LLOREDA & CIA. S. A.
A B O G A D O S

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-058600- -00005-0000
Fecha: 2009-02-05 16:17:07 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 329 CTOINFORMACION Folios: 305

BOGOTA - COLOMBIA
OFICINA FUNDADA EN 1941
APARTADO AEREO 12304
TEL: 57-1-3264270 57-1-6069700
FAX: 57-1-3264271 57-1-6069701
C A B L E S : L L O R E D A
CALLE 72 No. 5-83 5°. PISO
www.lloredacamacho.com
jllcco@lloredacamacho.com

Señor
SUPERINTENDENTE DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES
E. S. D.

Re: P1.-**DOMANTIS LIMITED**.-Solicitud de Patente de Invención en Fase Nacional PCT para **"ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY"**.-Clase **C07K 16/46**.-Expediente número **07-058.600**.-

1. Me refiero a mi memorial de 2 de Julio de 2008.

2. Por medio del presente memorial me permito manifestar que es deseo del solicitante realizar las siguientes modificaciones en la descripción de la solicitud:

2.1. En primer lugar, el solicitante ha decidido presentar una compilación de todas las secuencias de aminoácidos que aparecen mencionadas y descritas a lo largo de la descripción presentada originalmente. Dicha compilación (ANEXO III) incluye 188 secuencias cuyo sustento en la solicitud original se analiza a continuación:

(a) Las secuencias 1 a 3 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 1A de la solicitud;
(b) Las secuencias 4 a 9 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 1B de la solicitud;
(c) Las secuencias 10 a 15 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 1C de la solicitud;
(d) Las secuencias 16 a 23 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 1D de la solicitud;
(e) Las secuencias 24 a 26 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 1E de la solicitud;
(f) Las secuencias 27 a 28 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 2C y 2D de la solicitud;

(g) Las secuencias 29 a 30 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 2E y 2F de la solicitud;

(h) Las secuencias 31 a 32 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 2G y 2H de la solicitud;

(i) La secuencia 33 del ANEXO III corresponde a las secuencias reveladas en la figura 8A de la solicitud;

(j) La secuencia 34 del ANEXO III corresponde a las secuencias reveladas en la figura 8B de la solicitud;

(k) Las secuencias 35 a 36 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la página 151 de la solicitud;

(l) Las secuencias 37 a 41 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 10 de la solicitud;

(m) Las secuencias 42 a 55 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 11A y 11B de la solicitud;

(n) Las secuencias 56 a 59 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la página 89 de la solicitud;

(o) Las secuencias 60 a 67 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 14A a 14G de la solicitud;

(p) Las secuencias 68 a 71 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la página 172 de la solicitud;

(q) Las secuencias 72 a 88 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 15 de la solicitud;

(r) Las secuencias 89 a 157 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las páginas 175 a 182 de la solicitud;

(s) Las secuencias 158 a 171 del ANEXO III corresponden a aquellas reveladas en la lista de secuencias presentada originalmente en la descripción de la solicitud (páginas finales de la descripción enumeradas como 1/2 y 2/2). **Si bien dichas secuencias habían sido enumeradas originalmente como secuencias 157 a 170, su numeración ha sido modificada con el fin de eliminar cualquier posible confusión al respecto (Anexo IV);**

(t) Las secuencias 172 a 176 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las páginas 99 a 107 de la descripción. **En dichas páginas, las secuencias aparecen enumeradas originalmente como secuencias 171 a 175, por lo que dicha numeración ha sido modificada con la intención de eliminar cualquier posible confusión al respecto (ver Anexo V);**

(u) Las secuencias 177 a 179 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 16A de la solicitud;

(v) Las secuencias 180 a 182 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 16B de la solicitud;

(w) Las secuencias 183 a 185 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en la figura 16C de la solicitud; y,

(x) Las secuencias 186 a 188 del ANEXO III corresponden a las secuencias reveladas en las figuras 19A a 19C de la solicitud.

2.2. Tal como se mencionó previamente para el caso de las secuencias 157 a 175 presentadas originalmente en la descripción de la solicitud *(cuya numeración fue modificada para que coincidiera con la numeración presentada en el ANEXO III)*, la numeración de las secuencias reveladas en las figuras 16A, 16B, 16C, 19A, 19B y 19C (página 17 de la descripción) también ha sido modificada **(ver Anexo V)** con el objetivo de lograr plena coincidencia entre la numeración dada a las secuencias de aminoácidos en las figuras de la descripción y en la compilación de secuencias del ANEXO III.

Finalmente y de conformidad con lo mencionado previamente, me permito manifestar ante ese Despacho que las modificaciones realizadas en la descripción de la solicitud en cuestión **no amplían** de manera alguna el alcance de la invención presentada originalmente, toda vez que dichas modificaciones encuentran pleno sustento en los documentos que fueron remitidos a ese Despacho el 8 de Junio de 2007.

3. Anexo me permito presentar:

(a) Formulario único de correcciones y modificaciones;

(b) Recibo número 09-5,511, expedido por la Superintendencia de Industria y Comercio, que acredita el pago de la modificación mencionada;

(c) ANEXO III. Compilación de las 188 secuencias de aminoácidos que aparecen mencionadas y descritas a lo largo de la descripción presentada originalmente;

(d) ANEXO IV. Copia de la descripción, en la que se han modificado las páginas 17 (figuras 16A, 16B, 16C, 19A, 19B, 19C) y 99 a 107, tal y como se aclaró anteriormente; y

(e) ANEXO V. Copia de las nuevas páginas 1/2 y 2/2 de la descripción, en las que se hicieron las modificaciones anteriormente mencionadas.

4. Ruego a usted tomar atenta nota de lo anterior y proceder de conformidad.

Señor Superintendente,

ALICIA LLOREDA RICAURTE

T.P. 53.215

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Espacio reservado para el adhesivo de radicación

FORMULARIO ÚNICO DE CORRECCIONES Y MODIFICACIONES.
2000-10

① **SOLICITUD DE:**

☐ Corrección de Error Material. ☒ Modificación a una Solicitud.

② **SOLICITANTE**	Nombre: **DOMANTIS LIMITED**, sociedad existente y organizada de conformidad con las leyes de Inglaterra. Dirección: 980 Great West Road, Brentford, Middlesex TW8 9GS, Inglaterra. Teléfono: 3 264270 Fax: 6 069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com Domicilio: Middlesex, Inglaterra.	**IDENTIFICACION** C.C. ☐ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número _____
③ **REPRESENTANTE O APODERADO**	Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE** Dirección: Calle 72 No. 5-83 5° Piso Teléfono: 3 264270 Fax: 6 069701 E-mail: jllcco@lloredacamacho.com	**IDENTIFICACION** C.C. ☒ NIT ☐ C.E. ☐ Otro ☐ Número 39.690.713 TP 53.215

④ **Número de expediente:**
07-058.600

⑤ **Descripción de la corrección o modificación solicitada** modificaciones voluntarias a las secuencias de la Solicitud de Patente de Invención arriba referida.

⑥ **Comprobante de pago No.** 09-5,511 **Fecha** 23 de Enero de 2009

⑦ **Anexos:**

☒ Comprobante de pago de la tasa.
☐ Poderes, si fuere el caso.
☐ Certificado de existencia y representación legal de las partes, cuando sean personas jurídicas.

⑧

NOMBRE ALICIA LLOREDA RICAURTE **FIRMA** _____

C.C. 39.690.713 T.P. 53.215

Instrucciones para el diligenciamiento del presente formulario, ver reverso de esta página.

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 09 - 5,511
FECHA : ENERO 23 DE 2009

***** C O N S I G N A C I O N *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PGO	Vr. PAGO
LLOREDA Y CIA S. A	CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	97134811	23/01/2009	6,515,000.00

***** C O N C E P T O *****

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-03 CAMBIO DE MODALIDAD Y MODIFICA	12 MARCAS Y LEMAS COMERCIALES	111,000.00
		TOTAL :	$ 111,000.00

SON: CIENTO ONCE MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No._____

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> DOMANTIS LIMITED
HOLMES, STEVE
HOLT, LUCY J.
JESPERS, LAURENT S.
TOMLINSON, IAN M.

<120> FUSIONES Y CONJUGADOS DE FÁRMACO

<130> P59452L-WO

<140> PCT/GB2005/004599
<141> 2005-11-30

<150> 60/632,361
<151> 2004-12-02

<150> 0511019.2
<151> 2005-05-31

<160> 188

<170> FastSEQ para Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 1

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ile	Lys	His
		20					25					30			
Leu	Lys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40					45				
Tyr	Gly	Ala	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
50					55					60					
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Gly	Ala	Arg	Trp	Pro	Gln
			85					90					95		
Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Arg				
		100					105								

<210> 2
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 2

Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
1				5				10					15		
Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Phe	Arg	His
		20					25					30			
Leu	Lys	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
	35					40					45				
Tyr	Ala	Ala	Ser	Arg	Leu	Gln	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly

```
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ala Leu Tyr Pro Lys
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 3
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 3

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Tyr Tyr His
            20                  25                  30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Lys Ala Ser Thr Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Arg Lys Val Pro Arg
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 4
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 4

```
Asp Ile Gln Thr Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Arg Met Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 5
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 5

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
```

```
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Met Gln Pro Phe
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 6
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asn Gly Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Leu Gln Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105


<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 7
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Arg Gln
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gly Ala Ser Val Leu Gln Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ile Thr Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Val Lys Arg
            100                 105


<210> 8
<211> 108
<212> PRT
```

<213> Homo sapiens

<400> 8

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Gly Arg Tyr
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ser Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 9

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile His Arg Gln
            20                  25                  30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Tyr Ala Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ser Lys Pro Ser
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 10
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 10

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Ala Thr Tyr
            20                  25                  30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Arg Ser Ser Ser Leu Gln Ser Ala Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Val Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Ala Val Pro Pro
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 11
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Asp Thr Gly
            20   25   30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Asn Val Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Trp Gly Ser Pro Thr
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 12
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Glu Ile Tyr Ser Trp
            20   25   30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Asn Ala Ser His Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Val Ile Gly Asp Pro Val
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 13
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20   25   30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Thr Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Arg Leu Ser Val Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro

65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Asn Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 14
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Phe Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Thr Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Gln
100 105

<210> 15
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 15
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45
Tyr Arg Asn Ser Gln Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Phe Ala Val Pro Pro
85 90 95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 16
<211> 123
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 16
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Lys Tyr
20 25 30

```
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ser Ile Asp Phe Met Gly Pro His Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Gly Arg Thr Ser Met Leu Pro Met Lys Gly Lys Phe Asp Tyr
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 17
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 17

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Tyr Asp Tyr
            20                  25                  30
Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile Thr His Thr Gly Gly Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Gln Asn Pro Ser Tyr Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 18
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 18

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Arg Tyr
            20                  25                  30
Ser Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile Leu Pro Gly Gly Asp Val Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Gln Thr Pro Asp Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 19
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 19
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Lys Tyr
            20   25   30
Asn Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Leu Gly Glu Gly Asn Asn Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Thr Met Asp Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 20
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 20
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Glu Tyr
            20   25   30
Asn Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Leu Pro His Gly Asp Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gln Asp Pro Leu Tyr Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100   105   110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 21
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 21
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp Leu Tyr
            20   25   30
Asp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45

```
Ser Ser Ile Val Asn Ser Gly Val Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Leu Asn Gln Ser Tyr His Trp Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 22
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 22

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr
            20                  25                  30
Arg Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile Ile Ser Asn Gly Lys Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Gln Asp Trp Met Tyr Met Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 23
<211> 35
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Secuencia de consenso

<221> SITE
<222> (30)...(31)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 23

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Xaa Xaa Tyr
            20                  25                  30
Asn Met Ser
        35
```

<210> 24
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 24
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
            20   25   30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 25
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 25
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile His Arg Glu
            20   25   30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Lys Tyr Leu Pro Pro Tyr
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 26
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 26
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln His Ile His Arg Glu
            20   25   30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Gln Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Arg Val Pro Tyr
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 27
<211> 879
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Codifica proteína de fusión

<400> 27
aggccttctg ggagaaaatc cagcaagatg caagccttca gaatctggga tgttaaccag 60
aagaccttct atctgaggaa caaccaacta gttgccggat acttgcaagg accaaatgtc 120
aatttagaag aaaagataga tgtggtaccc attgagcctc atgctctgtt cttgggaatc 180
catggaggga agatgtgcct gtcctgtgtc aagtctggtg atgagaccag actccagctg 240
gaggcagtta acatcactga cctgagcgag aacagaaagc aggacaagcg cttcgccttc 300
atccgctcag acagtggccc caccaccagt tttgagtctg ccgcctgccc cggttggttc 360
ctctgcacag cgatggaagc tgaccagccc gtcagcctca ccaatatgcc tgacgaaggc 420
gtcatggtca ccaaattcta cttccaggag gacgagagct caggtggagg cggttcaggc 480
ggaggtggca gcggcggtgg cgggtcaggt ggtggcggaa gcggcggtgg cgggtcgacg 540
gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 600
atcacttgcc gggcaagtca gagcattatt aagcatttaa agtggtacca gcagaaacca 660
gggaaagccc ctaagctcct gatctatggt gcatcccggt tgcaaagtgg ggtcccatca 720
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 780
gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag ggggctcggt ggcctcagac gttcggccaa 840
gggaccaagg tggaaatcaa acgggcggcc gcataataa 879

<210> 28
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 28
Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp
 1   5   10   15
Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala
            20   25   30
Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val
        35   40   45
Val Pro Ile Glu Pro His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys
    50   55   60
Met Cys Leu Ser Cys Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu
65   70   75   80
Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys
                85   90   95
Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu
            100   105   110
Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp
        115   120   125
Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr
    130   135   140
Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp Glu Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
145   150   155   160
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
                165   170   175
Gly Gly Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser
            180   185   190
Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser
        195   200   205

```
Ile Ile Lys His Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro
    210                 215                 220
Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser
225                 230                 235                 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
                245                 250                 255
Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala
            260                 265                 270
Arg Trp Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
        275                 280                 285
Ala Ala Ala
    290
```

<210> 29
<211> 879
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Codifica proteína de fusión

<400> 29
tcgacggaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 60
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attattaagc atttaaagtg gtaccagcag 120
aaaccaggga aagcccctaa gctcctgatc tatggtgcat cccggttgca aagtggggtc 180
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 240
caacctgaag attttgctac gtactactgt caacaggggg ctcggtggcc tcagacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg gcggccgcaa gcggtggagg cggttcaggc 360
ggaggtggca gcggcggtgg cgggtcaggt ggtggcggaa gcggcggtgg cggctcgagg 420
ccctctggga gaaaatccag caagatgcaa gccttcagaa tctgggatgt taaccagaag 480
accttctatc tgaggaacaa ccaactagtt gccggatact tgcaaggacc aaatgtcaat 540
ttagaagaaa agatagatgt ggtacccatt gagcctcatg ctctgttctt gggaatccat 600
ggagggaaga tgtgcctgtc ctgtgtcaag tctggtgatg agaccagact ccagctggag 660
gcagttaaca tcactgacct gagcgagaac agaaagcagg acaagcgctt cgccttcatc 720
cgctcagaca gtggccccac caccagtttt gagtctgccg cctgccccgg ttggttcctc 780
tgcacagcga tggaagctga ccagcccgtc agcctcacca atatgcctga cgaaggcgtc 840
atggtcacca aattctactt ccaggaggac gagtaataa   879

<210> 30
<211> 291
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 30
```
Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1               5                  10                  15
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ile
            20                  25                  30
Lys His Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45
Leu Ile Tyr Gly Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65                  70                  75                  80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ala Arg Trp
                85                  90                  95
Pro Gln Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala
```

```
            100                 105                 110
Ala Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
        115                 120                 125
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Pro Ser Gly Arg
    130                 135                 140
Lys Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys
145                 150                 155                 160
Thr Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly
                165                 170                 175
Pro Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro
            180                 185                 190
His Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys
        195                 200                 205
Val Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile
    210                 215                 220
Thr Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile
225                 230                 235                 240
Arg Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro
                245                 250                 255
Gly Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu
            260                 265                 270
Thr Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln
        275                 280                 285
Glu Asp Glu
    290
```

<210> 31
<211> 879
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Codifica proteína de fusión

<400> 31

```
tcgacggaca tccagatgac ccagtctcca tcctccctgt ctgcatctgt aggagaccgt 60
gtcaccatca cttgccgggc aagtcagagc attagcagct atttaaattg gtaccagcag 120
aaaccaggga aagccctaa gctcctgatc tatgctgcat ccagtttgca aagtggggtc 180
ccatcacgtt tcagtggcag tggatctggg acagatttca ctctcaccat cagcagtctg 240
caacctgaag attttgctac gtactactgt caacagagtt acagtacccc taatacgttc 300
ggccaaggga ccaaggtgga aatcaaacgg gcggccgcaa gcggtggagg cggttcaggc 360
ggaggtggca gcggcggtgg cgggtcaggt ggtggcggaa gcggcggtgg cggctcgagg 420
ccctctggga gaaaatccag caagatgcaa gccttcagaa tctgggatgt taaccagaag 480
accttctatc tgaggaacaa ccaactagtt gccggatact tgcaaggacc aaatgtcaat 540
ttagaagaaa agatagatgt ggtacccatt gagcctcatg ctctgttctt gggaatccat 600
ggagggaaga tgtgcctgtc ctgtgtcaag tctggtgatg agaccagact ccagctggag 660
gcagttaaca tcactgacct gagcgagaac agaaagcagg acaagcgctt cgccttcatc 720
cgctcagaca gtggccccac caccagtttt gagtctgccg cctgccccgg ttggttcctc 780
tgcacagcga tggaagctga ccagcccgtc agcctcacca atatgcctga cgaaggcgtc 840
atggtcacca aattctactt ccaggaggac gagtaataa                        879
```

<210> 32
<211> 290
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Proteína de fusión

<400> 32

```
Ser Thr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 1               5                  10                  15
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
            20                  25                  30
Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
        35                  40                  45
Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
65                  70                  75                  80
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Tyr Ser Thr
                85                  90                  95
Pro Asn Thr Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ala Ala Ala
            100                 105                 110
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
        115                 120                 125
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Arg Pro Ser Gly Arg Lys
    130                 135                 140
Ser Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr
145                 150                 155                 160
Phe Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro
                165                 170                 175
Asn Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His
            180                 185                 190
Ala Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val
        195                 200                 205
Lys Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr
    210                 215                 220
Asp Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg
225                 230                 235                 240
Ser Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly
                245                 250                 255
Trp Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr
            260                 265                 270
Asn Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu
        275                 280                 285
Asp Glu
    290
```

<210> 33
<211> 1760
<212> DNA
<213> Homo sapiens

<400> 33

```
atttctttat aaaccacaac tctgggcccg caatggcagt ccactgcctt gctgcagtca 60
cagaatggaa atctgcagag gcctccgcag tcacctaatc actctcctcc tcttcctgtt 120
ccattcagag acgatctgcc gacccctctgg gagaaaatcc agcaagatgc aagccttcag 180
aatctgggat gttaaccaga agaccttcta tctgaggaac aaccaactag ttgctggata 240
cttgcaagga ccaaatgtca atttagaaga aaagatagat gtggtaccca ttgagcctca 300
tgctctgttc ttgggaatcc atggagggaa gatgtgcctg tcctgtgtca agtctggtga 360
tgagaccaga ctccagctgg aggcagttaa catcactgac ctgagcgaga acagaaagca 420
ggacaagcgc ttcgccttca tccgctcaga cagcggcccc accaccagtt ttgagtctgc 480
cgcctgcccc ggttggttcc tctgcacagc gatggaagct gaccagcccg tcagcctcac 540
caatatgcct gacgaaggcg tcatggtcac caaattctac ttccaggagg acgagtagta 600
ctgcccaggc ctgcctgttc ccattcttgc atggcaagga ctgcagggac tgccagtccc 660
cctgccccag ggctcccggc tatgggggca ctgaggacca gccattgagg ggtggaccct 720
cagaaggcgt cacaagaacc tggtcacagg actctgcctc ctcttcaact gaccagcctc 780
catgctgcct ccagaatggt ctttctaatg tgtgaatcag agcacagcag cccctgcaca 840
aagcccttcc atgtcgcctc tgcattcagg atcaaacccc gaccacctgc ccaacctgct 900
```

ctcctcttgc cactgcctct tcctccctca ttccaccttc ccatgccctg gatccatcag 960
gccacttgat gacccccaac caagtggctc ccacaccctg ttttacaaaa aagaaaagac 1020
cagtccatga gggaggtttt taagggtttg tggaaaatga aaattaggat ttcatgattt 1080
tttttttca gtccccgtga aggagagccc ttcatttgga gattatgttc tttcggggag 1140
aggctgagga cttaaaatat tcctgcattt gtgaaatgat ggtgaaagta agtggtagct 1200
tttcccttct ttttcttctt tttttgtgat gtcccaactt gtaaaaatta aaagttatgg 1260
tactatgtta gccccataat tttttttttc cttttaaaac acttccataa tctggactcc 1320
tctgtccagg cactgctgcc cagcctccaa gctccatctc cactccagat tttttacagc 1380
tgcctgcagt actttacctc ctatcagaag tttctcagct cccaaggctc tgagcaaatg 1440
tggctcctgg gggttctttc ttcctctgct gaaggaataa attgctcctt gacattgtag 1500
agcttctggc acttggagac ttgtatgaaa gatggctgtg cctctgcctg tctcccccac 1560
cgggctggga gctctgcaga gcaggaaaca tgactcgtat atgtctcagg tccctgcagg 1620
gccaagcacc tagcctcgct cttggcaggt actcagcgaa tgaatgctgt atatgttggg 1680
tgcaaagttc cctacttcct gtgacttcag ctctgtttta caataaaatc ttgaaaatgc 1740
ctaaaaaaaa aaaaaaaaaa 1760

<210> 34
<211> 177
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 34
Met Glu Ile Cys Arg Gly Leu Arg Ser His Leu Ile Thr Leu Leu Leu
 1   5   10   15
Phe Leu Phe His Ser Glu Thr Ile Cys Arg Pro Ser Gly Arg Lys Ser
            20   25   30
Ser Lys Met Gln Ala Phe Arg Ile Trp Asp Val Asn Gln Lys Thr Phe
        35   40   45
Tyr Leu Arg Asn Asn Gln Leu Val Ala Gly Tyr Leu Gln Gly Pro Asn
    50   55   60
Val Asn Leu Glu Glu Lys Ile Asp Val Val Pro Ile Glu Pro His Ala
65   70   75   80
Leu Phe Leu Gly Ile His Gly Gly Lys Met Cys Leu Ser Cys Val Lys
                85   90   95
Ser Gly Asp Glu Thr Arg Leu Gln Leu Glu Ala Val Asn Ile Thr Asp
            100   105   110
Leu Ser Glu Asn Arg Lys Gln Asp Lys Arg Phe Ala Phe Ile Arg Ser
        115   120   125
Asp Ser Gly Pro Thr Thr Ser Phe Glu Ser Ala Ala Cys Pro Gly Trp
    130   135   140
Phe Leu Cys Thr Ala Met Glu Ala Asp Gln Pro Val Ser Leu Thr Asn
145   150   155   160
Met Pro Asp Glu Gly Val Met Val Thr Lys Phe Tyr Phe Gln Glu Asp
                165   170   175
Glu

<210> 35
<211> 73
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de clonación múltiple

<400> 35
gcgcatatgt tagtgcgtcg acgtcaaaag gccatagcgg gcggccgctg caggtctcga 60
gtgcgatgga tcc 73

