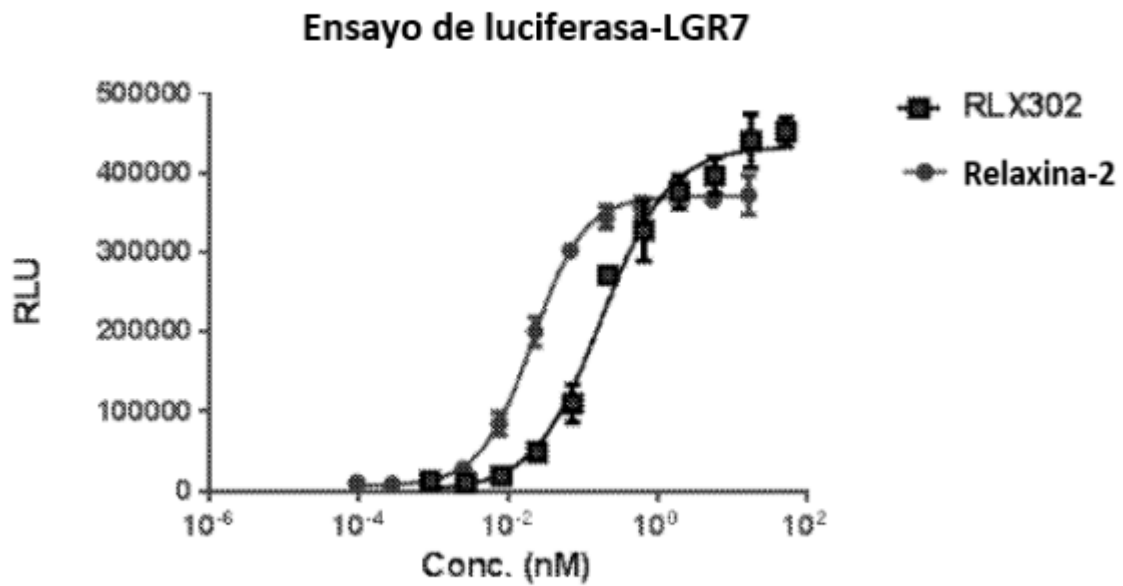


FIG. 6C

Ensayo de luciferasa-LGR7

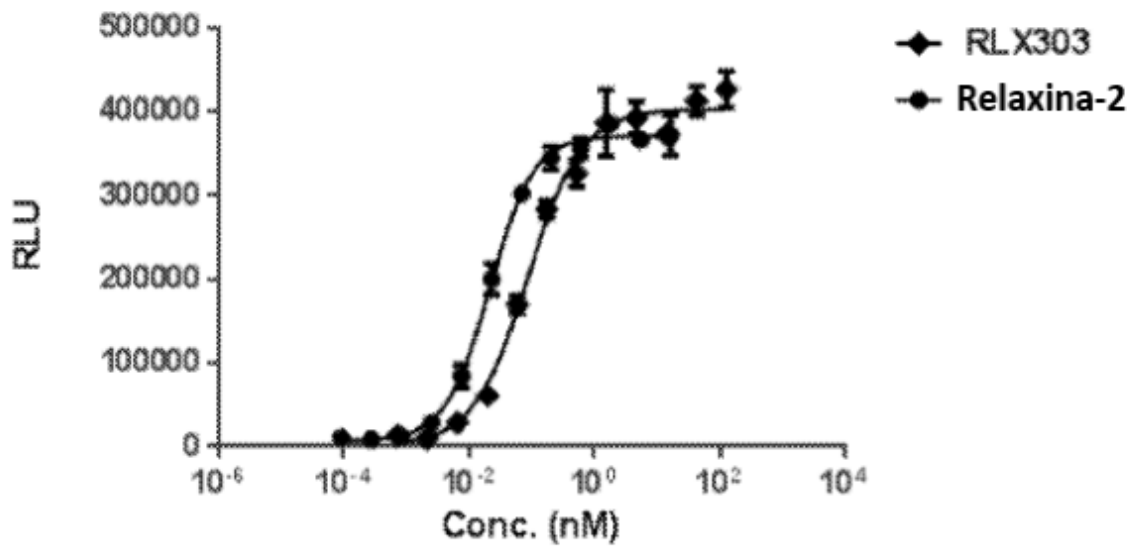


FIG. 6D