<210> 36

<211> 92
<212> DNA
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Sitio de clonación múltiple

<400> 36
gcgcatatgt taagcgaggc cttctggaga gagctcagga gtgtcgacgg acatccagat 60
gacccaggcg gccgctaata aggatccaat gc 92

<210> 37
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 37
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Arg Arg
            20   25   30
Leu Lys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ala Ala Pro Arg Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Arg Thr Ser Trp Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Ser Gln Trp Pro His
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 38
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 38
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1   5   10   15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Tyr Lys Asn
            20   25   30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35   40   45
Tyr Asn Ser Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50   55   60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65   70   75   80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Tyr Leu Ser Pro Tyr
                85   90   95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100   105

<210> 39
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 39

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Lys Ile Tyr Asn Asn
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asn Thr Ser Ile Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Trp Arg Ala Pro Tyr
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 40
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 40

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Tyr Lys Ser
            20                  25                  30
Leu Gly Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Gln Ser Ser Leu Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Gln Met Pro Arg
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 41
<211> 108
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 41

```
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1               5                  10                  15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Tyr Arg His
            20                  25                  30
Leu Arg Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
Tyr Asp Ala Ser Arg Leu Gln Ser Gly Val Pro Thr Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65                  70                  75                  80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr His Asn Pro Pro Lys
                85                  90                  95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
            100                 105
```

<210> 42

<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 42
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gly Gly Lys Asp Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100   105   110
Thr Val Ser Ser
        115

<210> 43
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 43
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gly Asn Leu Glu Pro Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 44
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60

```
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Lys Leu Ser Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100                 105                 110
Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 45
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 45

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Val Val Lys Asp Asn Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 46
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 46

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Asn Thr Gly Gly Lys Gln Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 47
<211> 118
<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 47
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Lys Thr Gly Pro Ser Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100   105   110
Leu Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 48
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 48
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Arg Thr Glu Asn Arg Gly Val Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100   105   110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 49
<211> 122
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 49
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Thr Ile Ser Pro Phe Gly Ser Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80

```
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Ser Asp Val Leu Lys Thr Gly Leu Asp Gly Phe Asp Tyr Trp
            100                 105                 110
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 50
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 50

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Ala Tyr
            20                  25                  30
Gln Met Ala Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Thr Ile His Gln Thr Gly Phe Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Val Arg Ser Met Arg Pro Tyr Lys Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 51
<211> 120
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 51

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Lys Asp Tyr
            20                  25                  30
Asp Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Met Ile Ser Ser Ser Gly Leu Trp Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Lys Gly Phe Arg Leu Phe Pro Arg Thr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 52
<211> 121
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 52
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe His Asp Tyr
20 25 30
Val Met Gly Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Leu Ile Lys Pro Asn Gly Ser Pro Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Arg Gly Arg Phe Asn Val Leu Gln Phe Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 53
<211> 118
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 53
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg His Tyr
20 25 30
Arg Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Trp Ile Arg Pro Asp Gly Thr Phe Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Ser Tyr Met Gly Asp Arg Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110
Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 54
<211> 116
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 54
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Met Trp Asp
20 25 30
Lys Met Gly Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Phe Ile Gly Arg Glu Gly Tyr Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ala Lys Ser Val Ala Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 55
<211> 117
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 55
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Trp Ala Tyr
20 25 30
Pro Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ser Ile Ser Ser Trp Gly Thr Gly Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Gly Gln Gly Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Se une al receptor IL-1 tipo 1 humano

<400> 56
Phe Glu Trp Thr Pro Gly Tyr Trp Gln Pro Tyr Ala Leu Pro Leu
1 5 10 15

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Se une al receptor IL-1 tipo 1 humano

<221> SITIO
<222> 10
<223> Xaa = ácido 1-azetidin-2-carboxílico

<400> 57
Phe Glu Trp Thr Pro Gly Tyr Trp Gln Xaa Tyr Ala Leu Pro Leu
1 5 10 15

<210> 58

<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Se une al receptor IL-1 tipo 1 humano

<221> SITE
<222> 10
<223> Xaa = ácido 1-azetidin-2-carboxílico

<400> 58
Phe Glu Trp Thr Pro Gly Tyr Trp Gln Xaa Tyr
 1   5   10

<210> 59
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Se une al receptor IL-1 tipo 1 humano

<221> SITE
<222> 10
<223> Xaa = ácido 1-azetidin-2-carboxílico

<400> 59
Phe Glu Trp Thr Pro Gly Trp Tyr Gln Xaa Tyr
 1   5   10

<210> 60
<211> 292
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 60
Met Lys Ile Tyr Val Val Ala Thr Ile Ala Trp Ile Leu Leu Gln Phe
 1   5   10   15
Ser Ala Trp Thr Thr Thr Asp Ala Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu
            20   25   30
Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg
        35   40   45
Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala
    50   55   60
Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Asp Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln
65   70   75   80
Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr
                85   90   95
Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr
            100   105   110
Tyr Phe Lys Ser Glu Ile Thr Ser Ala Glu Leu Thr Ala Leu Phe Pro
        115   120   125
Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr
    130   135   140
Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile Thr Gln Gly Asp Lys Ser Arg
145   150   155   160
Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu Leu Leu Thr Phe Met Glu Ala
                165   170   175

```
Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys Asn Glu Ala Arg Phe Leu Leu
            180                 185                 190
Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Val Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln
        195                 200                 205
Asn Leu Val Thr Lys Asn Phe Pro Asn Lys Phe Asp Ser Asp Asn Lys
    210                 215                 220
Val Ile Gln Phe Glu Val Ser Trp Arg Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr
225                 230                 235                 240
Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe
                245                 250                 255
Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr
            260                 265                 270
Leu Gly Lys Pro Lys Ser Ser Asn Glu Ala Asn Ser Thr Ala Tyr Ala
        275                 280                 285
Thr Thr Val Leu
    290
```

<210> 61
<211> 236
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 61

```
Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro
 1               5                  10                  15
Pro Ser Arg Asp Lys Phe Leu Arg Leu Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly
            20                  25                  30
Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys Arg Glu Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr
        35                  40                  45
Leu Ala Met Asp Asn Ala Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Gly Thr
    50                  55                  60
Glu Ile Thr Ser Ala Glu Leu Thr Thr Leu Leu Pro Glu Ala Thr Val
65                  70                  75                  80
Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu
                85                  90                  95
Lys Asn Ala Lys Ile Thr Glu Gly Asp Lys Thr Arg Lys Glu Leu Gly
            100                 105                 110
Leu Gly Ile Asn Leu Leu Ser Thr Leu Met Asp Ala Val Asn Lys Lys
        115                 120                 125
Ala Arg Val Val Lys Asn Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln
    130                 135                 140
Met Thr Ala Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Thr
145                 150                 155                 160
Lys Asn Phe Pro Asn Lys Phe Asn Ser Glu Asp Lys Val Ile Gln Phe
                165                 170                 175
Gln Val Asn Trp Ser Lys Ile Ser Lys Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys
            180                 185                 190
Asn Gly Val Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg
        195                 200                 205
Gln Val Lys Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Thr Thr
    210                 215                 220
Pro Asn Asn Ala Ala Asp Arg Tyr Arg Ala Glu Leu
225                 230                 235
```

<210> 62
<211> 157
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 62
Met Lys Ile Tyr Val Val Ala Thr Ile Ala Trp Ile Leu Leu Gln Phe
1 5 10 15
Ser Ala Trp Thr Thr Thr Asp Ala Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu
20 25 30
Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg
35 40 45
Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala
50 55 60
Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Gly Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln
65 70 75 80
Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr
85 90 95
Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr
100 105 110
Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala Glu Leu Thr Ala Leu Phe Pro
115 120 125
Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr
130 135 140
Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile Thr Gln Glu Asp
145 150 155

<210> 63
<211> 253
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 63
Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr
1 5 10 15
Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu
20 25 30
Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu
35 40 45
Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu
50 55 60
Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp
65 70 75 80
Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser
85 90 95
Ala Glu Leu Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys
100 105 110
Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln
115 120 125
Ile Thr Gln Gly Asp Lys Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp
130 135 140
Leu Leu Leu Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val
145 150 155 160
Lys Asn Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu
165 170 175
Val Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Thr Lys Asn Phe Pro
180 185 190
Asn Lys Phe Asp Ser Asp Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Ser Trp
195 200 205
Arg Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe
210 215 220
Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp
225 230 235 240
Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
245 250

<210> 64
<211> 299
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 64
Met Lys Ile Tyr Val Val Ala Thr Ile Ala Trp Ile Leu Leu Gln Phe
 1   5   10   15
Ser Ala Trp Thr Thr Thr Asp Ala Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu
            20   25   30
Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg
        35   40   45
Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala
    50   55   60
Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Glu Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln
65   70   75   80
Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr
                85   90   95
Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr
            100   105   110
Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr Ser Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro
        115   120   125
Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr
    130   135   140
Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln Ile Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg
145   150   155   160
Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp Leu Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala
                165   170   175
Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val Lys Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu
            180   185   190
Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln
        195   200   205
Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe Pro Asn Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys
    210   215   220
Val Ile Gln Phe Glu Val Asn Trp Lys Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr
225   230   235   240
Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe
                245   250   255
Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr
            260   265   270
Leu Gly Lys Prc Lys Ser Ser Asn Glu Ala Asn Ser Thr Val Arg His
        275   280   285
Tyr Gly Pro Leu Lys Pro Thr Leu Leu Ile Thr
    290   295

<210> 65
<211> 254
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 65
Ala Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln
 1   5   10   15
Tyr Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn
            20   25   30
Leu Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys
        35   40   45
Glu Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser

```
    50                  55                  60
Leu Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met
65                  70                  75                  80
Asp Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Arg Ser Glu Ile Thr
                85                  90                  95
Ser Ala Glu Ser Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln
            100                 105                 110
Lys Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala
        115                 120                 125
Gln Ile Thr Gln Gly Asp Gln Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile
    130                 135                 140
Asp Leu Leu Ser Thr Ser Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val
145                 150                 155                 160
Val Lys Asp Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala
                165                 170                 175
Glu Ala Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Ile Lys Asn Phe
            180                 185                 190
Pro Asn Lys Phe Asn Ser Glu Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Asn
        195                 200                 205
Trp Lys Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val
    210                 215                 220
Phe Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys
225                 230                 235                 240
Asp Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
                245                 250
```

<210> 66
<211> 253
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<400> 66

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

Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp
225 230 235 240
Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys
245 250

<210> 67
<211> 275
<212> PRT
<213> Saponaria officinalis

<220>
<221> SITIO
<222> (48)...(48)
<223> Xaa = Glu or Asp

<221> SITIO
<222> (91)...(91)
<223> Xaa = Arg or Lys

<221> SITIO
<222> (99)...(99)
<223> Xaa = Ser or Leu

<221> SITIO
<222> (134)...(134)
<223> Xaa = Gln or Lys

<221> SITIO
<222> (147)...(147)
<223> Xaa = Ser or Leu

<221> SITIO
<222> (149)...(149)
<223> Xaa = Ser or Phe

<221> SITIO
<222> (162)...(162)
<223> Xaa = Asp or Asn

<221> SITIO
<222> (177)...(177)
<223> Xaa = Ala or Val

<221> SITIO
<222> (188)...(188)
<223> Xaa = Ile or Thr

<221> SITIO
<222> (196)...(196)
<223> Xaa = Asn or Asp

<221> SITIO
<222> (198)...(198)
<223> Xaa = Glu or Asp

<221> SITIO
<222> (207)...(207)
<223> Xaa = Asn or Ser

<221> SITIO

<222> (209)...(209)
<223> Xaa = Lys o Arg

<400> 67
Val Thr Ser Ile Thr Leu Asp Leu Val Asn Pro Thr Ala Gly Gln Tyr
 1   5   10   15
Ser Ser Phe Val Asp Lys Ile Arg Asn Asn Val Lys Asp Pro Asn Leu
            20   25   30
Lys Tyr Gly Gly Thr Asp Ile Ala Val Ile Gly Pro Pro Ser Lys Xaa
        35   40   45
Lys Phe Leu Arg Ile Asn Phe Gln Ser Ser Arg Gly Thr Val Ser Leu
    50   55   60
Gly Leu Lys Arg Asp Asn Leu Tyr Val Val Ala Tyr Leu Ala Met Asp
65   70   75   80
Asn Thr Asn Val Asn Arg Ala Tyr Tyr Phe Xaa Ser Glu Ile Thr Ser
                85   90   95
Ala Glu Xaa Thr Ala Leu Phe Pro Glu Ala Thr Thr Ala Asn Gln Lys
            100   105   110
Ala Leu Glu Tyr Thr Glu Asp Tyr Gln Ser Ile Glu Lys Asn Ala Gln
        115   120   125
Ile Thr Gln Gly Asp Xaa Ser Arg Lys Glu Leu Gly Leu Gly Ile Asp
    130   135   140
Leu Leu Xaa Thr Xaa Met Glu Ala Val Asn Lys Lys Ala Arg Val Val
145   150   155   160
Lys Xaa Glu Ala Arg Phe Leu Leu Ile Ala Ile Gln Met Thr Ala Glu
                165   170   175
Xaa Ala Arg Phe Arg Tyr Ile Gln Asn Leu Val Xaa Lys Asn Phe Pro
            180   185   190
Asn Lys Phe Xaa Ser Xaa Asn Lys Val Ile Gln Phe Glu Val Xaa Trp
        195   200   205
Xaa Lys Ile Ser Thr Ala Ile Tyr Gly Asp Ala Lys Asn Gly Val Phe
    210   215   220
Asn Lys Asp Tyr Asp Phe Gly Phe Gly Lys Val Arg Gln Val Lys Asp
225   230   235   240
Leu Gln Met Gly Leu Leu Met Tyr Leu Gly Lys Pro Lys Ser Ser Asn
                245   250   255
Glu Ala Asn Ser Thr Val Arg His Tyr Gly Pro Leu Lys Pro Thr Leu
            260   265   270
Leu Ile Thr
        275

<210> 68
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido etiqueta hemaglutinina

<400> 68
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys
 1   5   10   15

<210> 69
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido etiqueta hemaglutinina

<400> 69
Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
 1   5   10   15

<210> 70
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido etiqueta His

<400> 70
His His His His His His Lys Lys Lys Lys Lys Lys Cys
 1   5   10

<210> 71
<211> 13
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Péptido etiqueta His

<400> 71
Cys Lys Lys Lys Lys Lys Lys His His His His His His
 1   5   10

<210> 72
<211> 115
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 72
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Arg Phe
            20   25   30
Gly Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Val Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Gly Ile Ser Ser Leu Gly Asp Ser Thr Leu Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Asn Pro Gly Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
            100   105   110
Val Ser Ser
        115

<210> 73

<211> 115
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 73
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Asn
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Asn Phe
            20   25   30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Pro Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Ser Asn Thr Ile Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Ser Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Thr Ile Gly Gly Ser Leu Ser Arg Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr
            100   105   110
Val Ser Ser
        115

<210> 74
<211> 114
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 74
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe
            20   25   30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Ser Ser Asp Ser Gly Thr Lys Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Lys Met Leu Phe
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ser Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
            100   105   110
Ser Ser

<210> 75
<211> 114
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 75
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Thr Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Phe Arg Ser Phe
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Ala Asp Gly Ser Asp Lys Arg Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Gly Lys Lys Met Leu Thr
65 70 75 80
Leu Asp Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Ile Gly Arg Gly Ser Pro Ala Ser Gln Gly Thr Gln Val Thr Val
100 105 110
Ser Ser

<210> 76
<211> 128
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 76
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Val Val Ser Gly Thr Thr Phe Ser Ser Ala
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45
Gly Ala Ile Lys Trp Ser Gly Thr Ser Thr Tyr Tyr Thr Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Val Tyr Thr Cys
85 90 95
Ala Ala Asp Arg Asp Arg Tyr Arg Asp Arg Met Gly Pro Met Thr Thr
100 105 110
Thr Asp Phe Arg Phe Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 77
<211> 123
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 77
Gln Val Lys Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Thr Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Ser Phe
20 25 30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Arg Glu Arg Glu Phe Val
35 40 45

```
Ala Ser Ile Gly Ser Ser Gly Ile Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Gly Leu Cys Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Val Asn Arg Tyr Gly Ile Pro Tyr Arg Ser Gly Thr Gln Tyr Gln
            100                 105                 110
Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Ser Ser
        115                 120
```

<210> 78
<211> 120
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 78

```
Glu Val Gln Leu Glu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Leu Thr Phe Asn Asp Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Gly Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Asp Met Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Val
                85                  90                  95
Ala His Arg Gln Thr Val Val Arg Gly Pro Tyr Leu Leu Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 79
<211> 123
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 79

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Lys Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Asn Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Gly Ser Gly Arg Ser Asn Ser Tyr Asn Tyr Tyr Ser Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Ser Thr Asn Leu Trp Pro Arg Asp Arg Asn Leu Tyr Ala Tyr
```

```
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 80
<211> 125
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 80

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Gly Ile Tyr
            20                  25                  30
Arg Met Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Thr Thr Arg Tyr Leu Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Ser Thr Lys Asn Ala Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Val Asp Ser Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Thr Leu Ser Thr Ser Tyr
            100                 105                 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 81
<211> 125
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 81

```
Gln Val Gln Leu Val Glu Phe Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Asp
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Ser Leu Gly Ile Tyr
            20                  25                  30
Lys Met Ala Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Thr Thr Arg Tyr Ile Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Met Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Val Asp Ser Ser Gly Arg Leu Tyr Trp Thr Leu Ser Thr Ser Tyr
            100                 105                 110
Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120                 125
```

<210> 82
<211> 124

<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Ser Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Thr Phe Ser Pro Tyr
            20   25   30
Thr Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Leu
        35   40   45
Ala Gly Val Thr Trp Ser Gly Ser Ser Thr Phe Tyr Gly Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ala Ser Arg Asp Ser Ala Lys Asn Thr Val Thr
65   70   75   80
Leu Glu Met Asn Ser Leu Asn Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Ala Ala Tyr Gly Gly Gly Leu Tyr Arg Asp Pro Arg Ser Tyr Asp
            100   105   110
Tyr Trp Gly Arg Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 83
<211> 131
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 83
Ala Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Ala Trp
            20   25   30
Pro Ile Ala Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35   40   45
Ser Cys Ile Arg Asp Gly Thr Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly
    50   55   60
Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Asn Asn Thr Val Tyr Leu Gln
65   70   75   80
Thr Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Ala
                85   90   95
Pro Ser Gly Pro Ala Thr Gly Ser Ser His Thr Phe Gly Ile Tyr Trp
            100   105   110
Asn Leu Arg Asp Asp Tyr Asp Asn Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr
        115   120   125
Val Ser Ser
    130

<210> 84
<211> 126
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 84
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asp His Tyr
            20   25   30
Thr Ile Gly Trp Phe Arg Gln Val Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35   40   45
Ser Cys Ile Ser Ser Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Ser Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Thr Leu Glu Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Ala Gly Gly Leu Leu Leu Arg Val Glu Glu Leu Gln Ala Ser Asp
            100   105   110
Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Ile Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120   125

<210> 85
<211> 128
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 85
Ala Val Gln Leu Val Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Thr Ala Ser Gly Phe Thr Leu Asp Tyr Tyr
            20   25   30
Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Gly Val
        35   40   45
Ala Cys Ile Ser Asn Ser Asp Gly Ser Thr Tyr Tyr Gly Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Thr Thr Val Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Thr Ala Asp Arg His Tyr Ser Ala Ser His His Pro Phe Ala Asp
            100   105   110
Phe Ala Phe Asn Ser Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115   120   125

<210> 86
<211> 120
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 86
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Tyr Gly Leu Thr Phe Trp Arg Ala
            20   25   30
Ala Met Ala Trp Phe Arg Arg Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val

```
        35                  40                  45
Val Ala Arg Asn Trp Gly Asp Gly Ser Thr Arg Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Val Arg Thr Tyr Gly Ser Ala Thr Tyr Asp Ile Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 87
<211> 123
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 87

```
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Asp Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ile Phe Ser Gly Arg Thr Phe Ala Asn Tyr
            20                  25                  30
Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Ala Ala Ile Asn Arg Asn Gly Gly Thr Thr Asn Tyr Ala Asp Ala Leu
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Lys Asn Thr Ala Phe
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Ala Arg Glu Trp Pro Phe Ser Thr Ile Pro Ser Gly Trp Arg Tyr
            100                 105                 110
Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 88
<211> 125
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Camelid

<400> 88

```
Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Trp Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Pro Thr Ala Ser Ser His
            20                  25                  30
Ala Ile Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val
        35                  40                  45
Val Gly Ile Asn Arg Gly Gly Val Thr Arg Asp Tyr Ala Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Ala Val Ser Arg Asp Asn Val Lys Asn Thr Val Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Arg Leu Lys Pro Glu Asp Ser Ala Ile Tyr Ile Cys
                85                  90                  95
```

Ala Ala Arg Pro Glu Tyr Ser Phe Thr Ala Met Ser Lys Gly Asp Met
100 105 110
Asp Tyr Trp Gly Lys Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 89
Glu His Trp Ser Tyr Gly Leu Arg Pro Gly
1 5 10

<210> 90
<211> 14
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 90
Glu Gln Arg Leu Gly Asn Gln Trp Ala Val Gly His Leu Met
1 5 10

<210> 91
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 91
Ala Gly Cys Lys Asn Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys
1 5 10

<210> 92
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITE
<222> 8
<223> Xaa = psi(CH2-NH)

<400> 92
Gln Trp Ala Val Gly His Leu Xaa Leu
1 5

<210> 93
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 93
Arg Arg Lys Arg Arg Arg
 1   5

<210> 94
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 94
Ala Thr Trp Leu Pro Pro Arg
 1   5

<210> 95
<211> 18
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 95
Arg Thr Glu Leu Asn Val Gly Ile Asp Phe Asn Trp Glu Tyr Pro Ala
 1   5   10   15
Ser Lys

<210> 96
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 96
His His Glu Val Val Lys Phe Met Asp Val Tyr Gln
 1   5   10

<210> 97
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido anticáncer

<400> 97
Asn Ile Thr Val Thr Leu Lys Lys Phe Pro Leu
1 5 10

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 98
Cys His Ser Gly Tyr Val Gly Val Arg Cys
1 5 10

<210> 99
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 99
Tyr Cys Asp Gly Phe Tyr Ala Cys Tyr Met Asp Val
1 5 10

<210> 100
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 100
Gly Gly Cys Lys Leu Trp Thr Ile Pro Glu Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 101
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 101
Ala Val Leu Pro Arg
1 5

<210> 102
<211> 19

<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 102
Tyr Gly Arg Prc Arg Glu Ser Gly Lys Lys Arg Lys Arg Lys Arg Leu
 1   5   10   15
Lys Pro Thr

<210> 103
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 103
Cys Pro Ser Glu Gly Leu Cys
 1   5

<210> 104
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 104
Cys Pro Ser Glu Gly Thr Pro Ser Thr His Val Leu Cys
 1   5   10

<210> 105
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 105
Leu Ala Asn Gly Val Glu
 1   5

<210> 106
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 106

Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu
1 5

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 107
Val Ala Asn Pro Gln Ala Glu Gly Gln Leu
1 5 10

<210> 108
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITE
<222> (1)...(6)
<223> Péptido cíclico

<400> 108
Lys Gly Asp Gln Leu Ser
1 5

<210> 109
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITIO
<222> (1)...(8)
<223> Péptido cíclico

<221> SITIO
<222> 3
<223> Xaa = Cln

<400> 109
Tyr Ser Xaa Val Leu Phe Lys Gly
1 5

<210> 110
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>

<223> Péptido anticáncer

<400> 110
Glu Met Thr Pro Val Asn Pro Gly
 1   5

<210> 111
<211> 7
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 111
Ile Glu Leu Leu Gln Ala Arg
 1   5

<210> 112
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 112
Cys Val Ser Asn Lys Tyr Phe Ser Asn Ile His Trp Cys
 1   5   10

<210> 113
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITIO
<222> (2)...(3)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<400> 113
Phe Xaa Xaa Tyr Lys Trp
 1   5

<210> 114
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITIO
<222> (3)...(4)
<223> Xaa = cualquier aminoácido

<221> SITIO
<222> (5)...(5)
<223> Xaa = Ar

<400> 114
Lys Trp Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 115
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 115
Leu Asn Phe Ser Gln Tyr Leu Trp Tyr Thr
1 5 10

<210> 116
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 116
Lys Pro Ser Ser Pro Pro Glu Glu
1 5

<210> 117
<211> 12
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 117
Met Pro Arg Phe Met Asp Tyr Trp Glu Gly Leu Asn
1 5 10

<210> 118
<211> 20
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 118
Met Val Arg Arg Phe Leu Val Thr Leu Arg Ile Arg Arg Ala Cys Gly
1 5 10 15
Pro Pro Arg Val

20

<210> 119
<211> 22
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 119
Gly Ser Arg Ala His Ser Ser His Leu Lys Ser Lys Gly Gln Ser Thr
1 5 10 15
Ser Arg His Lys Lys Leu
20

<210> 120
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 120
Cys Ala Phe Tyr Ile
1 5

<210> 121
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 121
Leu Cys Ala Phe Tyr Ile Met Ala Lys
1 5

<210> 122
<211> 9
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 122
Met Cys Ser Met Tyr Gly Ile Cys Lys
1 5

<210> 123
<211> 19
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 123
Tyr Ser Phe Val His Gly Phe Phe Asn Phe Arg Val Ser Trp Arg Glu
 1   5   10   15
Met Leu Ala

<210> 124
<211> 20
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 124
Lys Arg Arg Gln Thr Ser Met Thr Ala Phe Tyr His Ser Lys Arg Arg
 1   5   10   15
Leu Ile Phe Ser
            20

<210> 125
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 125
Lys Arg Arg Leu Ile Phe Ser Lys
 1   5

<210> 126
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 126
Phe Leu Asp Thr Leu Val Val Leu His Arg
 1   5   10

<210> 127
<211> 19
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 127

Arg Cys Val Arg Cys Arg Phe Val Val Trp Ile Gly Leu Arg Val Arg
1 5 10 15
Cys Leu Val

<210> 128
<211> 23
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 128
Leu Asn Trp Ala Trp Ala Ala Glu Val Leu Lys Val Gln Lys Arg Arg
1 5 10 15
Ile Tyr Asp Ile Thr Asn Val
20

<210> 129
<211> 8
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 129
Leu Glu Gly Ile Gln Leu Ile Ala
1 5

<210> 130
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 130
Phe Trp Leu Arg Phe Thr
1 5

<210> 131
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 131
Trp Val Arg Trp His Phe
1 5

<210> 132

<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 132
Trp Val Arg Trp His
1 5

<210> 133
<211> 6
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 133
Trp His Phe Ile Phe Trp
1 5

<210> 134
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 134
Ile Trp Leu Ser Gly Leu Ser Arg Gly Val Trp Val Ser Phe Pro
1 5 10 15

<210> 135
<211> 15
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 135
Gly Ser Arg Ile Leu Thr Phe Arg Ser Gly Ser Trp Tyr Ala Ser
1 5 10 15

<210> 136
<211> 14
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 136
Asp Glu Leu Lys Arg Ala Phe Ala Ala Leu Arg Asp Gln Ile

1 5 10

<210> 137
<211> 17
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 137
Lys Lys Leu Ser Glu Cys Leu Lys Lys Arg Ile Gly Asp Glu Leu Asp
1 5 10 15
Ser

<210> 138
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 138
Gly Gln Val Gly Arg Gln Leu Ala Ile Ile Gly Asp Asp Ile Asn Arg
1 5 10 15

<210> 139
<211> 16
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 139
Arg Asn Ile Ala Arg His Leu Ala Gln Val Gly Asp Ser Met Asp Arg
1 5 10 15

<210> 140
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 140
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 141
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 141
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 142
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 142
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 143
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 143
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 144
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITIO
<222> 1
<223> Xaa = para-aminoPhe

<400> 144
Xaa Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 145
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 145

Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 146
<211> 13
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<221> SITIO
<222> 7
<223> Xaa = C(O)

<400> 146
Arg Ser Gly Ile Tyr Asp Xaa Asp Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5 10

<210> 147
<211> 3
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 147
Arg Gly Asp
1

<210> 148
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 148
Tyr Ile Gly Ser Arg
1 5

<210> 149
<211> 20
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 149
Ile Pro Cys Asn Asn Lys Gly Ala His Ser Val Gly Leu Met Trp Trp
1 5 10 15
Met Leu Ala Arg
20

<210> 150
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 150
Ser Pro His Arg Pro Arg Phe Ser Pro Ala
1 5 10

<210> 151
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 151
Ser Pro His Ala His Gly Tyr Ile Pro Ser
1 5 10

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 152
Thr Pro His Thr His Asn Arg Thr Pro Glu
1 5 10

<210> 153
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 153
Thr Pro His Arg His Gln Lys Thr Pro Glu
1 5 10

<210> 154
<211> 11
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 154
Glu Pro His Arg His Ser Ile Phe Thr Pro Glu
1 5 10

<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 155
Cys His Ala Val Cys
1 5

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 156
Cys Glu Lys His Ile Met Glu Lys Ile Gln Gly Arg Gly Asp Asp Asp
1 5 10 15
Asp

<210> 157
<211> 10
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido anticáncer

<400> 157
Cys Thr Thr His Trp Gly Phe Thr Leu Cys
1 5 10

<210> 158
<211> 31
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> GLP-1(7-37)

<400> 158
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly
20 25 30

<210> 159
<211> 93
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> GLP-1(7-37)

<400> 159
catgctgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga gga 93

<210> 160
<211> 30
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> GLP-1(7-36)

<400> 160
His Ala Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg
20 25 30

<210> 161
<211> 90
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> GLP-1(7-36)

<400> 161
catgctgaag ggacctttac cagtgatgta agttcttatt tggaaggcca agctgccaag 60
gaattcattg cttggctggt gaaaggccga 90

<210> 162
<211> 39
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Extendina-4

<400> 162
His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 163
<211> 117
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>

<223> Extendina-4

<400> 163
catggtgaag gaacatttac cagtgacttg tcaaaacaga tggaagagga ggcagtgcgg 60
ttatttattg agtggcttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcg 117

<210> 164
<211> 37
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Oxintomodulina

<400> 164
His Ser Gln Gly Thr Phe Thr Ser Asp Tyr Ser Lys Tyr Leu Asp Ser
1 5 10 15
Arg Arg Ala Gln Asp Phe Val Gln Trp Leu Met Asn Thr Lys Arg Asn
20 25 30
Arg Asn Asn Ile Ala
35

<210> 165
<211> 111
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> Oxintomodulina

<400> 165
cattcacagg gcacattcac cagtgactac agcaagtatc tggactccag gcgtgcccaa 60
gattttgtgc agtggttgat gaataccaag aggaacagga ataacattgc c 111

<210> 166
<211> 39
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Extendina-3

<400> 166
His Ser Asp Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15
Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30
Ser Gly Ala Pro Pro Pro Ser
35

<210> 167
<211> 117
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> Extendina-3

<400> 167
catagtgatg gaacatttac cagtgacttg tcaaaacaga tggaagagga ggcagtgcgg 60
ttatttattg agtggcttaa gaacggagga ccaagtagcg gggcacctcc gccatcg 117

<210> 168
<211> 34
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> PYY(3-36)

<400> 168
Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
 1   5   10   15
Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
            20   25   30
Arg Tyr

<210> 169
<211> 102
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> PYY(3-36)

<400> 169
atcaaacccg aggctcccgg cgaagacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc 60
tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at 102

<210> 170
<211> 42
<212> PRT
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido inhibitorio gástrico

<400> 170
Tyr Ala Glu Gly Thr Phe Ile Ser Asp Tyr Ser Ile Ala Met Asp Lys
 1   5   10   15
Ile His Gln Gln Asp Phe Val Asn Trp Leu Leu Ala Gln Lys Gly Lys
            20   25   30
Lys Asn Asp Trp Lys His Asn Ile Thr Gln
        35   40

<210> 171
<211> 126
<212> DNA
<213> Desconocido

<220>
<223> Péptido inhibitorio gástrico

<400> 171
tacgcggaag ggactttcat cagtgactac agtattgcca tggacaagat tcaccaacaa 60
gactttgtga actggctgct ggcccaaaag gggaagaaga atgactggaa acacaacatc 120
acccag 126

<210> 172

<211> 39

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> análogo GLP-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (3)..(3)

<223> Glu, or Asp

<220>

<221> misc_feature

<222> (5)..(5)

<223> Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (8)..(8)

<223> Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Val, Ala, Gly, Ser, Thr,. Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (11)..(11)

<223> Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Leu, Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr, or Ly
s

<220>

<221> misc_feature

<222> (15)..(15)

<223> Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (18)..(18)

<223> Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, or His

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Leu, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (25)..(25)

<223> Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (26)..(26)

<223> Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, or His

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, or His

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, or Lys, or is d eleted

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, or His, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, or His, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Gly, Asp, Glu, or Lys, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, or Lys, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminaod, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> Ser, Pro, Lys, Glu, or Asp, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> Ser, Pro, Glu, Asp, or Lys, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Gly, Pro, Glu, Asp, or Lys, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> Ala, Ser, Val, Glu, Asp, or Lys, o es eliminado, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, este aminoácido también es eliminado

<400> 172

His Xaa Xaa Gly Xaa Phe Thr Xaa Asp Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
1 5 10 15

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35

<210> 173

<211> 40

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> análogo GLP-1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (1)..(1)

<223> L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, (3-hidroxi-histidina, homohistidina, Na-acetil-histidina, a-fluoro metil-histidina, a-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridil alanina o 4-piridilalanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, Aib, ácido (1-aminocyclopropyl) carboxílico, ácido (1- aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil) carboxílico

<220>

<221> misc_feature

<222> (10)..(10)

<223> Val or Leu

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Ser, Lys or Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (13)..(13)

<223> Tyr or Gln

<220>

<221> misc_feature

<222> (14)..(14)

<223> Leu or Met

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Gly, Glu or Aib

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Gln, Glu, Lys or Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (19)..(19)

<223> Ala or Val

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Lys, Glu or Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (21)..(21)

<223> Glu or Leu

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Ala, Glu or Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (27)..(27)

<223> Val or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Gly or Aib

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Lys, Glu, Asn or Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Arg, Gly or Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está usente

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> es Lys, Ser, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (33)..(33)

<223> Ser, Lys, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminadc

<220>

<221> misc_feature

<222> (34)..(34)

<223> Gly, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (35)..(35)

<223> Ala, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (36)..(36)

<223> Pro, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (37)..(37)

<223> Pro, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (38)..(38)

<223> Pro, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (39)..(39)

<223> Ser, amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> amida o está ausente; con la condición de que si Xaa38, Xaa39, Xaa40, Xaa41, Xaa42, Xaa43, Xaa44, Xaa45 o Xaa46 está ausente, entonces cada residuo de aminoácido corriente abajo también está ausente

<220>

<221> misc_feature

<222> (40)..(40)

<223> amida o está ausente, con la condición de que cuando un aminoácido corriente arriba es eliminado, éste aminoácido también es eliminado

<400> 173

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Xaa Ser Xaa Xaa Xaa Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Ala Xaa Xaa Xaa Phe Ile Xaa Trp Leu Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
35 40

<210> 174

<211> 32

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> análogo de GLP-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (1)..(1)

<223> L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, ß-hidroxi-histidina, homohistidina, N'l-acetil-histidina, a-fluor ometyl-histidina, a -metyl-histidina, 3-piridilalanina, 2-piri dilalanina o 4-piridilalanina

<220>

<221> misc_feature

<222> (2)..(2)

<223> Ala, Gly, Val, Leu, Ile, Lys, ácido a-aminoisobutyric Aib), ácido (1-aminociclopropil) carboxílico, ácido (1- aminociclobutil) carboxílico, ácido (1-aminociclopentil) carboxílico, ácido (1-aminociclohexil) carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil) carboxílico, o ácido (1-amino cicloоctil) carboxílico

<220>

<221> misc_feature

<222> (12)..(12)

<223> Ser, Lys o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (16)..(16)

<223> Gly, Glu o Aib

<220>

<221> misc_feature

<222> (17)..(17)

<223> Gln, Glu, Lys o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (20)..(20)

<223> Lys, Glu o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (24)..(24)

<223> Ala, Glu o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (28)..(28)

<223> Lys, Glu o Arg

<220>

<221> misc_feature

<222> (29)..(29)

<223> Gly o Aib

<220>

<221> misc_feature

<222> (30)..(30)

<223> Arg o Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Gly, Ala, Glu o Lys

<220>

<221> misc_feature

<222> (32)..(32)

<223> Lys, amida o está ausente

<400> 174

Xaa Xaa Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Xaa Tyr Leu Glu Xaa
1 5 10 15

Xaa Ala Ala Xaa Glu Phe Ile Xaa Trp Leu Val Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa
20 25 30

<210> 175

<211> 44

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> análogo de GLP-1

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (44)..(44)

<223> - amida

<400> 175

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Pro Ser
20 25 30

Ser Gly Ala Pro Pro Ser Lys Lys Lys Lys Lys Lys
35 40

<210> 176

<211> 31

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> análogo de GLP-1

<220>

<221> misc_feature

<222> (31)..(31)

<223> Desconocido

<400> 176

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Leu Ser Lys Gln Met Glu Glu
1 5 10 15

Glu Ala Val Arg Leu Phe Ile Glu Trp Leu Lys Asn Gly Gly Xaa
20 25 30

<210> 177

<211> 498

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1(7-37)DOM7h8 con líder GAS (no enlazante) hebra sentido

<400> 177
catatgttat ttaaatcatt atcaaaatta gcaaccgcag cagcattttt tgcaggcgtg 60

gcaacagcgc atgctccagg gacctttacc agtgatgtaa gttcttattt ggaaggccaa 120

gctgccaagg aattcattgc ttggctggtg aaaggccgag gagacatcca gatgacccag 180

tctccatcct ccctgtctgc atctgtagga gaccgtgtca ccatcacttg ccgggcaagt 240

cagagcatta gcagctattt aaattggtat cagcagaaac cagggaaagc ccctaagctc 300

ctgatctatc ggaattcccc tttgcaaagt ggggtcccat cacgtttcag tggcagtgga 360

tctgggacag atttcactct caccatcagc agtctgcaac ctgaagattt tgctacgtac 420

tactgtcaac agacgtatag ggtgcctcct acgttcggcc aagggaccaa ggtggaaatc 480

aaacggtaat aaggatcc 498

<210> 178

<211> 498

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1(7-37)DOM7h8 con líder GAS (no enlazante) hebra antisentido

<400> 178
gtatacaata aatttagtaa tagttttaat cgttggcgtc gtcgtaaaaa acgtccgcac 60

cgttgtcgcg tacgaggtcc ctggaaatgg tcactacatt caagaataaa ccttccggtt 120

cgacggttcc ttaagtaacg aaccgaccac tttccggctc ctctgtaggt ctactgggtc 180

agaggtagga gggacagacg tagacatcct ctggcacagt ggtagtgaac ggcccgttca 240

gtctcgtaat cgtcgataaa tttaaccata gtcgtctttg gtccctttcg gggattcgag 300

gactagatag ccttaagggg aaacgtttca ccccagggta gtgcaaagtc accgtcacct 360

agaccctgtc taaagtgaga gtggtagtcg tcagacgttg gacttctaaa acgatgcatg 420

atgacagttg tctgcatatc ccacggagga tgcaagccgg ttccctggtt ccacctttag 480

tttgccatta ttcctagg 498

<210> 179

<211> 164

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1(7-37)DOM7h8 con líder GAS (no enlazante)

<400> 179

His Met Leu Phe Lys Ser Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ala Ala Ala Phe
1 5 10 15

Phe Ala Gly Val Ala Thr Ala His Ala Pro Gly Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp
35 40 45

Leu Val Lys Gly Arg Gly Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser
50 55 60

Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser
65 70 75 80

Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys
85 90 95

Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val
100 105 110

Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
115 120 125

Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
130 135 140

Thr Tyr Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

145 150 155 160

Lys Arg Gly Ser

<210> 180

<211> 507

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSS-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSS) hebra sentido

<400> 180
catatgttat ttaaatcatt atcaaaatta gcaaccgcag cagcattttt tgcaggcgtg 60

gcaacagcgc atgctccagg gacctttacc agtgatgtaa gttcttattt ggaaggccaa 120

gctgccaagg aattcattgc ttggctggtg aaaggccgag gaccaagctc ggacatccag 180

atgacccagt ctccatcctc cctgtctgca tctgtaggag accgtgtcac catcacttgc 240

cgggcaagtc agagcattag cagctattta aattggtatc agcagaaacc agggaaagcc 300

cctaagctcc tgatctatcg gaattcccct ttgcaaagtg gggtcccatc acgtttcagt 360

ggcagtggat ctgggacaga tttcactctc accatcagca gtctgcaacc tgaagatttt 420

gctacgtact actgtcaaca gacgtatagg gtgcctccta cgttcggcca agggaccaag 480

gtggaaatca aacgtaata aggatcc 507

<210> 181

<211> 507

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSS-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSS) hebra antisentido

<400> 181
gtatacaata aatttagtaa tagttttaat cgttggcgtc gtcgtaaaaa acgtccgcac 60

cgttgtcgcg tacgaggtcc ctggaaatgg tcactacatt caagaataaa ccttccggtt 120

cgacggttcc ttaagtaacg aaccgaccac tttccggctc ctggttcgag cctgtaggtc 180

tactgggtca gaggtaggag ggacagacgt agacatcctc tggcacagtg gtagtgaacg 240

gcccgttcag tctcgtaatc gtcgataaat ttaaccatag tcgtctttgg tccctttcgg 300

ggattcgagg actagatagc cttaagggga aacgtttcac cccagggtag tgcaaagtca 360

ccgtcaccta gaccctgtct aaagtgagag tggtagtcgt cagacgttgg acttctaaaa 420

cgatgcatga tgacagttgt ctgcatatcc cacggaggat gcaagccggt tccctggttc 480

caccttttagt ttgccattat tcctagg 507

<210> 182

<211> 167

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSS-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSS)

<400> 182

His Met Leu Phe Lys Ser Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ala Ala Ala Phe
1 5 10 15

Phe Ala Gly Val Ala Thr Ala His Ala Pro Gly Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp
35 40 45

Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
50 55 60

Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
65 70 75 80

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys
85 90 95

Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln
100 105 110

Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
115 120 125

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
130 135 140

Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
145 150 155 160

Val Glu Ile Lys Arg Gly Ser
165

<210> 183

<211> 516

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSSGAP-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSSGAP) hebra sentido

<400> 183
catatgttat ttaaatcatt atcaaaatta gcaaccgcag cagcattttt tgcaggcgtg 60

gcaacagcgc atgctccagg gacctttacc agtgatgtaa gttcttattt ggaaggccaa 120

gctgccaagg aattcattgc ttggctggtg aaaggccgag gaccaagctc gggagcaccg 180

gacatccaga tgacccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 240

atcacttgcc gggcaagtca gagcattagc agctatttaa attggtatca gcagaaacca 300

gggaaagccc ctaagctcct gatctatcgg aattcccctt tgcaaagtgg ggtcccatca 360

cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 420

gaagattttg ctacgtacta ctgtcaacag acgtataggg tgcctcctac gttcggccaa 480

gggaccaagg tggaaatcaa acggtaataa ggatcc 516

<210> 184

<211> 516

<212> DNA

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSSGAP-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSSGAP) hebra antisentido

<400> 184
gtatacaata aatttagtaa tagttttaat cgttggcgtc gtcgtaaaaa acgtccgcac 60