Ensayo de luciferasa-LGR7

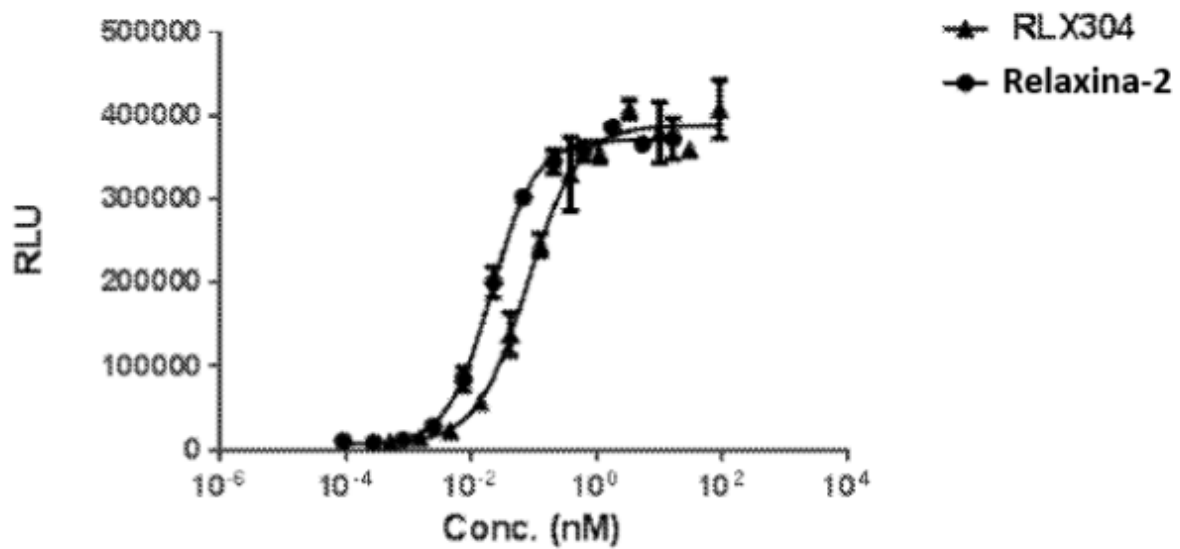


FIG. 6E



FIG. 6F

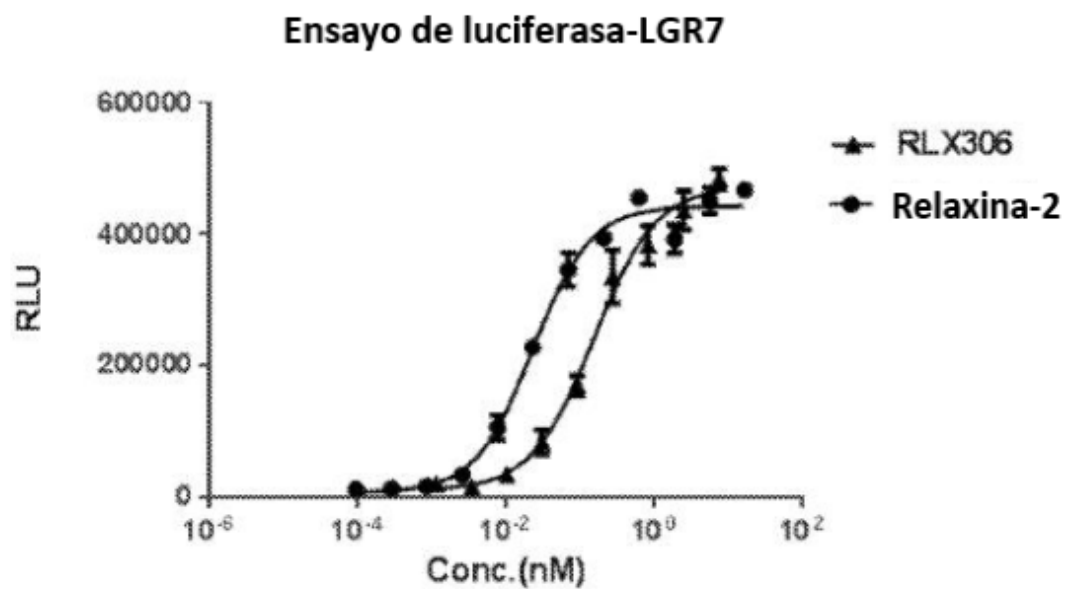


FIG. 7A