cgttgtcgcg tacgaggtcc ctggaaatgg tcactacatt caagaataaa ccttccggtt 120

cgacggttcc ttaagtaacg aaccgaccac tttccggctc ctggttcgag ccctcgtggc 180

ctgtaggtct actgggtcag aggtaggagg gacagacgta gacatcctct ggcacagtgg 240

tagtgaacgg cccgttcagt ctcgtaatcg tcgataaatt taaccatagt cgtctttggt 300

ccctttcggg gattcgagga ctagatagcc ttaaggggaa acgtttcacc ccagggtagt 360

gcaaagtcac cgtcacctag accctgtcta aagtgagagt ggtagtcgtc agacgttgga 420

cttctaaaac gatgcatgat gacagttgtc tgcatatccc acggaggatg caagccggtt 480

ccctggttcc acctttagtt tgccattatt cctagg 516

<210> 185

<211> 170

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> [Pro9]GLP-1-PSSGAP-iDOM7h-8 con líder GAS (enlazante PSSGAP)

<400> 185

His Met Leu Phe Lys Ser Leu Ser Lys Leu Ala Thr Ala Ala Ala Phe
1 5 10 15

Phe Ala Gly Val Ala Thr Ala His Ala Pro Gly Thr Phe Thr Ser Asp
20 25 30

Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp
35 40 45

Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro Ser Ser Gly Ala Pro Asp Ile Gln Met
50 55 60

Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr
65 70 75 80

Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr
85 90 95

Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Asn Ser
100 105 110

Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly
115 120 125

Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala
130 135 140

Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro Thr Phe Gly Gln
145 150 155 160

Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Gly Ser
165 170

<210> 186

<211> 142

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Fusión DOM7h-8 PYY3-36

<400> 186

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr
20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ile Lys Pro Glu
100 105 110

Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala
115 120 125

Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
130 135 140

<210> 187

<211> 142

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Fusión PYY DOM7h-8

<400> 187

Ile Lys Pro Glu Ala Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn
1 5 10 15

Arg Tyr Tyr Ala Ser Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln
20 25 30

Arg Tyr Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
35 40 45

Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser
50 55 60

Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
65 70 75 80

Leu Ile Tyr Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
85 90 95

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
100 105 110

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val
115 120 125

Pro Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
130 135 140

<210> 188

<211> 173

<212> PRT

<213> Desconocido

<220>

<223> Fusión GLP-1 7-37DOM7h-8 PYY3-36

<400> 188

His Ala Pro Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
1 5 10 15

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Asp
20 25 30

Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp
35 40 45

Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu
50 55 60

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
65 70 75 80

Arg Asn Ser Pro Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
85 90 95

Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu
100 105 110

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Thr Tyr Arg Val Pro Pro Thr
115 120 125

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Ile Lys Pro Glu Ala
130 135 140

Pro Gly Glu Asp Ala Ser Pro Glu Glu Leu Asn Arg Tyr Tyr Ala Ser
145 150 155 160

Leu Arg His Tyr Leu Asn Leu Val Thr Arg Gln Arg Tyr
165 170

ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY

RESUMEN, OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCIÓN

Fusiones y conjugados de fármaco que contienen un agente terapéutico o diagnóstico de incretina, que está fusionado o conjugado con un fragmento de enlace a un antígeno de un anticuerpo que enlaza a albúmina en suero. Los conjugados y la fusión tienen una vida media más larga *in vivo* en comparación con el agente terapéutico o diagnóstico no conjugado o no fusionado.

476

ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud reclama el beneficio de prioridad de la solicitud de patente provisional estadounidense No. 60/632,361, presentada el 2 de diciembre de 2004 y el beneficio de prioridad de la solicitud de patente GB No. 0511019.2. La totalidad de las enseñanzas de las solicitudes anteriormente mencionadas está incorporada aquí mediante referencia.

Antecedentes de la invención

Muchos fármacos que poseen actividades que podrían ser útiles para propósitos terapéuticos y/o de de diagnóstico tienen valor limitado debido a que se eliminan rápidamente del cuerpo cuando se administran. Por ejemplo, muchos polipéptidos que tienen actividades útiles terapéuticamente son eliminados rápidamente de la circulación por medio del riñón. De acuerdo con esto, se tiene que administrar una dosis grande con el fin de lograr un efecto terapéutico deseado. Existe una necesidad de agentes terapéuticos y diagnósticos mejorados que tengan propiedades farmacocinéticas mejoradas. Los polipéptidos que enlazan a la albúmina en suero son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, EP 0486525 B1 (Cemu Bioteknik AB); US 6,267,964 B1 (Nygren *et al*); WO 04/001064 A2 (Dyax, Corp.); WO 02/076489 A1 (Dyax, Corp.); WO 01/45746 (Genentech, Inc.).)

Una de estas clases de fármacos que tiene una vida media

corta en el cuerpo o en la circulación sistémica son las hormonas incretinas tales como el péptido 1 similar al glucagón, o el péptido YY. El péptido 1 similar al glucagón (GLP-1) es una hormona incretina con potentes acciones insulinotrópicas y glucagonostáticos dependientes de glucosa, efectos tróficos sobre las células β pancreáticas, y efectos inhibitorios sobre la secreción y motilidad gastrointestinal, los cuales se combinan para disminuir la glucosa en plasma y reducir las excursiones glicémicas. Adicionalmente, por medio de su capacidad para mejorarla saciedad, el GLP-1 reduce la absorción de alimentos, limitando con ello el aumento de peso, y aún puede ocasionar pérdida de peso. Tomadas juntas, estas acciones dan al GLP-1 un perfil único, considerado altamente deseable para un agente antidiabético, particularmente dado que la dependencia de glucosa de sus efectos antihiperglicémicos debería reducir al mínimo cualquier riesgo de hipoglicemia grave. Sin embargo, su perfil farmacocinético/farmacodinámico es tal que el GLP-1 originario no es útil terapéuticamente. Así, mientras el GLP-1 es más efectivo cuando se administre continuamente, las inyecciones subcutáneas solas tienen efectos de corta duración. El GLP-1 es altamente susceptible a la degradación enzimática *in vivo*, y la escisión por la dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) probablemente es lo más relevante, dado que esto ocurre rápidamente y genera un metabolito no insulinotrópico. Las estrategias para aprovechar el potencial terapéutico del GLP-1 basadas en una comprensión de los factores que influyen en su estabilidad metabólica y en su perfil

farmacocinético/farmacodinámico, han sido por lo tanto el foco de intensas investigaciones.

Se ha realizado trabajo extensivo para intentar inhibir la peptidasa o modificar el GLP-1 de forma tal que su degradación se ralentice al tiempo que todavía mantenga su actividad biológica. WO05/027978 describe derivados de GLP-1 que tienen un perfil de acción prolongada (e incorporada aquí mediante referencia como ejemplos de derivados de GLP-1 y análogos que se puede utilizar en la presente invención). WO 02/46227 describe proteínas de fusión heterólogas que contienen un polipéptido (por ejemplo, albúmina) fusionado con GLP-1 o análogos (la descripción de estos análogos está incorporada aquí mediante referencia como ejemplos de análogos de GLP-1 que se pueden utilizar en la presente invención). WO 05/003296, WO 03/060071, WO 03/059934 describen proteínas de fusión amino en donde el GLP-1 se ha fusionado con albúmina para intentar aumentar la vida media de la hormona.

Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, no ha sido producido un GLP-1 de larga duración. Como tal, particularmente en los campos de la diabetes y de la obesidad, hay una tremenda necesidad de péptidos GLP-1 u otros agentes mejorados que de manera similar tengan un efecto insulinotrópico susceptible de tratamiento para la diabetes y la obesidad en particular. Por lo tanto, hay una necesidad de modificar el GLP1 y otros péptidos insulinotrópicos para proporcionar una duración más prolongada de la acción *in vivo*, al tiempo que mantengan su baja toxicidad y ventajas terapéuticas.

Breve descripción de la invención

La invención se refiere a fusiones de fármaco y a conjugados de fármaco que tienen vidas medias en suero mejoradas. En un aspecto, la fusión de fármaco es una cadena continua de polipéptido que tiene la fórmula: a-$(X)_{n1}$-b-$(Y)_{n2}$-c-$(Z)_{n3}$-d o a-$(Z)_{n3}$-b-$(Y)_{n2}$-c-$(X)_{n1}$-d, en donde

X es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de enlace para un primer objetivo;

Y es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero;

Z es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de enlace para un segundo objetivo;

a, b, c y d están ausentes cada uno independientemente o son desde uno hasta aproximadamente 100 residuos de aminoácido;

n1 es desde uno hasta aproximadamente 10;

n2 es desde uno hasta aproximadamente 10; y

n3 es cero hasta aproximadamente 10,

con la condición de que cuando n1 y n2 son ambos uno y n3 es cero, X no contenga una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo.

En algunas modalidades, Y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10,

480

SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. En modalidades particulares, X es GLP-1 o un análogo de GLP-1.

En otro aspecto, la fusión de fármaco contiene una cadena continua de polipéptido, dicha cadena contiene porciones X' y Y', en donde

X' es un fármaco de polipéptido, con la condición de que X' no contenga una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo; y

Y' es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero. En algunas modalidades, Y' contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. En modalidades particulares, X' es GLP-1 o un análogo de GLP-1.

En otro aspecto, la invención es un conjugado de fármaco que contiene un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero; y un fármaco que está unido covalentemente a dicho V_H o V_L. En algunas modalidades, el dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. En modalidades particulares, el fármaco es GLP-1 o un análogo de GLP-1.

La invención también proporciona ácidos nucleicos recombinantes y construcciones que codifican las fusiones de fármaco descritos aquí, y células hospederas que contienen los ácidos nucleicos y/o construcciones recombinantes. La invención proporciona además un método para producir una fusión de fármaco que comprende mantener una célula hospedera que contiene un ácido nucleico recombinante y/o una construcción que codifica una fusión de fármaco descrito aquí bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicho ácido nucleico recombinante, mediante el cual se produce una fusión de fármaco.

La invención también proporciona composiciones (por ejemplo, composiciones farmacéuticas) que contienen una fusión de fármaco o conjugado de fármaco de la invención. La invención también proporciona un método para tratar a un individuo que tiene una enfermedad o trastorno, tal como los descritos aquí, que comprende administrar a dicho individuo una cantidad efectiva terapéuticamente de un conjugado de fármaco o fusión de fármaco de la invención. En algunas modalidades, la enfermedad o trastorno es una enfermedad inflamatoria, tal como artritis (por ejemplo, artritis reumatoide). En una modalidad adicional, la enfermedad o trastorno es una enfermedad metabólica tal como diabetes u obesidad. La invención también proporciona el uso de un conjugado de fármaco o fusión de fármaco de la invención para la fabricación de un medicamento para el tratamiento de una enfermedad o trastorno, tal como una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide)), o diabetes u obesidad. La invención también se refiere al uso de una fusión de fármaco o conjugado de fármaco como se describe aquí para su uso en terapia, diagnóstico o profilaxis.

En otro aspecto, la invención es un conjugado de fármaco no covalente que contiene un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (VH) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (VL) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, y un fármaco que está unido de manera no covalente a dicho VH o VL. En algunas modalidades, el dominio

483

variable de cadena pesada de inmunoglobulina contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, o una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

En una modalidad adicional, la invención proporciona una versión inactivada de Dom7h-8, iDom7h-8, que no se enlaza a la albúmina de suero, la cual se utiliza como una herramienta de investigación y es predictiva de el enlace a la albúmina de suero de Dom7h-8.

Breve descripción de los dibujos

La figura 1A es una alineación de las secuencias de aminoácidos de tres Vκ seleccionados mediante enlace a albúmina de suero de ratón (MSA). Las secuencias de aminoácidos alineadas son de Vκ denominados MSA16, al cual también se hace referencia como DOM7m-16 (SEQ ID NO:1), MSA 12, al cual también se hace referencia como DOM7m-12 (SEQ ID NO:2), y MSA 26, al cual también se hace referencia como DOM7m-26 (SEQ ID NO:3).

La figura 1B es una alineación de las secuencias de aminoácidos de seis Vκ seleccionados por su enlace a albúmina de suero de rata (RSA). Las secuencias de aminoácidos alineadas son de Vκ denominados DOM7r-1 (SEQ ID NO:4), DOM7r-3 (SEQ ID

NO:5), DOM7r-4 (SEQ ID NO:6), DOM7r-5 (SEQ ID NO:7), DOM7r-7 (SEQ ID NO:8), y DOM7r-8 (SEQ ID NO:9).

La figura 1C es una alineación de las secuencias de aminoácidos de seis Vκ seleccionados por su enlace a albúmina de suero humana (HSA). Las secuencias de aminoácidos alineadas son de Vκ denominados DOM7h-2 (SEQ ID NO: 10), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 11), DOM7h-4 (SEQ ID NO:12), DOM7h-6 (SEQ ID NO:13), DOM7h-1 (SEQ ID NO:14), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 15).

La figura 1D es una alineación de las secuencias de aminoácidos de siete V_H seleccionados mediante enlace a albúmina de suero humana y una secuencia de consenso (SEQ ID NO:23). Las secuencias alineadas son de Vκ denominados DOM7h-22 (SEQ ID NO: 16), DOM7h-23 (SEQ ID NO:17), DOM7h-24 (SEQ ID NO:18), DOM7h-25 (SEQ ID NO:19), DOM7h-26 (SEQ ID NO:20), DOM7h-21 (SEQ ID NO:21), y DOM7h-27 (SEQ ID NO:22).

La figura 1E es una alineación de las secuencias de aminoácidos de tres Vκ seleccionados mediante enlace a albúmina de suero humana y albúmina de suero de rata. Las secuencias de aminoácidos alineadas son de Vκ denominados DOM7h-8 (SEQ ID NO:24), DOM7r-13 (SEQ TD NO:25), y DOM7r-14 (SEQ ID NO:26).

Las figuras 2A y 2B son mapas esquemáticos de los vectores utilizados para expresar las fusiones MSA16IL-1ra (también denominada DOM7m-16/IL-1ra) y IL-1raMSA16 (también denominada IL-1ra/DOM7m-16), respectivamente. La figura 2C-2D es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:27) que

485

codifica la fusión de IL-1raMSA16 (también denominada IL-1ra/DOM7m-16) y de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:28) de la fusión.

Las figuras 2E y 2F son una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:29) que codifica la fusión de MSA16IL-1ra (también denominada DOM7m-16/IL-1ra) y de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:30) de la fusión.

Las figuras 2G y 2H son una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:31) que codifica la fusión de IL-1ra ficticia que no se enlazó a albúmina de suero, y de la secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:32) de la fusión.

La figura 3A es una ilustración que muestra que la IL-1 induce la producción de IL-8 por las células HeLa, y muestra el mecanismo mediante el cual la IL-8 es detectada en un análisis ELISA.

La figura 3B es un gráfico que muestra que la IL-1ra (♦), MSA16IL-1ra (■) y la IL-1raMSA16 (A) inhiben cada una la secreción de IL-8 inducida por IL-1 por células MRC-5 cultivadas. La inhibición observada fue dependiente de la dosis para IL-1ra, MSA16IL-1ra y IL-1raMSA16.

Las figuras 4A-4C son gráficos que muestran que la IL-1ra (♦) y la MSA16IL-1ra (■) inhiben ambas la secreción de IL-8 inducida por IL-1 por células MRC-5 cultivadas en análisis que no incluyen albúmina de suero de ratón (4A), albúmina de suero de ratón al 5% (4B) o albúmina de suero de ratón al 10% (4C). La inhibición observada fue dependiente de la dosis para IL-1ra y MSA16IL-1ra

bajo todas las condiciones sometidas a prueba.

La figura 5 es una presentación esquemática de los resultados de un ELISA que demuestra que la fusión de MSA16IL-1ra y la fusión de IL-1raMSA16 ambas se enlazaron a la albúmina de suero, pero la fusión de IL-1ra ficticia no lo hizo.

Las figuras 6A-6C son sensogramas que muestran los datos e afinidad de BIACORE para el enlace del clon DOM7h-1 a albúmina de suero humana (HSA) (6A), para el enlace de DOM7h-7 a HSA (6B) y para el enlace de DOM7r-1 a albúmina de suero de rata (RSA).

La figura 7 es una tabla que muestra las afinidades de DOM7h-1, DOM7r-1, DOM7h-2, DOM7r-3, DOM7h-7, DOM7h-8, DOM7r-8, DOM7r-13, DOM7r-14, DOM7m-16, DOM7h-22, DOM7h-23, DOM7h-26, DOM7r-16, DOM7m-26, DOM7r-27 y DOM7R-31 para las albúminas de suero a las cuales se enlazan.

La figura 8A es una ilustración de la secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:33) de un ácido nucleico que codifica el antagonista del receptor de interleucina 1 humana (IL-1ra) depositado en GenBank bajo el número de acceso NM_173842. El ácido nucleico tiene un marco de lectura abierto que comienza en la posición 65.

La figura 8B es una ilustración de la secuencia de aminoácidos de IL-1ra humana (SEQ ID NO:34) codificada por el ácido nucleico que se muestra en la figura 8A (SEQ ID NO:33). La proteína madura está constituida por 152 residuos de aminoácido (residuos de aminoácido 26-177 de la SEQ ID NO:34).

La figura 9 es un gráfico que muestra la concentración (μg/mL)

de Proteína de fusión con etiqueta de epítopo dAb/HA de enlace a MSA en suero de ratón después de una sola inyección intravenosa (i.v.) (la dosis fue de aproximadamente 1.5 mg/kg) en animales machos de la cepa CDI en el tiempo (días). Se determinó la concentración en suero mediante ELISA usando reactivos para detección de captura anti-HA de cabra (Abeam, UK) y proteína L-HRP (Invitrogen, USA). Se establecieron las curvas estándar de concentraciones conocidas de fusión de dAb/HA con enlace a MSA en la presencia de suero de ratón Ix para asegurar la comparabilidad con las muestras de prueba. El modelado con un modelo de 1 compartimiento (Software WinNonlin, Pharsight Corp., USA) mostró que la proteína de fusión con etiqueta de epítopo dAb/HA de enlace a MSA tuvo una fase terminal t 1/2 de 29.1 horas y un área bajo la curva de 559 h·μg/mL.

La figura 10 es una ilustración de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de Vκ seleccionados mediante enlace a albúmina de suero de rata (RSA). Las secuencias ilustradas son de Vκ denominados DOM7r-15 (SEQ ID NO:37), DOM7r-16 (SEQ ID NO:38), DOM7r-17 (SEQ ID NO:39), DOM7r-18 (SEQ ID NO:40), DOM7r-19 (SEQ ID NO:41).

Las figuras 11A y 11B son una ilustración de las secuencias de aminoácidos de las secuencias de aminoácidos de Vκ que enlazan a albúmina de suero de rata (RSA). Las secuencias ilustradas son de Vκ denominados DOM7r-20 (SEQ ID NO:42), DOM7r-21 (SEQ ID NO:43), DOM7r-22 (SEQ ID NO:44), DOM7r-23 (SEQ ID NO:45),

DOM7r-24 (SEQ ID NO:46), DOM7r-25 (SEQ ID NO:47), DOM7r-26 (SEQ ID NO:48), DOM7r-27 (SEQ ID NO:49), DOM7r-28 (SEQ ID NO:50), DOM7r-29 (SEQ ID NO.51), DOM7r-30 (SEQ ID NO:52), DOM7r-31 (SEQ ID NO:53), DOM7r-32 (SEQ ID NO:54), DOM7r-33 (SEQ ID NO:55).

La figura 12 es un gráfico que muestra la concentración (% de dosis inicial) de DOM7m-16, DOM7m-26 o de un dAb de control que no se enlaza a MSA, cada uno de los cuales contenía una etiqueta de epítopo HA, en suero de ratón después de una sola inyección intravenosa (i.v.) (la dosis fue de aproximadamente 1.5 mg/kg) en animales machos de la cepa CDI en el tiempo. Se determinó la concentración en suero mediante ELISA usando reactivos para detección de captura anti-HA de cabra (Abeam, UK) y de proteína L-HRP (Invitrogen, USA). Se establecieron las curvas estándar de concentraciones conocidas de fusión de dAb/HA con enlace a MSA en la presencia de suero de ratón Ix, para asegurar la comparabilidad con las muestras de prueba. El modelado con un modelo de 1 compartimiento (Software WinNonlin, Pharsight Corp., USA) mostró que el dAb de control tuvo una fase terminal t 1/2α de 20 minutos, mientras que DOM7m-16, DOM7m-26 permanecieron en el suero por un tiempo significativamente más largo.

La figura 13 es un gráfico que muestra que el DOM7m-16/IL-1ra fue más efectivo que la IL-1ra o el ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation) para tratar la artritis en un modelo de artritis inducida por colágeno (CIA) en un ratón. Se indujo la artritis y

comenzando el día 21, los ratones fueron tratados con 0.4 mg/Kg de dexametasona (esteroide), con 1 mg/Kg de DOM7m-16/IL-1ra (1 mg/kg de IL-1ra/anti-SA) o con 10 mg/Kg (10 mg/kg de IL-1ra/anti-SA), con 1 mg/Kg o con 10 mg/Kg de IL-1ra, con 5 mg/Kg de ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation), o con salina. Los resultados muestran que el DOM7m-16/IL-1ra fue más efectivo que la IL-1ra o el ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation) en este estudio. La respuesta a IL-1ra fue dependiente de la dosis, como se esperaba, y la respuesta a DOM7m-16/IL-1ra también fue dependiente de la dosis. Las puntuaciones promedio para el tratamiento con 1 mg/Kg de DOM7m-16/IL-1ra fueron consistentemente menores que las puntuaciones promedio obtenidas mediante tratamiento con 10 mg/kg de IL-1ra. Los resultados indican que el tratamiento con DOM7m-16/IL-1ra fue 10 veces más efectivo que el tratamiento con IL-1ra en este estudio.

Las figuras 14A-14G ilustran las secuencias de aminoácidos de los polipéptidos de saporina. La figura 14A ilustra la secuencia de aminoácidos del precursor de saporina 2 depositada como número de acceso a Swissprot P27559 (SEQ ID NO: 60). El péptido señal está constituido por los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO:60. La figura 14B ilustra la secuencia de aminoácidos de saporina 3 depositada como número de acceso a Swissprot P27560 (SEQ ID NO:61). La figura 14C ilustra la secuencia de aminoácidos de precursor de saporina 4 depositada como número de acceso a Swissprot P27561 (SEQ ID NO:62). El péptido señal está constituido por los

aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO:62. La figura 14D ilustra la secuencia de aminoácidos de saporina 5 depositada como número de acceso a Swissprot Q41389 (SEQ ID NO:63). La figura 14E ilustra la secuencia de aminoácidos de precursor de saporina 6 depositada como número de acceso a Swissprot P20656 (SEQ ID NO:64). El péptido señal está constituido por los aminoácidos 1-24 de la SEQ ID NO:64, y un propéptido potencial está constituido por los aminoácidos 278-299 de la SEQ ID NO:64. El polipéptido maduro está constituido por los aminoácidos 25-277 de la SEQ ID NO:64 (SEQ ID NO:65). La figura 14F ilustra la secuencia de aminoácidos de saporina 7 depositada como número de acceso a Swissprot Q41391 (SEQ ID NO:66). La figura 14G ilustra una secuencia de aminoácidos de consenso que comprende diversas variantes e isoformas de saporina 6 (SEQ ID NO:67).

La figura 15 ilustra las secuencias de aminoácidos de varios V_{HH} de camélido que enlaza a albúmina de suero de ratón que están descritas en WO 2004/041862. Secuencia A (SEQ ID NO:72), Secuencia B (SEQ ID NO:73), Secuencia C (SEQ ID NO:74), Secuencia D (SEQ ID NO:75), Secuencia E (SEQ ID NO:76), Secuencia F (SEQ ID NO:77), Secuencia G (SEQ ID NO:78), Secuencia H (SEQ ID NO:79), Secuencia I (SEQ ID NO:80), Secuencia J (SEQ ID NO:81), Secuencia K (SEQ ID NO:82), Secuencia L (SEQ ID NO:83), Secuencia M (SEQ ID NO:84), Secuencia N (SEQ ID NO:85), Secuencia O (SEQ ID NO:86), Secuencia P (SEQ ID NO:87), Secuencia Q (SEQ ID NO:88).

491

La figura 16A es una ilustración de la secuencia de nucleótidos que codifica la fusión de [Pro^9] GLP-1-Dom7h8 (SEQ ID NO: 177) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO:179).

La figura 16B es una ilustración de la secuencia de nucleótidos que codifica la fusión de [Pro^9] GLP-1-PSS-Dom7h8 (SEQ ID NO: 180) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO: 182).

La figura 16C es una ilustración de la secuencia de nucleótidos que codifica la fusión de [Pro^9] GLP-1-PSSGAP-Dom7h8 (SEQ ID NO: 183) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO: 185).

La figura 17 es un gráfico que muestra que la fusión [Pro^9]GLP-1-PSSGAP-Dom7h8 (D) tuvo una actividad de proliferación celular dependiente de la dosis equivalente a la del GLP-1 control, (A), exendina 4 (V). Se muestra el control basal cero (♦).

La figura 18 es un gráfico que muestra que la fusión [Pro^9] GLP-1-PSSGAP-Dom7h8 (D) tuvo una liberación de insulina dependiente de la dosis equivalente a la de GLP-1 control, (A), exendina 4 (▼). Se muestra el control basal cero (♦).

Las figuras 19A-19C ilustran la secuencia de aminoácidos de las fusiones Dom7h-8 PYY (3-36) (SEQ ID NO:186), PYY (3-36) DOM7h-8 (SEQ ID NO:187) y [Pro^9] GLP-1(3-37)-DOM 7h-8 PYY (3-36) (SEQ ID NO: 188) respectivamente.

Descripción detallada de la invención

Dentro de esta especificación, se ha descrito modalidades en

una forma que permite que se escriba una especificación clara y concisa, pero se pretende, y debe tenerse en cuenta, que las modalidades pueden ser combinadas de manera diversa o separadas sin apartarse de la invención.

Como se usa aquí, "fármaco" se refiere a cualquier compuesto (por ejemplo, molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido) que se puede administrar a un individuo para producir un efecto terapéutico o diagnóstico beneficioso mediante enlace a y/o mediante alteración de la función de una molécula biológica objetivo en el individuo. La molécula objetivo puede ser una molécula objetivo endógena codificada por el genoma del individuo (por ejemplo, una enzima, receptor, factor de crecimiento, citocina codificada por el genoma del individuo) o una molécula objetivo exógena codificada por el genoma de un patógeno (por ejemplo, una enzima codificada por el genoma de un virus, bacteria, hongo, nemátodo u otro patógeno).

Como se usa aquí el término "base de fármaco" se refiere a actividades de composiciones de fármacos y de fármacos que están normalizadas con base en la cantidad de fármaco (o fracción de fármaco) utilizada para evaluar, medir o determinar la actividad. Generalmente, las composiciones de fármacos de la invención (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tienen un peso molecular mayor que el fármaco que contienen. Así, cantidades equivalentes de composición de fármacos y de fármaco, por peso, contendrán diferentes cantidades

de fármaco sobre una base molecular o molar. Por ejemplo, si una composición de fármacos de la invención tiene un peso molecular que es dos veces el peso molecular del fármaco que contiene, se puede determinar las actividades sobre una "base de fármaco" usando 2 μg de composición de fármacos y 1 μg de fármaco, debido a que estas cantidades podrían contener la misma cantidad de fármaco (como fármaco libre o como parte de la composición de fármaco). Las actividades se pueden normalizar y expresar sobre una "base de fármaco" usando los cálculos apropiados, por ejemplo, expresando actividad sobre una base por sitio de enlace objetivo, o para los fármacos de enzima, sobre una base por sitio activo.

Como se usa aquí, "composición de fármacos" se refiere a una composición que contiene un fármaco que está unido covalentemente o no covalentemente a una fracción enlazante de polipéptido, en donde la fracción enlazante de polipéptido contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. La composición de fármacos puede ser un conjugado en donde el fármaco está unido covalentemente o no covalentemente a la fracción enlazante de polipéptido. El fármaco puede estar unido covalentemente o no covalentemente a la fracción enlazante de polipéptido directamente o indirectamente (por ejemplo, a través de un enlazante apropiado y/o unión no covalente de compañeros de enlace complementarios (por ejemplo, biotina y avidina)). Cuando se emplea compañeros de enlace

complementarios, uno de los compañeros de enlace puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de una fracción enlazante apropiada, y el compañero de enlace complementario puede estar unido covalentemente a una fracción enlazante de polipéptido directamente o a través de una fracción enlazante apropiada. Cuando el fármaco es un polipéptido o péptido, la composición de fármacos puede ser una proteína de fusión, en donde el polipéptido o fármaco de péptido y la fracción enlazante de polipéptido son partes discretas (porciones) de una cadena continua de polipéptido.

Como se usa aquí "conjugado" se refiere a una composición que contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero que está unida a un fármaco. Estos conjugados incluyen "conjugado de fármaco," el cual contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, al cual está unido un fármaco de manera covalente, y "conjugados de fármaco no covalente" los cuales contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, al cual está unido un fármaco de manera no covalente.

Como se usa aquí, "conjugado de fármaco" se refiere a una composición que contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, al cual está unido un fármaco de manera covalente. El fármaco puede estar unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno directamente o

indirectamente a través de una fracción enlazante apropiada. El fármaco puede estar unido al fragmento de enlace a antígeno en cualquier posición apropiada, tal como el terminal amino, el terminal carboxilo o a través de cadenas laterales de aminoácidos apropiadas (por ejemplo, el grupo ϵ amino de lisina, o el grupo tiol de cisteína).

Como se usa aquí, "conjugado de fármaco no covalente" se refiere a una composición que contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, a la cual está unido un fármaco de manera no covalente. El fármaco puede estar unido de manera no covalente al fragmento de enlace a antígeno directamente (por ejemplo, por interacción electrostática, interacción hidrofóbica) o indirectamente (por ejemplo, a través de unión no covalente de compañeros de enlace complementarios (por ejemplo, biotina y avidina), en donde un compañero está unido covalentemente al fármaco y el compañero de enlace complementario está unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno). Cuando se emplea compañeros de enlace complementarios, uno de los compañeros de enlace puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de una fracción enlazante apropiada, y el compañero de enlace complementario puede estar unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero directamente o a través de una fracción enlazante apropiada.

Como se usa aquí, "fusión de fármaco" se refiere a una proteína de fusión que contiene un fragmento de enlace a antígeno

de un anticuerpo que se une a albúmina de suero y un fármaco de polipéptido. El fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero y el fármaco polipéptido están presentes como partes discretas (porciones) de una sola cadena de polipéptido continua.

El término "residuo de enlace a albúmina" como se usa aquí significa un residuo que se une de manera no covalente a albúmina de suero humana. El residuo de enlace a albúmina unido al polipéptido terapéutico típicamente tiene una afinidad por debajo de 10 μM hacia la albúmina de suero humana y preferiblemente por debajo de 1 pM. En una modalidad, se conoce una gama de residuos de enlace a albúminas entre porciones lipofílicas lineales y ramificadas que contienen desde 4 hasta 40 átomos de carbono, compuestos con un esqueleto ciclopentanofenantreno, péptidos que tienen desde 10 hasta 30 residuos de aminoácidos etc.

Como se usa aquí "antagonista del receptor de interleucina 1" (IL-1ra) se refiere a proteínas IL-1ra de mamífero de origen natural o endógenas, y a proteínas que tienen una secuencia de aminoácidos que es la misma que la de una proteína IL-1ra de mamífero de origen natural o endógena correspondiente (por ejemplo, proteínas recombinantes, proteínas sintéticas (es decir, producidas usando los métodos de síntesis de la química orgánica)). De acuerdo con esto, como se define aquí, el término incluye proteína madura, variantes polimórficas o alélicas, y otras isoformas de una IL-1ra (por ejemplo, producidas mediante empalme alternativo u otros procesos

celulares), y formas modificadas o no modificadas de las anteriores (por ejemplo, lipidada, glicosilada, PEGilada). La IL-1ra de origen natural o endógena incluye proteínas de tipo natural tal como IL-1ra madura, variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas que están presentes de forma natural en los mamíferos (por ejemplo, seres humanos, primates no humanos). Estas proteínas se pueden recuperar o aislar de una fuente que produzca IL-1ra de manera natural, por ejemplo. Estas proteínas y las proteínas IL-1ra que tienen la misma secuencia de aminoácidos que una IL-1ra de origen natural o endógena correspondiente, se denominan por el nombre del mamífero correspondiente. Por ejemplo, cuando el mamífero correspondiente es un ser humano, la proteína se denomina IL-1ra humana.

Las "variantes funcionales" de IL-1ra incluyen fragmentos funcionales, proteínas mutantes funcionales, y/o proteínas de fusión funcionales que pueden ser producidas usando métodos apropiados (por ejemplo, mutagénesis (tal como mutagénesis química, mutagénesis por radiación), técnicas de ADN recombinante). Una "variante funcional" antagoniza el receptor de tipo 1 de interleucina 1. Generalmente, los fragmentos o porciones de IL-1ra incluyen aquellos que tienen una deleción y/o adición (es decir, una o más deleciones y/o adiciones de aminoácidos) de un aminoácido (es decir, uno o más aminoácidos) con relación a la IL-1ra madura (tal como en el terminal N, terminal C o deleciones internas). Los fragmentos o porciones en los cuales solamente han sido eliminados

aminoácidos contiguos o en los cuales han sido eliminados aminoácidos no contiguos con relación a la IL-1ra madura también están considerados. Una variante funcional de IL-1ra humana puede tener al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la forma madura de 152 aminoácidos de IL-1ra humana y antagonizar al receptor de tipo 1 de interleucina 1. (Véase Eisenberg *et al*, Nature 343:341-346 1990). La variante puede contener uno o más aminoácidos adicionales (por ejemplo, contener 153 o 154 o más aminoácidos). Por ejemplo, la variante IL-1ra puede tener una secuencia de aminoácidos que esté constituida por un residuo de metionina en el terminal amino seguido por los residuos 26 hasta 177 de la SEQ ID NO:33. (KINERET® (Anakinra), Amgen).

Como se utiliza aquí, el término "aproximadamente" es opcional, pero preferiblemente su significado se interpreta como más o menos 20%, más preferiblemente más o menos 10%, aún más preferiblemente más o menos 5%, aún más preferiblemente más o menos 2%, mucho más preferiblemente más o menos 1%.

El término "análogo" como se usa aquí, con referencia a un polipéptido, significa un péptido modificado, en donde uno o más residuos de aminoácido del péptido han sido sustituidos por otros residuos de aminoácido y/o en donde uno o más residuos de

aminoácido han sido eliminados del péptido, y/o en donde uno o más residuos de aminoácido han sido eliminados del péptido y/o en donde uno o más residuos de aminoácido han sido añadidos al péptido. Esta adición o deleción de residuos de aminoácido puede tener lugar en el terminal N del péptido y/o en el terminal C del péptido o pueden estar dentro del péptido. Se usa un sistema simple para describir análogos de GLP-1: Por ejemplo [Arg^{34}] GLP-1 (7-37) Lys designa a un análogo de GLP-1 en donde la lisina de origen natural en la posición 34 ha sido sustituida con arginina, y un residuo de lisina ha sido añadido al terminal C (posición 38). Las fórmulas de análogos de péptido y derivados de ellos se dibujan usando abreviaturas estándar de una sola letra para los aminoácidos utilizados, de acuerdo con la nomenclatura IUPAC-IUB.

El término "péptido GLP-1" como se usa aquí, significa GLP-1 (7-37) (SEQ ID No. 158) o GLP-1 (7-36) (SEQ ID No. 159), un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1. Estos péptidos, análogos y derivados son agentes insulinotrópicos.

El término "agente insulinotrópico" como se usa aquí, significa un compuesto que es capaz de estimular, o de provocar la estimulación de, la síntesis o expresión de, o la actividad de la hormona insulina. Los ejemplos conocidos de agentes insulinotrópicos incluyen, sin limitarse a ellos, glucosa, GIP , GLP, exendina, y OXM.

El término "incretina" como se usa aquí, significa un tipo de

500

hormona gastrointestinal que ocasiona un aumento en la cantidad de insulina liberada cuando los niveles de glucosa son normales, o particularmente cuando son elevados. A manera de ejemplo, incluye GLP-1, GIP, y OXM.

El término "péptido exendina 4" como se usa aquí, significa exendina 4 (1-39), un análogo de exendina 4, un derivado de exendina 4 o un derivado de un análogo de exendina 4. En una modalidad, el péptido exendina 4 es un agente insulinotrópico. Estos péptidos, análogos y derivados son agentes insulinotrópicos.

El término "protegido para DPP-IV" como se usa aquí en referencia a un polipéptido, significa un polipéptido que ha sido modificado (por ejemplo, modificado químicamente) con el fin de hacer a dicho compuesto resistente a la peptidasa en plasma dipeptidil aminopeptidasa-4 (DPP-IV). Se sabe que la enzima DPP-IV en plasma está involucrada en la degradación de varias hormonas peptídicas, por ejemplo GLP-1, GLP-2, etc. Así, se está haciendo un esfuerzo considerable para desarrollar análogos y derivados de los polipéptidos susceptibles a hidrólisis mediada por DPP-IV con el fin de reducir la tasa y/o la extensión de la degradación por DPP-IV.

Como se usa aquí "saporina" se refiere a una familia de polipéptidos inactivadores de ribosoma de cadena simple, producidos por la planta *Saponaria officinalis.* (Stirpe, F., *et al.*, Biochem. J. 216:617-625 (1983), Bagga, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003).) Los polipéptidos saporina existen en varias formas que difieren en longitud y/o en secuencia de aminoácidos. (Véase por

ejemplo, Id. y Barthelemy, I. *et al.*, J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993)). La saporina 6 la forma más activa de saporina. (Bagga, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003).) Al menos cuatro isoformas de saporina 6 de origen natural en las cuales el aminoácido en la posición 48 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Asp o Glu, y el aminoácido en la posición 91 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Arg o Lys, han sido descritas. (Barthelemy, I. *et al.*, J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993).) Otras formas de saporina 6 incluyen polipéptidos en los cuales el aminoácido en la posición 99 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Ser o Leu, el aminoácido en la posición 134 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Gln o Lys, el aminoácido en la posición 147 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Ser o Leu, el aminoácido en la posición 149 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Ser o Phe, el aminoácido en la posición 162 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Asp o Asn, el aminoácido en la posición 177 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Ala o Val, el aminoácido en la posición 188 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Ile o Thr, el aminoácido en la posición 196 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Asn o Asp, el aminoácido en la posición 198 del polipéptido maduro (SEQ ID NO:65) es Glu o Asp, el aminoácido en la posición 231 del polipéptido maduro (SEQ ID NO: 65) es Asn o Ser, y polipéptidos en los cuales el aminoácido en la posición 233 del polipéptido maduro (SEQ ID NO: 65) es Lys o Arg. (Id.) Una secuencia de consenso que comprende estas isoformas y

variantes se presenta en la figura 14G (SEQ ID NO:67).

De acuerdo con esto, el término "saporina" incluye proteína precursora, polipéptido maduro, proteína originaria, variantes polimórficas o alélicas, y otras isoformas (por ejemplo, producidas mediante empalme alternativo u otros procesos celulares), y formas modificadas o no modificadas de los anteriores (por ejemplo, lipidada, glicosilada, PEGilada). La saporina de origen natural o endógena incluye proteínas de tipo natural, tal como la saporina madura (por ejemplo, saporina 6 madura), variantes polimórficas o alélicas y otras isoformas que se originan naturalmente en *Saponaria officinalis*. Estas proteínas se pueden recuperar o aislar de *Saponaria officinalis* usando cualesquiera métodos apropiados. Las "variantes funcionales" de saporina incluyen fragmentos funcionales, proteínas mutantes funcionales, y/o proteínas de fusión funcionales, las cuales se pueden producir usando métodos apropiados (por ejemplo, mutagénesis (tal como mutagénesis química, mutagénesis por radiación), técnicas de ADN recombinante). Generalmente, los fragmentos o porciones de saporina (por ejemplo, saporina 6) incluyen aquellos que tienen una deleción y/o adición (es decir, una o más deleciones y/o adiciones de aminoácidos) de un aminoácido (es decir, uno o más aminoácidos) con relación a la saporina madura (tal como terminal N, terminal C o deleciones internas). Los fragmentos o porciones en los cuales solamente han sido eliminados aminoácidos contiguos o en los cuales han sido eliminados aminoácidos no contiguos con relación a la saporina madura,

también están considerados. Se puede preparar una variedad de variantes activas de saporina. Por ejemplo, se ha preparado proteínas de fusión de saporina 6 que contienen extensiones del terminal amino y que demuestran que mantienen actividad inhibidora de ribosoma completa en análisis de lisados de reticulocitos de conejo. (Barthelemy, I. *et al.*, J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993)).

Las variantes de saporina 6 en las cuales un residuo del sitio activo, Tyr 72, Tyr 120, Glu 176, Arg 179 o Trp 208 (aminoácidos 72, 120, 176, 179 o 208 de la SEQ ID NO:65), fue reemplazado con alanina tuvieron actividad citotóxica reducida en análisis *in vitro*. (Bagga, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003).) De acuerdo con esto, si se desea preparar otras variantes funcionales de saporina, se debe evitar la mutación, sustitución, reemplazo, deleción o modificación de los residuos del sitio activo. Preferiblemente, una variante funcional de saporina que contiene menos aminoácidos que un polipéptido maduro de origen natural, incluye al menos el sitio activo. Por ejemplo, una variante de saporina 6 que contiene menos aminoácidos que la saporina 6 madura de origen natural, puede incluir los residuos del sitio activo de saporina 6 madura (Tyr 72, Tyr 120, Glu 176, Arg 179 y Trp 208 (aminoácidos 72, 120, 176, 179 y 208 de la SEQ ID NO:65)), y puede tener al menos aproximadamente 137 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 150 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 175 aminoácidos de longitud, al menos aproximadamente 200 aminoácidos de longitud, al menos

aproximadamente 225 aminoácidos de longitud o al menos aproximadamente 250 aminoácidos de longitud.

Una "variante funcional" de saporina tiene actividad inactivadora de ribosoma (por ejemplo, actividad de ARNr de N-glicosidasa) y/o actividad citotóxica. Esta actividad puede ser evaluada fácilmente usando cualquier método apropiado, tal como inhibición de síntesis de proteína usando el conocido análisis de lisado de reticulocito de conejo o cualquiera de los bien conocidos análisis de citotoxicidad que emplean líneas de células tumorales. (Véase por ejemplo, Bagga, S. *et al.*, J. Biol. Chem. 278:4813-4820 (2003) y Barthelemy, I. *et al.*, J. Biol. Chem. 268:6541-6548 (1993)).

En algunas modalidades, una variante funcional de saporina tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 91%, o al menos aproximadamente 92%, o al menos aproximadamente 93%, o al menos aproximadamente 94%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la saporina 6 madura (SEQ ID NO:65).

La invención se refiere a composiciones que contienen un fármaco y una fracción que se une a un polipéptido que contiene un sitio de enlace a antígeno que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. Como se describió aquí en detalle con respecto a composiciones que

contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, el fármaco y el polipéptido de enlace pueden estar conjugados de manera covalente o no covalente. En algunas modalidades, la composición es una proteína de fusión que contiene un fármaco de polipéptido y una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace a antígeno que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. En otras modalidades, la composición contiene un fármaco que está unido covalentemente o no covalentemente a una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace a antígeno que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*.

La invención se refiere a composiciones de fármacos que contienen un fármaco y una fracción que se une a un polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. Como se describió aquí en detalle con respecto a composiciones de fármacos que contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, el fármaco y la fracción enlazante de polipéptido pueden estar unidos uno al otro de manera covalente o no covalente. En algunas modalidades, la composición de fármacos es una proteína de fusión que contiene un fármaco de polipéptido y una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace a antígeno que tiene especificidad de

enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. En otras modalidades, la composición de fármacos contiene un fármaco que está unido covalentemente o no covalentemente a una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace a antígeno que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*.

Típicamente, un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* es un polipéptido que está presente de manera natural *in vivo* y el cual resiste a la degradación o a la eliminación mediante mecanismos endógenos que eliminan material no deseado del organismo (por ejemplo, humano). Por ejemplo, se puede seleccionar un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* de proteínas de la matriz extracelular, de proteínas que se encuentran en la sangre, de proteínas que se encuentran en la barrera sanguínea cerebral o en tejido neural, de proteínas localizadas en el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel o hueso, de proteínas de estrés, proteínas específicas para una enfermedad, o proteínas involucradas en el transporte de Fc.

Los polipéptidos apropiados que mejoran la vida media en suero *in vivo* incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de ligando-agente neurofarmacéutico específicas para el receptor de transferrina (véase la patente estadounidense número 5,977,307, cuyas enseñanzas están incorporadas aquí mediante referencia), receptor de células endoteliales capilares cerebrales, transferrina, receptor de transferrina (por ejemplo, receptor de transferrina

soluble), insulina, receptor del factor 1 de crecimiento similar a insulina (IGF-1), receptor del factor 2 de crecimiento similar a insulina (IGF-2), receptor de insulina, factor X de coagulación sanguínea, antitripsina α1 y HNF 1α. Los polipéptidos apropiados que mejoran la vida media en suero también incluyen glicoproteína alfa 1 (orosomucoide; AAG), antiquimiotripsina alfa 1 (ACT), microglobulina alfa 1 (proteína HC; AIM), antitrombina III (AT III), apolipoproteína A-1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B), ceruloplasmina (Cp), componente C3 del complemento (C3), componente C4 del complemento (C4), Inhibidor de la C1 esterasa (C1 INH), proteína C reactiva (CRP), ferritina (FER), hemopexina (HPX), lipoproteína (a) (Lp(a)), proteína enlazante de manosa (MBP), mioglobina (Myo), prealbúmina (transtiretina; PAL), proteína enlazante de retinol (RBP), y factor reumatoide (RF).

Las proteínas apropiadas de la matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágenos, lamininas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las principales proteínas de la matriz extracelular. Se conoce actualmente aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno, las cuales se encuentran en diferentes partes del cuerpo, por ejemplo colágeno tipo I (que constituye el 90% del colágeno del cuerpo) que se encuentra en hueso, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos o colágeno tipo II que se encuentra en cartílago, disco vertebral, notocordio, y humor vítreo del ojo.

Las proteínas apropiadas de la sangre incluyen, por ejemplo, proteínas plasmáticas (por ejemplo, fibrina, macroglobulina α2,

albúmina de suero, fibrinógeno (por ejemplo, fibrinógeno A, fibrinógeno B), proteína de suero amiloide A, haptoglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina y microglobulina α2), enzimas e inhibidores enzimáticos (por ejemplo, plasminógeno, lisozima, cistatina C, inhibidor de antitripsina alfa 1 y de tripsina pancreática), proteínas del sistema inmunitario, tales como proteínas inmunoglobinas (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, inmunoglobulinas de cadena ligera (kappa/lambda)), proteínas de transporte (por ejemplo, proteína enlazante de retinol, microglobulina α1), defensinas (por ejemplo, beta-defensina 1, defensina 1 de neutrófilo, defensina 2 de neutrófilo y defensina 3 de neutrófilo) y similares.

Las proteínas apropiadas que se encuentran en la barrera sanguínea cerebral o en el tejido neural incluyen, por ejemplo, receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato y similares.

Los polipéptidos apropiados que mejoran la vida media en suero *in vivo* también incluyen proteínas localizadas en el riñón (por ejemplo, policistina, colágeno tipo IV, transportador de anión orgánico K1, antígeno de Heymann), proteínas localizadas en el hígado (por ejemplo, deshidrogenasa alcohólica, G250), proteínas localizadas en el pulmón (por ejemplo, componente secretor, que enlaza a IgA), proteínas localizadas en el corazón (por ejemplo, HSP 27, que está asociada con la cardiomiopatía dilatada), proteínas localizadas en la piel (por ejemplo, queratina), proteínas específicas para hueso, tales como proteínas morfogénicas (BMP), que son un

subconjunto de la superfamilia de proteínas del factor de crecimiento β transformador que demuestran actividad osteogénica (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas para tumor (por ejemplo, antígeno trofoblasto, receptor de herceptina, receptor de estrógeno, catepsinas (por ejemplo, catepsina B, que se puede encontrar en el hígado y en el bazo)).