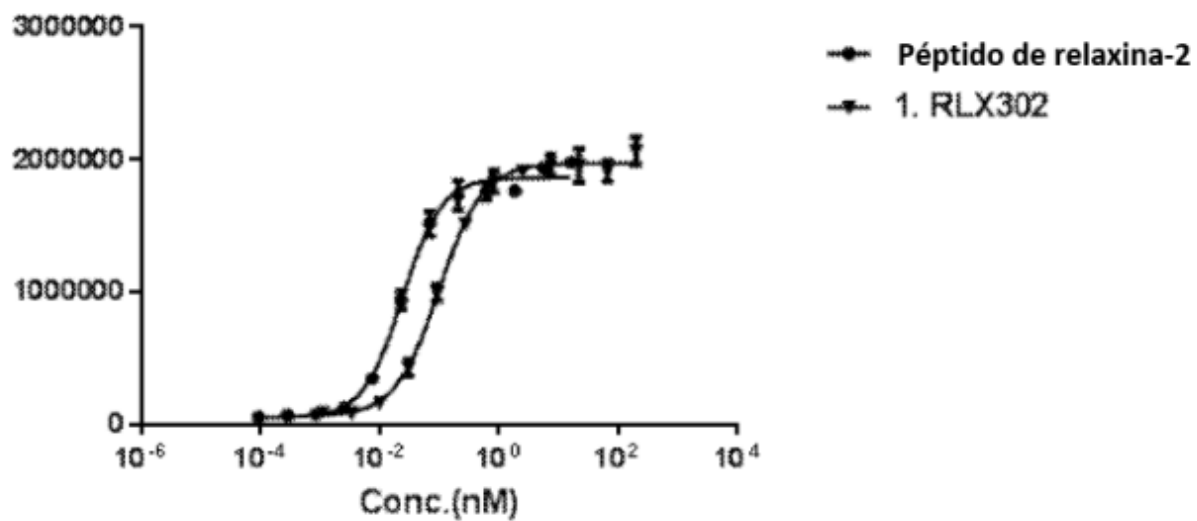


FIG. 7B

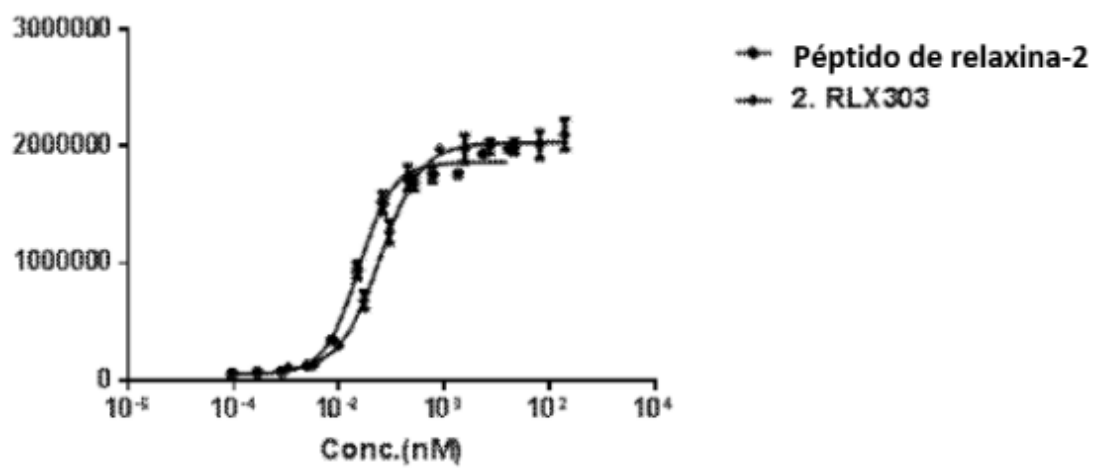
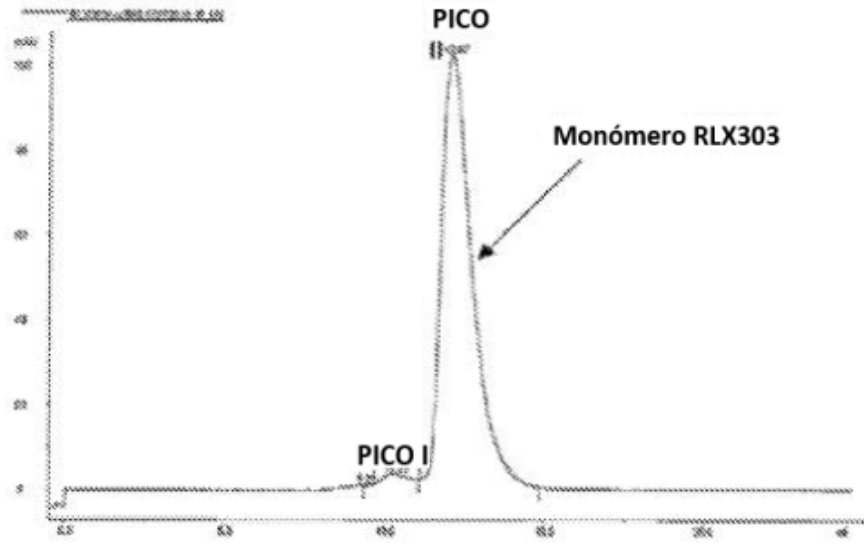