Las proteínas específicas apropiadas para una enfermedad incluyen, por ejemplo, antígenos expresados solamente en células T activadas, incluyendo LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando osteoprotegerina (OPGL; véase *Nature* 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia del receptor de FNT, expresado en células T y regulado hacia arriba específicamente en células productoras del virus tipo I de leucemia en células T humanas (HTLV-I); véase *Immunol.* 165 (1):263-70 (2000)). Las proteínas específicas apropiadas para una enfermedad también incluyen, por ejemplo, metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres), incluyendo CG6512 de *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH murina; y factores de crecimiento angiogénico, incluyendo factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-I), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular/ factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor de crecimiento de transformación α (TGF-α), factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), angiogenina, interleucina 3 (IL-3), interleucina 8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de

SP

crecimiento placentario (PlGF), factor de crecimiento derivado de plaquetas midquina BB (PDGF), y fractalquina.

Los polipéptidos apropiados que mejoran la vida media en suero *in vivo* también incluyen proteínas de estrés tales como las proteínas de choque de calor (HSP). Las HSP normalmente se encuentran intracelularmente. Cuando ellas se encuentran extracelularmente, esto es un indicador de que una célula ha muerto y ha derramado su contenido. Esta muerte celular no programada (necrosis) ocurre cuando como resultado de un trauma, enfermedad o daño, las HSP extracelulares disparan una respuesta del sistema inmunológico. El enlace a HSP extracelular puede dar como resultado la ubicación de las composiciones de la invención en un sitio de enfermedad.

Las proteínas apropiadas involucradas en el transporte de Fc incluyen, por ejemplo, el receptor Brambell (también conocido como FcRB). Este receptor de Fc tiene dos funciones, ambas potencialmente útiles para suministro. Las funciones son (1) transporte de IgG desde la madre hasta el niño a través de la placenta (2) protección de la IgG de la degradación, prolongando con ello su vida media en suero. Se piensa que el receptor recicla la IgG de los endosomas (Véase Holliger *et al*, Nat Biotechnol 15(7):632-6 (1997).)

Las composiciones de fármacos de la invención pueden contener cualquier fracción enlazante de polipéptido que contenga un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tenga

especificidad de enlace para un polipéptido que mejore la vida media en suero *in vivo*. Preferiblemente, la fracción enlazante de polipéptido contiene al menos 31, al menos aproximadamente 40, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 60, al menos aproximadamente 70, al menos aproximadamente 80 aminoácidos, al menos aproximadamente 90 aminoácidos, al menos aproximadamente 100 aminoácidos o al menos aproximadamente 110 aminoácidos como una entidad molecular separada. Preferiblemente, la fracción enlazante de polipéptido enlaza un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* con una KD de al menos aproximadamente 5 mM KD ($KD=K_{off}$ (kd)/K_{on} (ka)). En algunas modalidades, la fracción enlazante de polipéptido enlaza un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* con una KD de aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 500 nM, o aproximadamente 500 nM hasta aproximadamente 5 mM, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando un instrumento BIACORE). En modalidades particulares, la fracción enlazante de polipéptido enlaza un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* con una KD de aproximadamente 50 nM, o aproximadamente 70 nM, o aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 150 nM o aproximadamente 200 nM.

Preferiblemente, la fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que

mejora la vida media en suero *in vivo,* no es un polipéptido o péptido procariótico o bacteriano. Preferiblemente, la fracción enlazante de polipéptido es un polipéptido o péptido eucariótico, de mamífero o humano.

En ciertas modalidades, la fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* es un dominio de proteína plegada. En otras modalidades, la fracción enlazante de polipéptido tiene un peso molecular de al menos aproximadamente 4 KDa, al menos aproximadamente 4.5 KDa, al menos aproximadamente 5 KDa, al menos aproximadamente 5.5 KDa, al menos aproximadamente 6 KDa, al menos aproximadamente 6.5 KDa, al menos aproximadamente 7 KDa, al menos aproximadamente 7.5 KDa o al menos aproximadamente 8 KDa como una entidad molecular separada.

Las porciones enlazantes de polipéptido apropiadas que contienen un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo,* se pueden identificar usando cualquier método apropiado, tal como por exploración de polipéptidos presentes de manera natural o presentes de manera no natural en un análisis de adhesión apropiado. Como se describe aquí, las porciones enlazantes de polipéptido preferidas que tienen un sitio de enlace a antígeno para un polipéptido que mejora la vida media en

suero *in vivo,* son fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos que tienen especificidad de enlace para albúmina de suero. Sin embargo, en la invención se puede utilizar fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos que tienen especificidad de enlace para otros polipéptidos que mejoran la vida media en suero *in vivo*.

Si se desea, una o más de las regiones determinantes de complementariedad (CDR) de un anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno de él que enlazan un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo,* pueden ser formateadas en una estructura que no sea de inmunoglobulina, que mantenga la especificidad de enlace del anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno. Las composiciones de fármacos de la invención pueden contener una fracción como esta, que no se enlaza a inmunoglobulina. Estas fracciones que no se enlazan a inmunoglobulina se pueden preparar usando cualquier método apropiado, por ejemplo, se ha utilizado receptores bacterianos naturales tales como SpA, como armazones proteínicos para el injerto de CDR para generar porciones enlazantes de polipéptido que se fijen específicamente a un epítopo. Los detalles de este procedimiento están descritos en la solicitud de patente estadounidense No. 5,831,012, cuyas enseñanzas están incorporadas aquí mediante referencia. Otros armazones proteínicos apropiados incluyen los que se basan en fibronectina y proteínas de afinidad (*affibodies*). Los detalles de los procedimientos apropiados están descritos en WO 98/58965. Otros armazones proteínicos apropiados incluyen lipocalina y CTLA4, tal como se describe en van

den Beuken *et al*, *J. Mol. Biol.* 310:591-601 (2001), y armazones proteínicos tales como los que están descritos en WO 00/69907 (Medical Research Council), los cuales se basan, por ejemplo, en la estructura de anillo de GroEL bacteriano o en otros polipéptidos acompañantes.

En algunas modalidades, la composición de fármacos de la invención contiene una fracción que no se enlaza a inmunoglobulina, que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, en donde la fracción que no se enlaza a inmunoglobulina contiene uno, dos o tres de los CDR de un V_H, V_κ o V_{HH} descritos aquí y un armazón proteínico apropiado. En ciertas modalidades, la fracción que no se enlaza a inmunoglobulina contiene CDR3 pero no CDR1 o CDR2, de un VH, V_κ o V_{HH} descrito aquí y un armazón proteínico apropiado. En otras modalidades, la fracción que no se enlaza a inmunoglobulina contiene CDR1 y CDR2, pero no CDR3 de un V_H, V_κ o V_{HH} descrito aquí y un armazón proteínico apropiado. En otras modalidades, la fracción que no se enlaza a inmunoglobulina contiene CDR1, CDR2 y CDR3 de un V_H, V_κ o V_{HH} descrito aquí y un armazón proteínico apropiado. En otras modalidades, la composición de fármacos contiene solamente CDR3 de un V_H, V_κ o V_{HH} descrito aquí y un fármaco.

Las composiciones de fármacos de la invención se pueden preparar usando métodos apropiados, tal como los métodos descritos aquí para la preparación de fusiones de fármaco, conjugado de fármaco y conjugado de fármaco no covalente. Adicionalmente, las

composiciones de fármacos de la invención tienen las ventajas y utilidades que se describen en detalle aquí con respecto a fusiones de fármaco, conjugado de fármaco y conjugado de fármaco no covalente.

La invención proporciona composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, aumento de la vida media en suero) y otras ventajas en comparación con el fármaco solo (fármaco no conjugado, fármaco no fusionado). Los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero y uno o más fármacos deseados.

Como se describe aquí, las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) de la invención pueden tener una vida media en suero grandemente prolongada *in vivo* y/o una AUC aumentada, en comparación con el fármaco solo. Además, la actividad del fármaco generalmente no se altera sustancialmente en la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco). Sin embargo, es aceptable algún cambio en la actividad de una composición de fármacos en comparación con el fármaco solo y generalmente se compensa por las propiedades farmacocinéticas

mejoradas de la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco). Por ejemplo, las composiciones de fármaco (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) pueden enlazar el fármaco objetivo con mejor afinidad que el fármaco solo, pero tienen una eficacia casi equivalente o superior en comparación con el fármaco solo debido a las propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, vida media en suero prolongada *in vivo*, AUC mayor) de la composición de fármaco. Además, se puede administrar cantidades menores de composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco) para lograr el efecto terapéutico o diagnóstico deseado. Preferiblemente la actividad de la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) difiere de la del fármaco solo en un factor de no más de aproximadamente 100, o no más de aproximadamente 50, o no más de aproximadamente 10, o no más de aproximadamente 5, o no más de aproximadamente 4, o no más de aproximadamente 3, o no más de aproximadamente 2. Por ejemplo, un fármaco puede tener una KD, Ki o dosis neutralizadora 50 (ND50) de 1 nM, y una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) puede tener una KD, Ki o ND50 de aproximadamente 2 nM, o aproximadamente 3 nM, o aproximadamente 4 nM, o aproximadamente 5 nM, o aproximadamente 10 nM.

Preferiblemente, la actividad de la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) no se reduce sustancialmente comparada con la actividad del fármaco. En ciertas modalidades, la actividad de la composición de fármacos es reducida con relación a la actividad de fármaco, en no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, o no está sustancialmente cambiada. Como indicación alternativa, la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) mantiene al menos aproximadamente 90%, al menos aproximadamente 91%, al menos aproximadamente 92%, al menos aproximadamente 93%, al menos aproximadamente 94%, al menos aproximadamente 95%, al menos aproximadamente 96%, al menos aproximadamente 97%, al menos aproximadamente 98%, al menos aproximadamente 99% de la actividad del fármaco, o sustancialmente la misma actividad que el fármaco. Preferiblemente, la actividad de las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) y los fármacos, se determinan y/o se comparan sobre una "base de fármaco."

Tal como se describe y se muestra aquí, las composiciones de

fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de la invención pueden tener mayor actividad (por ejemplo, actividad *in vivo*) que la del fármaco solo. Por ejemplo, como se muestra en el ejemplo 6, el DOM7m-16/IL-1ra fue más efectivo para tratar artritis en un modelo de ratón que la IL-1ra cuando estos agentes fueron administrados en la misma dosis por peso (10 mg/Kg o 1 mg/Kg). DOM7m-16/IL-1ra fueron más efectivos a pesar de que su peso molecular es aproximadamente dos veces el peso molecular de IL-1ra. Así, los ratones que recibieron DOM7m-16/IL-1ra recibieron aproximadamente la mitad de la IL-1ra (como una fracción en DOM7m-16/IL 1-ra) que los ratones que recibieron IL-1ra.

En ciertas modalidades, la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tiene mayor actividad (por ejemplo, actividad *in vivo*) que el fármaco, por ejemplo, la composición de fármacos puede tener al menos aproximadamente 100%, al menos aproximadamente 150%, al menos aproximadamente 200%, al menos aproximadamente 250%, al menos aproximadamente 300%, al menos aproximadamente 350%, al menos aproximadamente 400%, al menos aproximadamente 450%, o al menos aproximadamente 500% de la actividad de fármaco.

Preferiblemente, la actividad de las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) y los fármacos se determina y/o se

compara sobre una "base de fármaco." La actividad de las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) y fármacos se puede determinar usando un sistema *in vitro* o *in vivo* apropiado. En ciertas modalidades, una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tiene mayor actividad que el fármaco que contiene, según se determina *in vivo*. En otras modalidades, una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tiene mayor actividad que el fármaco que contiene, según se determina *in vitro*.

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que contienen un anticuerpo de dominio (dAb) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero proporcionan ventajas adicionales. Los anticuerpos de dominio son muy estables, son pequeños con relación a los anticuerpos y otros fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos, pueden producirse en altos rendimientos mediante expresión en *E. coli* o levadura (por ejemplo, *Pichia pastoris*), y como se describe aquí, los fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos que enlazan a albúmina de suero pueden seleccionarse fácilmente de bibliotecas de origen humano o de cualquier especie deseada. De acuerdo con esto, las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que contienen un dAb

que se une a albúmina de suero se pueden producir más fácilmente que las sustancias terapéuticas que generalmente se producen en células de mamífero (por ejemplo, anticuerpos humanos, humanizados o quiméricos) y se puede utilizar dAb que no son inmunógenos (por ejemplo, se puede utilizar un dAb humano para una fusión de fármaco o conjugado de fármaco para tratar o diagnosticar una enfermedad en seres humanos.)

La inmunogenicidad de un fármaco puede ser reducida cuando el fármaco es parte de una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) que contiene una fracción enlazante de polipéptido que se une a albúmina de suero (por ejemplo, un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero). De acuerdo con esto, un fármaco puede ser menos inmunógeno (que el fármaco solo) o puede ser sustancialmente no inmunógeno en el contexto de una composición de fármacos que contiene una fracción enlazante de polipéptido que se une a albúmina de suero (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco). Así, estas composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusiones de fármaco) se pueden administrar a un sujeto repetidamente en el transcurso del tiempo con pérdida mínima de eficacia debido a la elaboración de anticuerpos anti-fármaco por el sistema inmunitario del sujeto.

Adicionalmente, las composiciones de fármacos (por ejemplo,

conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusiones de fármaco) descritas aquí, pueden tener un perfil de seguridad mejorado y menores efectos secundarios que el fármaco solo. Por ejemplo, como resultado de la actividad enlazante a la albúmina de suero del fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, las fusiones de fármaco y conjugados (conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente) se ha mejorado el tiempo de residencia en la circulación vascular. Adicionalmente, los conjugados y fusiones de fármaco son sustancialmente incapaces de cruzar la barrera sanguínea cerebral y acumularse en el sistema nervioso central después de su administración (por ejemplo, administración intravascular). De acuerdo con esto, los conjugados (conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente) y fusiones de fármaco que contienen un fármaco que tiene toxicidad neurológica o efectos psicotrópicos indeseables, se puede administrar con mayor seguridad y con efectos secundarios reducidos en comparación con el fármaco solo. De manera similar, los conjugados (conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente) y fusiones de fármaco pueden tener toxicidad reducida hacia órganos en particular (por ejemplo, riñón o hígado) que el fármaco solo. Los conjugados y fusiones de fármaco descrito aquí también se pueden utilizar para secuestrar un fármaco o un objetivo que se une a un fármaco (por ejemplo, una toxina) en la circulación vascular, disminuyendo con ello los efectos del fármaco u objetivo sobre los tejidos (por ejemplo,

inhibir los efectos de una toxina).

Los métodos apropiados para el análisis farmacocinético y determinación de vida media *in vivo* son bien conocidos en la técnica. Estos métodos están descritos, por ejemplo, en Kenneth, A *et al*: *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists*, y en Peters *et al*, *Pharmacokinetc analysis: A Practical Approach* (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi y D Perron, publicado por Marcel Dekker, 2da. edición revisada (1982), el cual describe parámetros farmacocinéticos tales como vidas medias t alfa y t beta (t1/2 alfa, t1/2 beta) y área bajo la curva (AUC).

Las vidas medias (t1/2 alfa y t1/2 beta) y el AUC se pueden determinar a partir de una curva de concentración de conjugado o fusión en suero contra tiempo. El paquete de análisis WinNonlin (disponible en Pharsight Corp., Mountain View, CA 94040, USA) se puede utilizar, por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa), la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) está experimentando principalmente distribución en el paciente, con alguna eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) ha sido distribuida y la concentración en suero está disminuyendo a medida que la composición de fármacos es eliminada del paciente. La vida media alfa es la vida media de la primera fase,

y la vida media beta es la vida media de la segunda fase. Así, la presente invención proporciona una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) o una composición que contiene una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de acuerdo con la invención que tiene una vida media en el rango de 15 minutos o más. En una modalidad, el límite inferior del intervalo es 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) o composición de acuerdo con la invención tendrá una vida media $t\alpha$ en el rango de hasta 12 horas, inclusive. En una modalidad, el límite superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 o 5 horas. Un ejemplo de un rango apropiado es desde 1 hasta 6 horas, 2 hasta 5 horas o 3 hasta 4 horas.

Ventajosamente, la presente invención proporciona composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que tienen una vida media $t\beta$ en el rango de 2.5 horas o más, en una modalidad, el límite inferior del intervalo es 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 8 horas, 9 horas, 10 horas, 11 horas, o 12 horas. En algunas modalidades, las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no

covalentes, fusiones de fármaco) tienen una vida media tβ en el rango de hasta 21 días, inclusive. En una modalidad, el límite superior del intervalo es de 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días o 20 días. En modalidades particulares, una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de acuerdo con la invención tendrá una vida media tβ en el rango desde 12 hasta 60 horas. En una modalidad adicional, ésta estará en el intervalo de 12 hasta 48 horas. En una modalidad todavía adicional, ésta estará en el intervalo de 12 hasta 26 horas.

Además, o alternativamente a los criterios anteriores, la presente invención proporciona composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalente, fusiones de fármaco) con un valor de AUC (área bajo la curva) en el rango de 0.01 mg.min/mL o más, o 1 mg.min/mL o más. En una modalidad, el límite inferior del intervalo es 0.01, 0.1, 1, 5, 10, 15, 20, 30, 100, 200 o 300 mg.min/mL. En modalidades particulares, la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tiene un AUC en el rango de hasta 600 mg.min/mL. En una modalidad, el límite superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 o 50 mg.min/mL. En otras modalidades, la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) tiene un AUC en el rango seleccionado del grupo que consiste en los siguientes: 15 hasta 150

mg.min/mL, 15 hasta 100 mg.min/mL, 15 hasta 75 mg.min/mL, 15 hasta 50 mg.min/mL, 0.01 hasta 50 mg.min/mL, 0.1 hasta 50 mg.min/mL, 1 hasta 50 mg.min/mL, 5 hasta 50 mg.min/mL, y 10 hasta 50 mg.min/mL.

La invención se refiere a composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que contienen un fármaco y una fracción que se une a un polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. En modalidades preferidas de composiciones de fármacos, la fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*, tiene especificidad de enlace para albúmina de suero.

En algunas modalidades, la composición de fármacos contiene un fármaco que está unido covalentemente a una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*. En estas modalidades, el fármaco puede estar unido covalentemente al dominio de enlace de polipéptido en cualquier posición apropiada, tal como el terminal amino, el terminal carboxilo o a través de cadenas laterales de aminoácidos apropiadas (por ejemplo, el grupo ϵ de lisina o el grupo tiol de cisteína).

En otras modalidades, la composición de fármacos contiene un fármaco que está unido de manera no covalente a una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*, en estas modalidades, el fármaco puede estar unido no covalentemente al fragmento de enlace a antígeno directamente (por ejemplo, a través de interacción electrostática, interacción hidrofóbica) o indirectamente (por ejemplo, a través de unión no covalente de compañeros de enlace complementarios (por ejemplo, biotina y avidina), en donde un compañero está unido covalentemente al fármaco y el compañero de enlace complementario está unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno). Cuando se emplea compañeros de enlace complementarios, uno de los compañeros de enlace puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de una fracción enlazante apropiada, y el compañero de enlace complementario puede estar unido covalentemente al dominio de enlace de polipéptido directamente o a través de una fracción enlazante apropiada.

En otras modalidades, la composición de fármacos es una proteína de fusión que contiene un una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* y un fármaco

de polipéptido. Las proteínas de fusión contienen una cadena continua de polipéptido, dicha cadena que contiene una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* como una primera fracción de enlace de polipéptido que contiene un sitio de enlace, y un fármaco de polipéptido como una segunda fracción, los cuales están presentes como partes discretas (porciones) de la cadena de polipéptido. La primera y segunda fracciones pueden estar unidas directamente una a la otra a través de una unión peptídica, o enlazadas a través de un aminoácido, o péptido o enlazante polipéptido apropiado. Otras fracciones (por ejemplo, una tercera o cuarta) y/o secuencias enlazantes, pueden estar presentes según sea apropiado. La primera fracción puede estar en una ubicación en el terminal N, ubicación en el terminal C o interna con relación a la segunda fracción (es decir, el fármaco polipéptido). En ciertas modalidades, la proteína de fusión contiene una o más fracciones enlazantes de polipéptido que contienen un sitio de enlace que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* y una o más fracciones del fármaco polipéptido. En estas modalidades, la proteína de fusión puede contener desde una hasta aproximadamente diez (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 o 10) fracciones del fármaco polipéptido que pueden ser las mismas o diferentes, y desde una hasta aproximadamente veinte (por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9,

10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18 19 o 20) fracciones enlazantes de polipéptido que contienen un sitio de enlace que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo,* que pueden ser las mismas o diferentes.

Las fracciones enlazantes de polipéptido que contienen un sitio de enlace que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo* y las fracciones del fármaco polipéptido pueden estar presentes en cualquier ubicación deseada. Por ejemplo, avanzando desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo, las fracciones pueden estar presentes en el siguiente orden: una o más fracciones enlazantes de polipéptido, uno o más fracciones del fármaco polipéptido, uno o más fracciones enlazantes de polipéptido. En otro ejemplo, avanzando desde el terminal amino hasta el terminal carboxilo, las fracciones pueden estar presentes en el siguiente orden: una o más fracciones enlazantes de polipéptido, una o más fracciones del fármaco polipéptido, una o más fracciones enlazantes de polipéptido, una o más fracciones del fármaco polipéptido, una o más fracciones enlazantes de polipéptido. Como se describe aquí, las fracciones enlazantes de polipéptido y las fracciones del fármaco polipéptido pueden estar unidas directamente una a la otra a través de una unión peptídica, o enlazadas a través de un aminoácido, o enlazante péptido o polipéptido apropiado.

En ciertas modalidades, la proteína de fusión es una cadena continua de polipéptido que tiene la fórmula (terminal amino a terminal carboxi):