FIG. 8A



Agregación y oligómero no específico ~ 3,2%

FIG. 8B

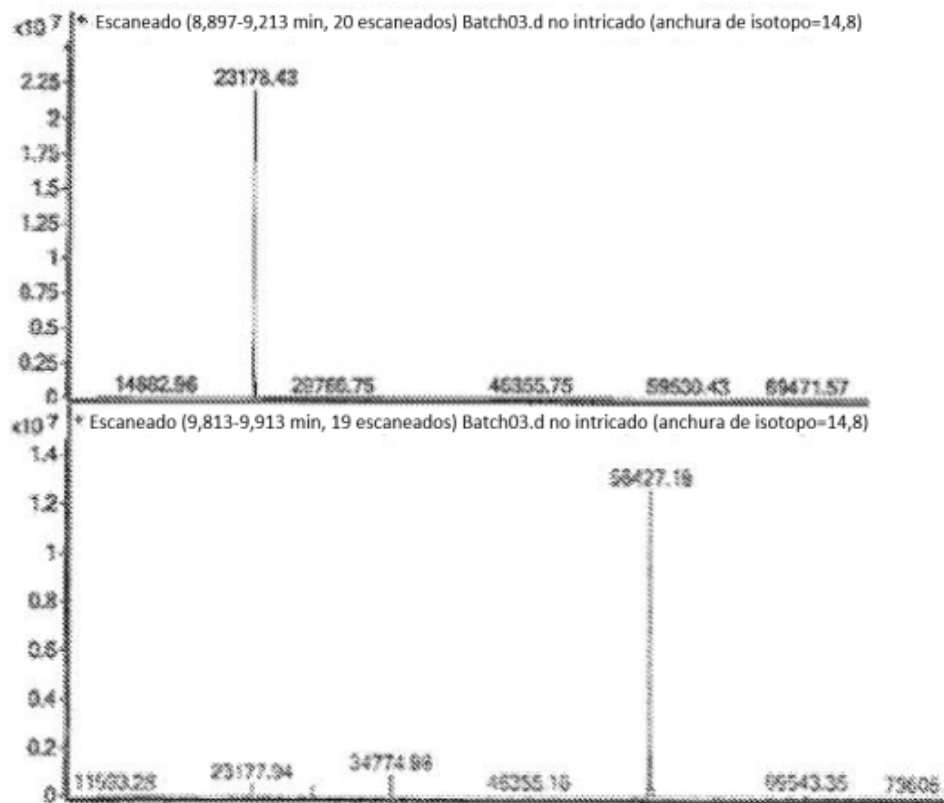


FIG. 9A

Péptido de relaxina2

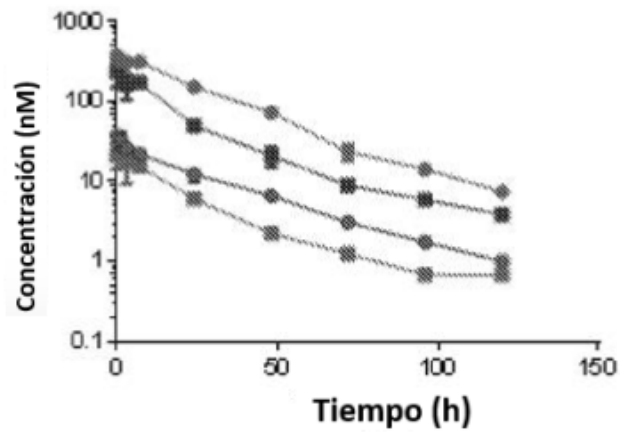


FIG. 9B