529

a-(P)n2-b-(X)n1-c-(Q)n3-d o a-(Q)n3-b-(X)n1-c-(P)n2-d

en donde X es un fármaco de polipéptido;

P y Q son cada uno independientemente una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*;

a, b, c y d están ausentes cada uno independientemente o son desde uno hasta aproximadamente 100 residuos de aminoácido;

n1, n2 y n3 representan la cantidad de fracciones X, P o Q presentes, respectivamente;

n1 es desde uno hasta aproximadamente 10;

n2 es desde cero hasta aproximadamente 10; y

n3 es desde cero hasta aproximadamente 10,

con la condición de que tanto n2 como n3 no sean cero; y

con la condición de que cuando n1 y n2 son ambos uno y n3 es cero, X no contenga una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo.

En algunas modalidades, n2 es uno, dos, tres, cuatro cinco o seis, y n3 es cero. En otras modalidades, n3 es uno, dos, tres, cuatro cinco o seis, y n2 es cero. En otras modalidades, n1, n2 y n3 son uno cada uno.

En ciertas modalidades, X no contiene una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo.

En modalidades preferidas, P y Q son cada uno independientemente una fracción enlazante de polipéptido que tiene

especificidad de enlace para albúmina de suero.

En modalidades particularmente preferidas, la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) contiene una fracción enlazante de polipéptido que contiene un sitio de enlace (por ejemplo, un sitio de enlace a antígeno) que tiene especificidad de enlace para un polipéptido que mejora la vida media en suero *in vivo*, en donde el dominio de enlace de polipéptido es un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero.

Fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero

Los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco de la invención, contienen un (es decir, uno o más) fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero. El fragmento de enlace a antígeno puede tener especificidad de enlace para albúmina de suero de un animal al cual se le administrará el conjugado de fármaco o fusión de fármaco . Preferiblemente, el fragmento de enlace a antígeno tiene especificidad de enlace para albúmina de suero humana. Sin embargo, están contempladas aplicaciones veterinarias y el fragmento de enlace a antígeno puede tener especificidad de enlace para albúmina de suero de un animal deseado, por ejemplo albúmina de suero de perro, gato, caballo, vaca, pollo, oveja, cerdo, ciervo, visón, y similares. En algunas modalidades el fragmento de enlace a

antígeno tiene especificidad de enlace para albúmina de suero de más de una especie. Por ejemplo, como se describe aquí, se ha producido dAb humanos que tienen especificidad de enlace para albúmina de suero de rata y albúmina de suero de ratón, y un dAb que tiene especificidad de enlace para rata, ratón y albúmina de suero humana. (Tabla 1 y figura 7). Estos dAb proporcionan la ventaja de permitir estudios pre clínicos y clínicos utilizando el mismo conjugado de fármaco o fusión de fármaco y obvia la necesidad de realizar estudios pre clínicos con un sucedáneo de fusión de fármaco o conjugado de fármaco apropiado.

Los fragmentos de enlace a antígenos apropiados para su uso en la invención, incluyen, por ejemplo, fragmentos Fab, fragmentos Fab', fragmentos $F(ab')_2$, fragmentos Fv (incluyendo Fv de cadena simple) Fv (scFv) y Fv enlazado a disulfuro), un dominio variable simple, y dAb (V_H, V_L). Estos fragmentos de enlace a antígeno se pueden producir usando cualquier método apropiado, tal como proteólisis de un anticuerpo usando pepsina, papaína u otra proteasa que tenga la especificidad de escisión requerida, o utilizando técnicas recombinantes. Por ejemplo, se puede preparar fragmentos Fv digiriendo un anticuerpo con una proteasa apropiada o usando tecnología de ADN recombinante. Por ejemplo, se puede preparar un ácido nucleico que codifique una región variable de cadena ligera y una región variable de cadena pesada que estén conectadas por un enlazante péptido apropiado, tal como una cadena desde dos hasta aproximadamente veinte residuos glicilo. El ácido nucleico puede ser

introducido en un huésped apropiado (por ejemplo, *E. coli*) usando cualquier técnica apropiada (por ejemplo, transfección, transformación, infección), y el huésped puede ser mantenido bajo condiciones apropiadas para la expresión de un fragmento Fv de una sola cadena. Una variedad de fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos se pueden preparar usando genes de anticuerpo en los cuales uno o más codones de parada han sido introducidos corriente arriba del sitio de parada natural. Por ejemplo, una construcción de expresión que codifica una porción $F(ab')_2$ de una cadena pesada de inmunoglobulina puede diseñarse introduciendo un codón de parada de traducción en el extremo 3' de la secuencia que codifica la región bisagra de la cadena pesada.

Los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco de la invención, pueden contener las cadenas individuales pesadas y ligeras de anticuerpos que enlazan a albúmina de suero o porciones de las cadenas individuales que enlazan a albúmina de suero (por ejemplo, un solo V_H, V_k o V_x).

Los anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno de ellos que enlazan a una albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana) deseada, pueden ser seleccionados de una colección apropiada de anticuerpos naturales o artificiales o cultivados contra un inmunógeno apropiado en un huésped apropiado. Por ejemplo, los anticuerpos se pueden producir inmunizando un huésped apropiado (por ejemplo, ratón, anticuerpo humano-ratón transgénico, rata, conejo, pollo, cabra, primate no humano (por ejemplo, mono)) con

albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana aislada o purificada) o un péptido de albúmina de suero (por ejemplo, un péptido que contiene al menos aproximadamente 8, 9, 10, 11, 12, 15, 20, 25, 30, 33, 35, 37, o 40 residuos de aminoácido). Los anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno que enlaza a albúmina de suero también pueden seleccionarse de una biblioteca de anticuerpos recombinantes o fragmentos de enlace a antígeno, tal como una biblioteca de visualización de fagos. Estas bibliotecas pueden contener anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos que contienen secuencias de aminoácidos naturales o artificiales. Por ejemplo, la biblioteca puede contener fragmentos Fab que contengan CDR artificial (por ejemplo, secuencias de aminoácidos aleatorias) y regiones de entramado humanas. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 6,300,064 (Knappik, *et al.*).) En otros ejemplos, la biblioteca contiene fragmentos scFv o dAb (V_H solo, V_κ solo o V_λ solo) con diversidad de secuencia en uno o más CDR. (Véase por ejemplo, WO 99/20749 (Tomlinson y Winter), WO 03/002609 A2 (Winter *et al.*), WO 2004/003019A2 (Winter *et al.*)).

Los anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno de ellos apropiados que enlazan a albúmina de suero incluyen, por ejemplo, anticuerpos humanos y fragmentos de enlace a antígeno de ellos, anticuerpos humanizados y fragmentos de enlace a antígeno de ellos, anticuerpos quiméricos y fragmentos de enlace a antígeno de ellos, anticuerpos de roedores (por ejemplo, ratón, rata) y

fragmentos de enlace a antígenos de ellos, y anticuerpos de camélido y fragmentos de enlace a antígeno de ellos. En ciertas modalidades, los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalente y fusiones de fármaco contienen un V_{HH} de camélido que se une a albúmina de suero. Los V_{HH} de camélido son polipéptidos de un dominio variable simple de inmunoglobulina que provienen de anticuerpos de cadena pesada que están desprovistos de cadenas ligeras de manera natural. Estos anticuerpos aparecen en las especies de camélidos incluyendo camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco. Las moléculas de V_{HH} son aproximadamente diez veces más pequeñas que las moléculas de IgG, y como polipéptidos solos, son muy estables y resistentes a condiciones de pH y temperatura extremas. Los V_{HH} de camélidos apropiados, que enlazan a albúmina de suero incluyen los que están descritos en WO 2004/041862 (Ablynx N. V.) y aquí (figura 15 y SEQ ID NOS:77-88). En ciertas modalidades, el V_{HH} de camélido se enlaza a albúmina de suero humana y contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 72, SEQ ID NO:73, SEQ ID NO:74, SEQ ID NO:75, SEQ ID NO:76, SEQ ID NO:77, SEQ ID NO:78, SEQ ID NO:79, SEQ ID NO:80, SEQ ID NO:81, SEQ ID NO:82, SEQ ID NO:83, SEQ ID

NO:84, SEQ ID NO:85, SEQ ID NO:86, SEQ ID NO:87, o SEQ ID NO:88. La identidad de secuencia de aminoácidos se determina preferiblemente usando un algoritmo para alineación de secuencia apropiado y parámetros por defecto, tal como BLAST P (Karlin y Altschul, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA 57(6):2264-2268 (1990)).

La preparación del antígeno inmunizador, y la producción del anticuerpo policlonal y monoclonal, se puede realizar usando cualquier técnica apropiada. Una variedad de métodos se ha descrito. (Véase por ejemplo, Kohler *et al*, *Nature*, 256: 495-497 (1975) y *Eur. J. Immunol.* 6: 511-519 (1976); Milstein *et al*, *Nature* 266: 550-552 (1977); Koprowski *et al*, patente estadounidense número 4,172,124; Harlow, E. y D. Lane, 1988, *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory: Cold Spring Harbor, NY); *Current Protocols In Molecular Biology,* Vol. 2 (Suplemento 27, Verano '94), Ausubel, F.M. *et al*, Eds., (John Wiley & Sons: New York, NY), Capítulo 11, (1991).)

Generalmente, cuando se desea un anticuerpo monoclonal, se produce un hibridoma fusionando células apropiadas de una línea celular inmortal (por ejemplo, una línea celular mieloma tal como SP2/0, P3X63Ag8.653 o un heteromieloma) con células productoras de anticuerpos. Las células productoras de anticuerpos se pueden obtener de la sangre periférica o, preferiblemente del bazo o de los nodos linfáticos, de seres humanos, animales transgénicos con anticuerpos humanos u otros animales apropiados inmunizados con el antígeno de interés. Las células que producen anticuerpos de

origen humano (por ejemplo, un anticuerpo humano) se pueden producir usando métodos apropiados, por ejemplo, fusión de una célula productora de anticuerpos humana y un heteromieloma o trioma, o inmortalización de una célula B humana activada por medio de infección con el virus de Epstein Barr. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 6,197,582 (Trakht); Niedbala *et al*, *Hybridoma*, 17:299-304 (1998); Zanella *et al*, *J Immunol Methods*, 156:205-215 (1992); Gustafsson *et al*, *Hum Antibodies Hybridomas*, 2:26-32 (1991).) Las células productoras de anticuerpos fusionadas o inmortalizadas (hibridomas) se pueden aislar usando condiciones de cultivo selectivas, y se pueden clonar limitando la dilución. Las células que producen anticuerpos con la especificidad deseada se pueden identificar usando un análisis apropiado (por ejemplo, ELISA).

Los anticuerpos también se pueden preparar directamente (por ejemplo, sintetizados o clonados) a partir de una célula productora de anticuerpo específico para antígeno aislada (por ejemplo, una célula de sangre periférica o, preferiblemente del bazo o de los nodos linfáticos, determinada para producir un anticuerpo con especificidad deseada), de seres humanos, animales transgénicos con anticuerpos humanos u otros animales apropiados inmunizados con el antígeno de interés (véase por ejemplo, la patente estadounidense número 5,627,052 (Schrader)).

Cuando el conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente o fusión de fármaco es para su administración a un ser

humano, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno de él que se une a albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana) puede ser un anticuerpo humano, humanizado o quimérico o un fragmento de enlace a antígeno de tal anticuerpo. Estos tipos de anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno son menos inmunógenos o no son inmunógenos en los seres humanos y proporcionan ventajas bien conocidas. Por ejemplo, los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes o fusiones de fármaco que contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo humano, humanizado o quimérico se pueden administrar repetidamente a un ser humano con menor pérdida, o ninguna, de eficacia (en comparación con otros anticuerpos totalmente inmunógenos) debido a la elaboración de anticuerpos humanos que enlazan al conjugado de fármaco o fusión de fármaco . Cuando el conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente o fusión de fármaco está dirigido a su administración veterinaria, se puede utilizar anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno análogos. Por ejemplo, las CDR de un anticuerpo humano o murino puede injertarse en regiones de entramado de un animal deseado, tal como un caballo o vaca.

Los anticuerpos humanos and ácidos nucleicos que codifican los mismos, se pueden obtener, por ejemplo, de un ser humano o de animales transgénicos con anticuerpos humanos. Los animales transgénicos con anticuerpos humanos (por ejemplo, ratones) son animales que son capaces de producir un repertorio de anticuerpos

humanos, tal como XENORATÓN (Abgenix, Fremont, CA), HUMAB-RATÓN, KIRIN TC RATÓN o KM-RATÓN (MEDAREX, Princeton, NJ). Generalmente, el genoma de animales transgénicos con anticuerpos humanos ha sido alterado para incluir un transgen que contiene ADN de un locus de inmunoglobulina humana que puede sufrir reacomodo funcional. Un locus de inmunoglobulina endógena en un animal transgénico con anticuerpos humanos puede ser interrumpido o borrado para eliminar la capacidad del animal para producir anticuerpos codificados por un gen endógeno. Los métodos apropiados para producir animales transgénicos con anticuerpos humanos son bien conocidos en la técnica. (Véase por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5,939,598 y 6,075,181 (Kucherlapati *et al*), patentes estadounidenses números 5,569,825, 5,545,806, 5,625,126, 5,633,425, 5,661,016, y 5,789,650 (Lonberg *et al*), Jakobovits *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.* USA, 90: 2551-2555 (1993), Jakobovits *et al*, *Nature*, 362: 255-258 (1993), Jakobovits *et al* WO 98/50433, Jakobovits *et al* WO 98/24893, Lonberg *et al* WO 98/24884, Lonberg *et al* WO 97/13852, Lonberg *et al*. WO 94/25585, Lonberg *et al*. EP 0 814 259 A2, Lonberg *et al*. GB 2 272 440 A, Lonberg *et al*, *Nature* 368:856-859 (1994), Lonberg *et al*., *Int Rev Immunol* 13(1):65- 93 (1995), Kucherlapati *et al* WO 96/34096, Kucherlapati *et al* EP 0 463 151 BI, Kucherlapati *et al*. EP 0 710 719 AI, Surani *et al*. Patente estadounidense número 5,545,807, Bruggemann *et al*. WO 90/04036, Bruggemann *et al* EP 0438 474 BI, Taylor *et al*, *Int. Immunol*. 6(4)579-591 (1994), Taylor *et al*, *Nucleic*

acids Research 20(23):6287-6295 (1992), Green *et al*, Nature Genetics 7:13-21 (1994), Mendez *et al*, *Nature Genetics* 15:146- 156 (1997), Tuaillon *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA* 90(8):3720-3724 (1993) y Fishwild *et al*, *Nat Biotechnol* 14(7):845-851 (1996), las enseñanzas de cada uno de ellos están incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad).

Los animales transgénicos con anticuerpos humanos se pueden inmunizar con un antígeno apropiado (por ejemplo, albúmina de suero humana), y las células productoras de anticuerpo se pueden aislar y fusionar para formar hibridomas usando métodos convencionales. Los hibridomas que producen anticuerpos humanos que tienen las características deseadas (por ejemplo, especificidad, afinidad) se pueden identificar usando cualquier análisis apropiado (por ejemplo, ELISA) y si se desea, seleccionarse y subclonarse utilizando técnicas de cultivo apropiadas.

Los anticuerpos humanizados y otros anticuerpos injertados en CDR se pueden preparar usando cualquier método apropiado. Las CDR de un anticuerpo injertado en CDR pueden provenir de un anticuerpo apropiado que enlaza a albúmina de suero (denominado anticuerpo donante). Otras fuentes de CDR apropiadas incluyen anticuerpos específicos para albúmina de suero natural y artificial obtenidos de fuentes humanas o no humanas, tales como roedores (por ejemplo, ratón, rata, conejo), pollo, cerdo, cabra, primate no humano (por ejemplo, mono) o una biblioteca.

Las regiones de entramado de un anticuerpo humanizado

preferiblemente son de origen humano, y pueden provenir de cualquier región variable de anticuerpo humano que tenga similitud de secuencia con la región análoga o equivalente (por ejemplo, una región variable de cadena pesada o una región variable de cadena ligera) de la región enlazadora a antígeno del anticuerpo donante. Otras fuentes de regiones de entramado de origen humano incluyen secuencias de consenso de región variable humana. (Véase por ejemplo, Kettleborough, CA. *et al*, *Protein Engineering* 4:773-783 (1991); Carter *et al*, WO 94/04679; Kabat, E. A., *et al*, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edición, U.S. Department of Health and Human Services, U.S. Government Printing Office (1991)). Otros tipos de anticuerpos injertados con CDR pueden contener regiones de entramado de origen apropiado, tales como regiones de entramado codificadas por segmentos genéticos de anticuerpo de línea germinal de caballo, vaca, perro, gato y similares.

Las regiones de entramado de origen humano pueden incluir sustituciones o reemplazos de aminoácidos, tal como "retromutaciones" las cuales reemplazan un resido de aminoácido en la región de entramado de origen humano o animal con un residuo desde la posición correspondiente del anticuerpo del donante. Se puede hacer una o más mutaciones en una región de entramado, incluyendo deleciones, inserciones y sustituciones de uno o más aminoácidos. Se puede producir variantes mediante una variedad de métodos apropiados, incluyendo mutagénesis de cadenas donantes

no humanas o aceptoras humanas. (Véase por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5,693,762 (Queen *et al.*) y 5,859,205 (Adair *et al*), cuyas enseñanzas completas están incorporadas aquí mediante referencia.)

Las regiones constantes de anticuerpos, cadenas de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera) o fragmentos o fracciones de ellas, si están presentes, pueden provenir de cualquier fuente apropiada. Por ejemplo, las regiones constantes de anticuerpos humanos, humanizados y ciertos anticuerpos quiméricos, cadenas de anticuerpo (por ejemplo, cadena pesada, cadena ligera) o fragmentos o fracciones de ellas, si están presentes pueden ser de origen humano y pueden provenir de cualquier anticuerpo o cadena de anticuerpo humano. Por ejemplo, una región constante de origen humano o porción de ella, puede provenir de una cadena ligera humana κ o λ, y/o una cadena pesada γ humana (por ejemplo, $\gamma 1$, $\gamma 2$, $\gamma 3$, $\gamma 4$), μ, α (por ejemplo, $\alpha 1$, $\alpha 2$), δ o ϵ, incluyendo variantes alélicas. En ciertas modalidades, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno (por ejemplo, anticuerpo de origen humano, anticuerpo humano) puede incluir sustituciones o reemplazos de aminoácidos que alteran o ajustan la función (por ejemplo, función efectora). Por ejemplo, una región constante de origen humano (por ejemplo, región constante $\gamma 1$, región constante $\gamma 2$) se puede diseñar para reducir la activación del complemento y/o el enlace al receptor de Fc. (Véase por ejemplo, las patentes estadounidenses números 5,648,260 (Winter *et al.*), 5,624,821 (Winter *et al.*) y 5,834,597 (Tso

542

et al), cuyas enseñanzas completas están incorporadas aquí mediante referencia). Preferiblemente, la secuencia de aminoácidos de una región constante de origen humano que contiene estas sustituciones o reemplazos de aminoácidos es al menos aproximadamente 95% idéntica en toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada, más preferiblemente al menos aproximadamente 99% idéntica durante toda la longitud de la secuencia de aminoácidos de la región constante de origen humano no alterada.

Los anticuerpos humanizados, anticuerpos injertados con CDR o fragmentos de enlace a antígeno de un anticuerpo injertado con CDR o humanizado anticuerpo se pueden preparar usando cualquier método apropiado. Varios de estos métodos son bien conocidos en la técnica. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 5,225,539 (Winter), y la patente estadounidense número 5,530,101 (Queen *et al.*)). Las porciones de un anticuerpo humanizado o injertado con CDR (por ejemplo, CDR, entramado, región constante) se pueden obtener o producir directamente de anticuerpos apropiados (por ejemplo, mediante síntesis *de novo* de una porción), o ácidos nucleicos que codifican un anticuerpo o cadena de él que tienen la propiedad deseada (por ejemplo, se enlazan a albúmina de suero) se pueden producir y expresar. Para preparar una fracción de una cadena, uno o más codones de parada se pueden introducir en la posición deseada. Por ejemplo, se puede construir secuencias ácido nucleico (por ejemplo, ADN) que codifiquen regiones variables

injertadas con CDR usando métodos de mutagénesis por PCR para alterar las secuencias de ADN. (Véase por ejemplo, Kamman, M., *et al.*, *Nucl. Acids Res.* 17:5404 (1989).) Los sensibilizadores de PCR que codifican las nuevas CDR pueden ser hibridados en una plantilla de ADN de una región variable previamente humanizada que está basada en la misma región variable humana o muy similar (Sato, K., *et al.*, *Cancer Research* 53:851-856 (1993)). Si una secuencia de ADN similar no está disponible para su uso como plantilla, un ácido nucleico que contiene una secuencia que codifica una secuencia de región variable se puede construir a partir de oligonucleótidos sintéticos (Véase por ejemplo, Kolbinger, F., *Protein Engineering* 8:971-980 (1993)). También se puede incorporar una secuencia que codifica un péptido señal en el ácido nucleico (por ejemplo, en síntesis, con la inserción en un vector). Se puede utilizar la secuencia de péptido señal natural del anticuerpo aceptor, una secuencia de péptido señal de otro anticuerpo u otra secuencia apropiada (Véase por ejemplo, Kettleborough, C.A., Protein Engineering 4:773-783 (1991)). Usando estos métodos u otros métodos apropiados, se pueden producir variantes fácilmente. En una modalidad, se pueden mutar las regiones variables clonadas, y se puede seleccionar las secuencias que codifican variantes con la especificidad deseada (por ejemplo, de una biblioteca de fagos; véase, por ejemplo, la patente estadounidense número 5,514,548 (Krebber *et al.*) y WO 93/06213 (Hoogenboom *et al.*)).

El anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno que se une a

albúmina de suero puede ser un anticuerpo quimérico o un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo quimérico. El anticuerpo quimérico o fragmento de enlace a antígeno de él contiene una región variable de una especie (por ejemplo, ratón) y al menos una fracción de una región constante de otra especie (por ejemplo, humana). Los anticuerpos quiméricos y fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos quiméricos se pueden preparar usando cualquier método apropiado. Varios métodos apropiados son bien conocidos en la técnica. (Véase por ejemplo, la patente estadounidense número 4,816,567 (Cabilly *et al*), y la patente estadounidense número 5,116,946 (Capon *et al.*))

Un método preferido para obtener fragmentos de enlace a antígeno de anticuerpos que enlazan a albúmina de suero, comprende seleccionar un fragmento de enlace a antígeno (por ejemplo, scFv, dAb) que tiene especificidad de enlace para una albúmina de suero deseada de un repertorio de fragmentos de enlace a antígeno. Por ejemplo, como se describe aquí, los dAb que enlazan a albúmina de suero se pueden seleccionar de una biblioteca de exhibición de fagos apropiada. Una cantidad de bibliotecas de exhibición de bacteriófagos y métodos de selección (por ejemplo, sistemas de exhibición monovalente y sistemas de exhibición multivalentes) se ha descrito. (Véase por ejemplo, Griffiths *et al*, patente estadounidense número 6,555,313 B1 (incorporada aquí mediante referencia); Johnson *et al.*, patente estadounidense número 5,733,743 (incorporada aquí mediante referencia); McCafferty *et al*,

patente estadounidense número 5,969,108 (incorporada aquí mediante referencia); Mulligan-Kehoe, patente estadounidense número 5,702,892 (incorporada aquí mediante referencia); Winter, G. *et al*, *Annu. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994); Soumillion, P. *et al*, *Appl. Biochem. Biotechnol* 47(2-3):175-189 (1994); Castagnoli, L. *et al*, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 4(2):121-133 (2001); WO 99/20749 (Tomlinson y Winter); WO 03/002609 A2 (Winter *et al*); WO 2004/003019 A2 (Winter *et al*)) Los polipéptidos mostrados en una biblioteca de bacteriófagos pueden ser mostrados en cualquier bacteriófago apropiado, tal como un fago filamentoso (por ejemplo, fd, M13, Fl), un fago lítico (por ejemplo, T4, T7, lambda), o un fago de ARN (por ejemplo, MS2), por ejemplo, y seleccionarse por su enlace a albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana).

Generalmente, se usa una biblioteca de fagos que muestra un repertorio de polipéptidos como proteínas de fusión con una proteína de recubrimiento de fago. Esta biblioteca se puede producir usando cualesquiera métodos apropiados, tales como introducir una biblioteca de vectores de fago o vectores de fagémido que codifica los anticuerpos mostrados o los fragmentos de enlace a antígeno de ellos en una bacteria huésped apropiada (por ejemplo, usando un fago auxiliar apropiado o plásmido de complementación si se desea). La biblioteca de fagos puede ser recuperado de este tipo de cultivo utilizando cualquier método apropiado, tal como precipitación y centrifugación.

546