RLX302

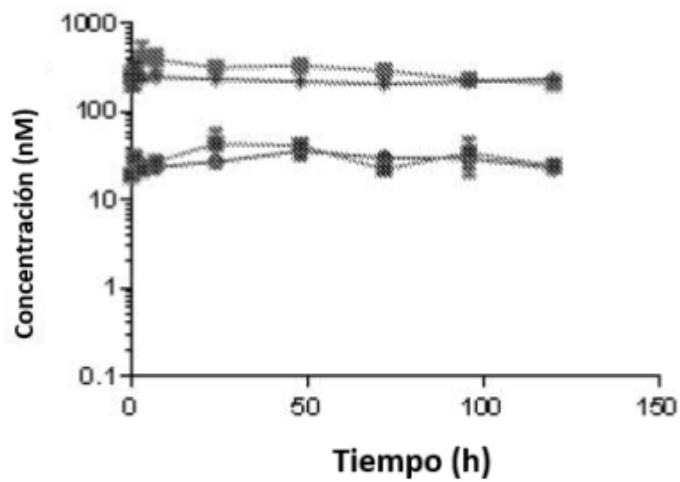


FIG. 9C

RLX303

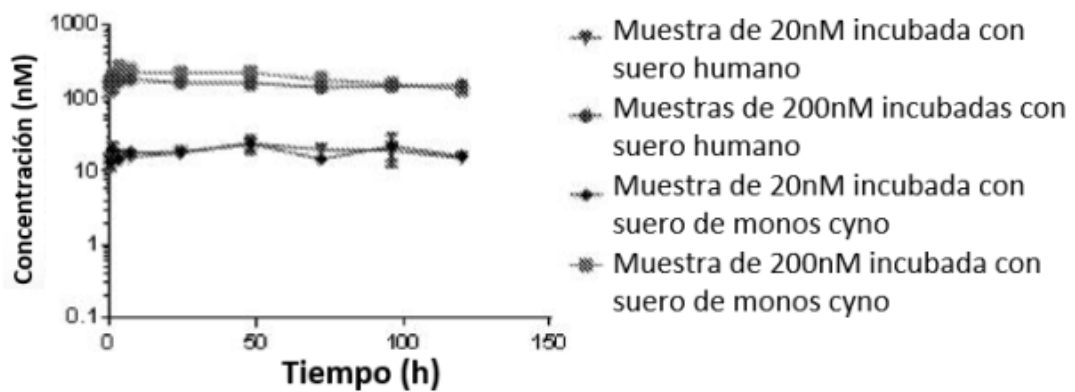


FIG. 10

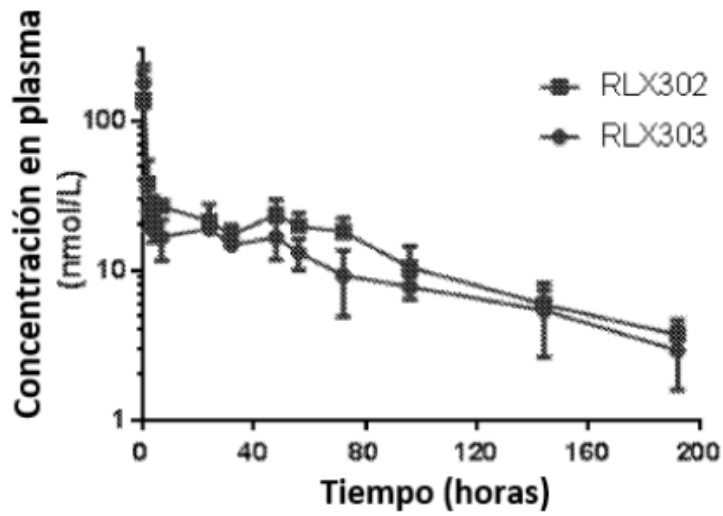


FIG. 11A

Dosificación i.v. de rata

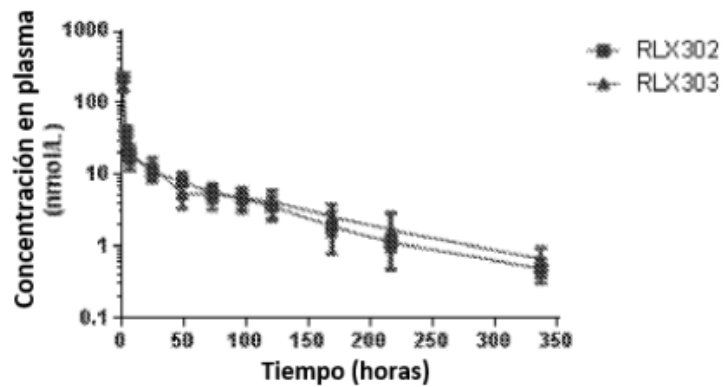


FIG. 11B

Dosificación i.v. de rata

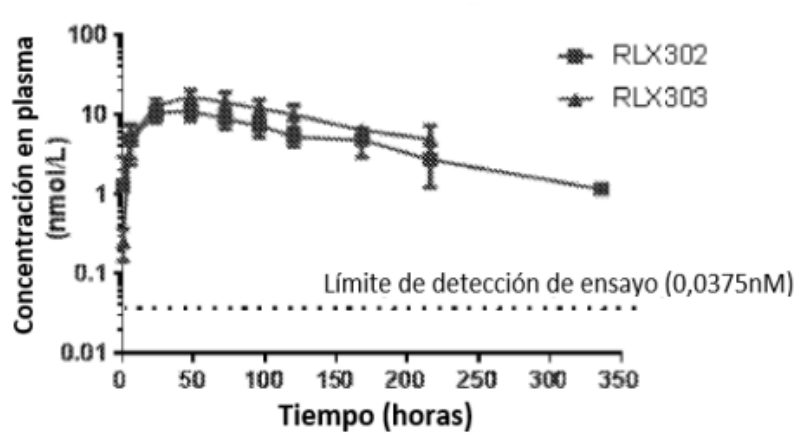


FIG. 12A

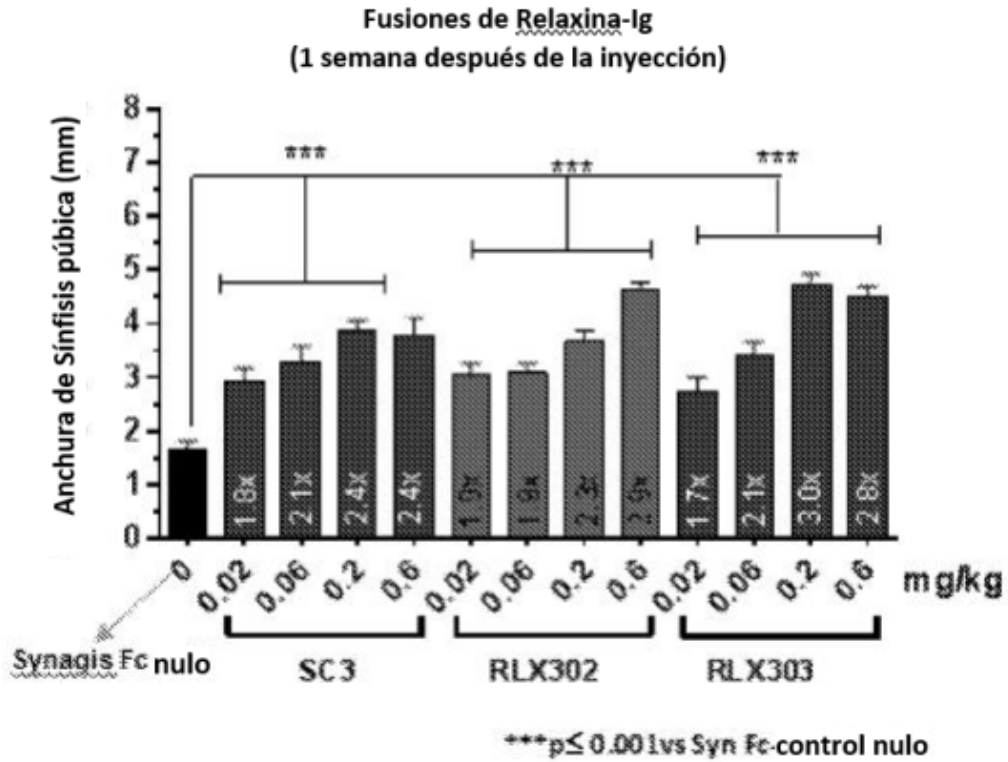


FIG. 12B