La biblioteca puede contener un repertorio de anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que contienen cualquier cantidad deseada de diversidad de secuencia de aminoácidos. Por ejemplo, el repertorio puede contener anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a anticuerpos de origen natural de un organismo deseado, y/o puede contener una o más regiones de secuencias de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas (por ejemplo, secuencias de CDR). Los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos en un repertorio o biblioteca de estas pueden contener regiones definidas de secuencias de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas de secuencia de aminoácidos comunes. En ciertas modalidades, todos o sustancialmente todos los polipéptidos en un repertorio son un tipo deseado de fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, V_H humano o V_L humano). Por ejemplo, cada polipéptido en el repertorio puede contener un V_H, un V_L o un Fv (por ejemplo, un Fv de una sola cadena).

La diversidad de secuencia de aminoácidos se puede introducir en cualquier región deseada de anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos usando cualquier método apropiado. Por ejemplo, diversidad de secuencia de aminoácidos se puede introducir en una región objetivo, tal como una región determinante de complementariedad de un anticuerpo dominio variable, preparando una biblioteca de ácidos nucleicos que codifican los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos usando cualquier método

de mutagénesis (por ejemplo, PCR de baja fidelidad, mutagénesis dirigida al sitio mediada por oligonucleótidos, diversificación usando codones NNK) o cualquier otro método apropiado. Si se desea, una región de los anticuerpos o fragmento de enlace a antígenos de ellos que va a ser diversificada puede ser aleatorizada.

Se puede usar una biblioteca de fagos apropiada para anticuerpos o fragmentos de enlace a antígenos de anticuerpos que enlazan a albúmina de suero y tienen otras propiedades beneficiosas. Por ejemplo, se puede seleccionar los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno que resisten la agregación cuando se despliegan. La agregación está influenciada por la concentración de polipéptidos y se piensa que aparecen en muchos casos a partir de intermediarios parcialmente plegados o no plegados. Los factores y condiciones que favorecen los intermediarios plegados parcialmente, tales como la temperatura elevada y la alta concentración de polipéptidos, promueven la agregación irreversible. (Fink, A.L., Folding & Design J:R1-R23 (1998).) Por ejemplo, almacenar los polipéptidos purificados en forma concentrada, tal como una preparación liofilizada, da como resultado frecuentemente en una agregación irreversible de al menos una parte de los polipéptidos. También, la producción de un polipéptido mediante expresión en sistemas biológicos, tales como *E. coli*, con frecuencia da como resultado en la formación de cuerpos de inclusión que contienen polipéptidos agregados. La recuperación de polipéptidos activos de cuerpos de inclusión puede ser muy difícil, y requiere

548

añadir pasos adicionales, tales como un paso de replegado, a un sistema de producción biológica.

Los anticuerpos y fragmentos de enlace a antígeno que resisten la agregación y se despliegan de manera reversible cuando se calientan pueden ser seleccionados de una biblioteca de exhibición de fagos. Generalmente, una biblioteca de exhibición de fagos que contiene un repertorio de anticuerpos mostrados o fragmentos de enlace a antígeno de ellos se calienta hasta una temperatura (Ts) a la cual al menos una fracción de los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos mostrados se despliegan, luego se enfrían hasta una temperatura (Tc) en donde Ts>Tc, mediante lo cual al menos una fracción de los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos se ha replegado y una fracción de los polipéptidos se ha agregado. Luego, los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que se despliegan de manera reversible y se enlazan a albúmina de suero, se recuperan a una temperatura (Tr). El anticuerpo recuperado o fragmento de enlace a antígeno de él que se despliega reversiblemente tiene una temperatura de fusión (Tm), y preferiblemente, el repertorio fue calentado hasta Ts, enfriado hasta Tc y el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno de él que se despliega reversiblemente, fue aislado a Tr, de tal forma que Ts>Tm>Tc, y Ts>Tm>Tr. Generalmente, la biblioteca de exhibición de fagos se calienta hasta aproximadamente 80 °C y se enfría hasta aproximadamente temperatura ambiente o aproximadamente hasta 4 °C antes de la

selección. Los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de él que se desdoblan de manera reversible y resisten a la agregación, también pueden ser diseñados o concebidos reemplazando ciertos residuos de aminoácidos con residuos que confieren la capacidad de desplegar la reversibilidad. (Véase WO 2004/101790 (Jespers *et al.*), y las solicitudes de patente provisional estadounidense números: 60/470,340 (presentada el 14 de mayo de 2003) y 60/554,021 (presentada el 17 de marzo de 2004) para la descripción detallada de métodos para el diseño o ingeniería de anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que se despliegan de forma reversible. Las enseñanzas de WO 2004/101790 y ambas solicitudes de patente provisional estadounidense están incorporadas aquí mediante referencia).

Los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que se despliegan de manera reversible y resisten la agregación proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, debido a su resistencia a la agregación, los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que se despliegan reversiblemente, pueden ser producidos fácilmente en altos rendimientos como proteína solubles mediante expresión usando un sistema de producción biológica, tal como *E. coli*. Además, los anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno de ellos que se despliegan de manera reversible pueden ser formulados y/o almacenados en concentraciones más altas que los polipéptidos convencionales, y con menos agregación y pérdida de actividad. El DOM7h-26 (SEQ ID NO:20) es un V_H humano que se despliega de

550

manera reversible. Preferiblemente, el anticuerpo o fragmento de enlace a antígeno de él que se une a albúmina de suero contiene un dominio variable (V_H, $V\kappa$, V_λ) en el cual una o más de las regiones de entramado (FR) contiene (a) la secuencia de aminoácidos de una región de entramado humana, (b) al menos 8 aminoácidos contiguos de la secuencia de aminoácidos de una región de entramado humana, o (c) una secuencia de aminoácidos codificadas por un segmento genético de anticuerpo de línea germinal humana, en donde dichas regiones de entramado son como se definen por Kabat. En ciertas modalidades, la secuencia de aminoácidos de una o más de las regiones de entramado es la misma que la secuencia de aminoácidos de una región correspondiente de entramado codificadas por un segmento genético de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de aminoácidos de uno o más de dichas regiones de entramado contienen colectivamente hasta 5 diferencias de aminoácidos con relación a la secuencia de aminoácidos de dicha región de entramado correspondiente codificadas por un segmento genético de anticuerpo de línea germinal humana.

En otras modalidades, las secuencias de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 y FR4 son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones de entramado correspondientes codificadas por un segmento genético de anticuerpo de línea germinal humana, o las secuencias de aminoácidos de FR1, FR2, FR3 y FR4 contienen colectivamente hasta 10 diferencias de aminoácidos con relación a

las secuencias de aminoácidos de las regiones de entramado correspondientes codificadas por dichos segmentos genético de anticuerpo de línea germinal humana, En otras modalidades, la secuencia de aminoácidos de dichos FR1, FR2 y FR3 son las mismas que las secuencias de aminoácidos de las regiones de entramado correspondientes codificadas por dicho segmento genético de anticuerpo de línea germinal humana.

En modalidades particulares, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero contiene un dominio variable de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H, V_L) basado en una secuencia de línea germinal humana, y si se desea puede tener una o más regiones diversificadas, tal como las regiones determinantes de complementariedad. La secuencia apropiada de línea germinal humana para V_H incluyen, por ejemplo, secuencias codificadas por los segmentos genéticos de V_H DP4, DP7, DP8, DP9, DPI0, DP31, DP33, DP45, DP46, DP47, DP49, DP50, DP51, DP53, DP54, DP65, DP66, DP67, DP68 y DP69, y los segmentos JH JH1, JH2, JH3, JH4, JH4b, JH5 y JH6. La secuencia apropiada de línea germinal humana para V_L incluyen, por ejemplo, secuencias codificadas por los segmentos genéticos de Vκ DPK1, DPK2, DPK3, DPK4, DPK5, DPK6, DPK7, DPK8, DPK9, DPK10, DPK12, DPK13, DPK15, DPK16, DPK18, DPK19, DPK20, DPK21, DPK22, DPK23, DPK24, DPK25, DPK26 y DPK 28, y los segmentos Jκ Jκ 1, Jκ 2, Jκ 3, Jκ 4 y Jκ 5.

En ciertas modalidades, el conjugado de fármaco, conjugado

de fármaco no covalente o fusión de fármaco no contiene un anticuerpo de ratón, rata y/o de conejo que se une a albúmina de suero o fragmento de enlace a antígeno de tal anticuerpo.

El fragmento de enlace a antígeno se puede enlazar a albúmina de suero con cualquier afinidad, tasa de activación y tasa de desactivación deseadas. La afinidad (KD), en la tasa de activación (K_{on} o k_a) y en la tasa de desactivación ($K_{of}f$ o k_d o K_d) se puede seleccionar para obtener una vida media en suero máxima para un fármaco en particular. Por ejemplo, puede ser deseable obtener una vida media en suero máxima para un fármaco que neutralice un mediador inflamatorio de un trastorno inflamatorio crónico (por ejemplo, un dAb que se une a una citocina inflamatoria y la neutraliza), mientras que puede ser deseable una vida media más corta para un fármaco que tiene alguna toxicidad (por ejemplo, un agente quimioterapéutico). Generalmente, se prefiere una tasa de activación rápida y una tasa de desactivación moderada para el enlace a albúmina de suero. Los conjugados de fármaco y fusiones de fármaco que contienen un fragmento de enlace a antígeno con estas características se enlazarán rápidamente a la albúmina de suero. Estas características reducirán la rapidez de eliminación del fármaco (por ejemplo, a través de los riñones), pero todavía proporcionarán un suministro y acceso eficientes al objetivo del fármaco.

El fragmento de enlace a antígeno que se une a albúmina de suero (por ejemplo, dAb) generalmente se enlaza con una KD de

aproximadamente 1 nM hasta aproximadamente 500 μM. En algunas modalidades, el fragmento de enlace a antígeno se enlaza a albúmina de suero con una KD ($KD=K_{off}$ (kd)/K_{on} (ka)) desde aproximadamente 10 hasta aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 100 nM hasta aproximadamente 500 nM, o aproximadamente 500 nM hasta aproximadamente 5 mM, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando un instrumento BIACORE). En modalidades particulares, el conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente o fusión de fármaco contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo (por ejemplo, un dAb) que se une a albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana) con una KD de aproximadamente 50 nM, o aproximadamente 70 nM, o aproximadamente 100 nM, o aproximadamente 150 nM o aproximadamente 200 nM. Las propiedades farmacocinéticas mejoradas (por ejemplo, t1/2β prolongado, AUC aumentada) de conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco descritos aquí se pueden correlacionar con la afinidad del fragmento de enlace a antígeno que se une a albúmina de suero. De acuerdo con esto, los conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes y fusiones de fármaco que tienen propiedades farmacocinéticas mejoradas se pueden preparar generalmente usando un fragmento de enlace a antígeno que se une a albúmina de suero (por ejemplo, albúmina de suero humana) con alta afinidad (por ejemplo, KD de aproximadamente 500 nM o menos,

aproximadamente 250 nM o menos, aproximadamente 100 nM o menos, aproximadamente 50 nM o menos, aproximadamente 10 nM o menos, o aproximadamente 1 nM o menos, o aproximadamente 100 pM o menos).

Preferiblemente, el fármaco que está conjugado o fusionado al fragmento de enlace a antígeno que se une a albúmina de suero, se une a su objetivo (el objetivo del fármaco) con una afinidad (KD) que es mayor que la afinidad del fragmento de enlace a antígeno para la albúmina de suero y/o una K_{off} (kd) que es más rápida que la K_{off} del fragmento de enlace a antígeno para la albúmina de suero, según se mide mediante resonancia de plasmón superficial (por ejemplo, usando un instrumento BIACORE). Por ejemplo, el fármaco se puede unir a su objetivo con una afinidad que es desde aproximadamente 1 hasta aproximadamente 100000, o aproximadamente 100 hasta aproximadamente 100000, o aproximadamente 1000 hasta aproximadamente 100000, o aproximadamente 10000 hasta aproximadamente 100000 veces mayor que la afinidad del fragmento de enlace a antígeno que se une a SA para SA. Por ejemplo, el fragmento de enlace a antígeno del anticuerpo que se une a SA se puede enlazar con una afinidad de aproximadamente 10 μM, mientras que el fármaco se une a su objetivo con una afinidad de aproximadamente 100 pM.

En modalidades particulares, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero es un dAb que se une a albúmina de suero humana. Por ejemplo, un dAb V_κ que

555

tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26, o un dAb V_H que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23. En otras modalidades, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero es un dAb que se une a albúmina de suero humana y contiene la CDR de cualquiera de las secuencias de aminoácidos precedentes. En otras modalidades, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero es un dAb que se une a albúmina de suero humana y contiene una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 o SEQ ID NO:23. La identidad de secuencia de aminoácidos se determina preferiblemente usando un algoritmo para alineación de secuencia apropiado y parámetros

por defecto, tal como BLAST P (Karlin y Altschul, *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 57(6):2264-2268 (1990)).

Fármacos

Ciertas composiciones de fármacos de la invención (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes) pueden contener cualquier fármaco (por ejemplo, molécula orgánica pequeña, ácido nucleico, polipéptido) que se puede administrar a un individuo para producir un efecto terapéutico o diagnóstico beneficioso, por ejemplo, a través de enlace a y/o alterando la función de, una molécula biológica objetivo en el individuo. Otras composiciones de fármacos de la invención (por ejemplo, fusiones de fármaco) pueden contener un polipéptido o fármaco de péptido. En modalidades preferidas de fusiones de fármaco, el fármaco no contiene una cadena de anticuerpo o fragmento de una cadena de anticuerpo (por ejemplo, V_H, VK, V_λ). En modalidades específicas, el fármaco se selecciona de un agente insulinotrópico, e incretina, un péptido 1 similar al glucagón, un péptido GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, PYY, un péptido PYY, a análogo de PYY, un derivado de PYY, exendina 3, un péptido exendina 3, un análogo de exendina 3, un derivado de exendina 3, exendina 4, un péptido exendina 4, un análogo de exendina 4, un derivado de exendina 4 o una combinación de dos o más de estos (por ejemplo, péptido GLP-1 y un péptido PYY).

Los fármacos apropiados para su uso en la invención incluyen, por ejemplo, agentes inmunosupresores (por ejemplo, ciclosporina A,

rapamicina, FK506, prednisona), agentes antivirales (aciclovir, ganciclovir, indinavir), antibióticos (penicilina, minociclina, tetraciclina), agentes anti inflamatorios (aspirina, ibuprofeno, prednisona), citotoxinas o agentes citotóxicos (por ejemplo, paclitaxel, citochalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina C, etoposide, tenoposide, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracindiona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-dihidrotestosterona, glucocorticoides, procaina, tetracaina, lidocaina, propranolol, puromicina, y análogos u homólogos de cualquiera de los agentes anteriores. Los fármacos apropiados también incluyen antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepaclorambucil, CC-1065, melfalan, carmustine (BSNU), lomustine (CCNU), ciclofosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C, y cis-diclorodiamina platino (II) (DDP) cisplatina), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina, y antramicina (AMC)), radionúclidos (por ejemplo, yodo-125, -126) itrio (por ejemplo, itrio-90, -91) y praseodimio (por ejemplo, praseodimio 144, 145), e inhibidores de proteasa (por ejemplo, inhibidores de matriz metaloproteinasas). Otros fármacos apropiados son ácidos nucleicos tal como ácidos nucleicos inversos y ARNi. La

calicheamicina también es apropiada para su uso en la invención.

Los fármacos apropiados también incluyen agentes analgésicos, incluyendo narcóticos (por ejemplo, codeína, nalmefeno, naloxona, fentanil, meperidina, morfina, tramadol, propoxifeno, oxicodona, metadona, nalbufina), agentes anti inflamatorios no esteroideos (por ejemplo, indometacina, cetorolac, artrotec, ibuprofeno, naproxeno, salicilato, celecoxib, rofecoxib), acetaminofén, capsaicina, ziconotide y similares.

En ciertas modalidades, el fármaco es una polipéptido toxina, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de pseudomonas, o toxina difteriana. Otros polipéptidos de fármaco apropiados incluyen anticuerpos o fragmentos de enlace a antígeno (por ejemplo, dAb) de anticuerpos, agonistas de polipéptido, activadores, secretagogos, antagonistas o inhibidores. Por ejemplo, el polipéptido o fármaco de péptido se puede enlazar y agonizar o antagonizar a una proteína de superficie celular, tal como un antígeno CD, receptor de citocina (por ejemplo, receptor de interleucina, receptor de quimioquina), molécula de adhesión o molécula coestimuladora. Por ejemplo, el fármaco polipéptido se puede enlazar a una citocina, factores de crecimiento, receptor de citocina, receptor de factor de crecimiento y otro ligando objetivo, el cual incluye, sin limitarse a ellos: ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, ligando CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FAPα, FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos

10, ligando FLT3, Fractalquina (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF-β1, albúmina de suero humana, insulina, IFN-γ, IGF-I, IGF-II, IL-1α, IL-1β, receptor de IL-1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL- 11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α, Inhibina β, IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos 2 (KGF-2), KGF, leptina, LIF, linfotactina, sustancia inhibidora de Mullerian, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1α, MIP-Iβ, MIP-3α, MIP-3β, MIP-4, factor inhibidor de progenitor de mieloide 1 (MPIF-I), NAP-2, Neurturin, factor de crecimiento de nervios, β-NGF, NT-3, NT-4, Oncostatina M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDFIα, SDFI β, SCF, SCGF, factor de célula madre (SCF), TARC, TGF-α, TGF-β, TGF-β2, TGF-β3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF-α, TNF-β, receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, receptor de VEGF 1, receptor de VEGF 2, receptor de VEGF 3, GCP-2, GRO/MGSA, GRO-β, GRO-γ, HCCI, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3 y HER 4. Se entenderá que esta lista no es exhaustiva de forma alguna.

Los fármacos apropiados también incluyen hormonas, incluyendo hormona pituitaria (PTH), hormona adrenocorticotrópica (ACTH), renina, hormona liberadora de hormona luteinizante (LHRH), hormona liberadora de gonadotropina (GnRH), hormona luteinizante (LH), hormona estimuladora de folículo (FSH), aldosterona, y

similares. Los fármacos apropiados también incluyen factor de crecimiento de queratinocitos, interferones (por ejemplo, IFN-α, IFN-β, IFN-γ), eritropoyetina (EPO), proteasas, elastasas, análogos, agonistas y antagonistas de LHRH, agonistas del receptor opioide, tales como los agonistas del receptor opioide kappa (por ejemplo, dinorfina A), calcitonina y análogos de calcitonina, hormona antidiurética (vasopresina), antagonistas de oxitocina, péptido intestinal vasoactivo, inhibidores de trombina, factor de von Willebrand, agentes tensoactivos y veneno de caracol (por ejemplo, ziconotida).

Los fármacos apropiados también incluyen péptidos y polipéptidos que tienen actividades anticancerosas (por ejemplo, inhibición de proliferación, inhibición de crecimiento, inducción de apoptosis, inhibición de metástasis, inhibición de adhesión, inhibición de neovascularización). Varios de estos péptidos y polipéptidos son conocidos en la técnica. (Véase. por ejemplo, Janin Y.L., *Amino Acids*, 25:1-40 (2003). Las enseñanzas completas de esta referencia, particularmente los péptidos y polipéptidos que se describen allí, están incorporadas aquí mediante referencia.) Las secuencias de aminoácidos de varios de estos péptidos se presentan en la Tabla 8.

Otros fármacos apropiados incluyen péptidos y polipéptidos que tienen actividad antiviral. Varios de estos péptidos y polipéptidos se conocen en la técnica, por ejemplo los péptidos y polipéptidos que se describen en Giannecchini, *et al*, *J Viro.*,

77(6):3724-33 (2003); Wang, J., *et al*, *Clin Chem* (2003); Hilleman, M.R., *Vaccine*, 21(32):4626-49 (2003); Tziveleka, L.A., *et al*, *Curr Top Med Chem*, 3(13): 1512-35 (2003); Poritz, M.A., *et al*, *Virology*, 313(7):170-83 (2003); Oevermann, A., *et al*, *Antiviral Res*, 59(1):23-33 (2003); Cole, A.M. *et al*, *Curr Pharm Des*, 9(18): 1463-73 (2003); Pinon, J.D., *et al*, *Virol*, 77(5):3281-90 (2003); Sia, S.K., *et al*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 99(23): 14664-9 (2002); Bahbouhi, B., *et al*, *Biochem J*, 66(Pt 3):863-72 (2002); de Soultrait, V.R., *et al*, *J Mol Biol*, 18(1):45-58 (2002); Witherell, G., *Curr Opin Investig Drugs*, 2(5):340-7 (2001); Ruff, M.R., *et al.*, *Antiviral Res*, 52(I):63-75 (2001); Bultmann, H., *et al.*, *J. Virol*, 75(<5):2634-45 (2001); Egal, M., *et al.*, *Int J Antimicrob Agents*, 13(/):57-60 (1999); y Robinson, W.E., Jr., *J Leukoc Biol*, 63(7):94- 100(1998). Las enseñanzas completas de estas referencias, particularmente los péptidos y polipéptidos que se describen allí, están incorporadas aquí mediante referencia. Estos péptidos y polipéptidos son ejemplos de fármacos que se pueden utilizar en las composiciones, fusiones de fármaco, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes de la presente invención.

El fármaco de polipéptido también puede ser una citocina o factor de crecimiento o porción soluble de un receptor (por ejemplo, un receptor de citocina, factor de crecimiento receptor, receptor de hormona) u otro polipéptido tal como los polipéptidos mencionados anteriormente. Por ejemplo, los fármacos de polipéptido apropiados también incluyen agonistas de receptor (por ejemplo, receptor de

562

factor de crecimiento, receptor de citocina, receptor de hormona) agonistas y antagonistas, tal como el antagonista del receptor de interleucina 1 (Eisenberg *et al, Nature* 343:341-346 (1990)), agonistas del receptor de trombopoyetina (por ejemplo, GW395058 (de Serres *et al*, *Stem Cells* 17:316-326 (1999)), antagonistas del receptor de melanocortina (por ejemplo, antagonistas de MCR-4 (Cepoi *et al.*, *Brain Res.* 1000:64-71 (2004)), anginex, 6DBF7 (Mayo *et al., J. Biol. Chem.* 278:45746-45752 (2003)), imitadores de quimioquina (por ejemplo, imitadores de RANTES (Nardese *et al.*, *Nat. Struct. Biol.* 8 : 611 -615 (2001)), hormona del crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento humana), análogos de hormona del crecimiento y secretagogos de hormona del crecimiento (por ejemplo, CP-424,391 (MacAndrew *et al., Eur. J. Pharmacol.* 432:195-202 (2001)), imitadores de hormona liberadora de hormona del crecimiento (por ejemplo, MK-677 (Chapman *et al., J. Clin. Endocrinol. Metab.* 82:3455-3463 (1997)), inhibidores de interacciones de molécula de adhesión celular (por ejemplo, LFA-1 /ICAM-1, VLA-1/VCAM-1 (Yusuf-Makagiansar *et al.,* Med. Res. Rev. 22:146-167 (2002)), imitadores de interferón (por ejemplo, SYR6 (Sato *et al.,* Biochem. J. 371(Pt.2):603-608 (2003), imitadores de herceptina (*Nature Biotechnol.* 18:137 (2000)), inhibidores de presentación de antígenos (Bolin *et al., J. Med. Chem.* 43:2135-2148 (2000)), antagonistas de GPIB/IIIA (por ejemplo, FK633 (Aoki *et al.,* Thromb. Res. 81:439-450 (1996)), antagonistas alfavbeta3 (por ejemplo, SC56631 (Engleman *et al., J. Clin. Invest.* 99:2284-2292

(1997)), imitadores de eritropoyetina (por ejemplo, EMPI (Johnson *et al., Biochemistry* 37:3699-3710 (1998)), antagonistas del receptor opioide (por ejemplo, [(2S, 3R)-TMT1]DPDPE (Liao *et al., J. Med. Chem.* 41:4767-4776 (1998)), factores hematopoyéticos (por ejemplo, eritropoyetina (EPO), factor estimulador de colonia de granulocitos (GM-CSF)).

Otros péptidos y fármacos de polipéptidos apropiados incluyen antagonistas de péptido que enlazan al receptor de IL-1 de tipo 1 humano (por ejemplo, AF 11377 (FEWTPGYWQPYALPL, SEQ ID NO:56), AF11869 (FEWTPGYWQJYALPL, SEQ ID NO:57 (J = ácido 1-azetidina-2-carboxílico), FEWTPGYWQJY (SEQ ID NO:58), FEWTPGWYQJY (SEQ ID NO:59), FEWTPGWYQJYALPL (SEQ ID NO:60), o cualquiera de las secuencias anteriores que opcionalmente contiene un terminal amino acilado y/o un terminal carboxilo aminado (Akeson *et al., J. Biol. Chem.* 271:30517-305123 (1996)), antagonistas de péptido de citotoxicidad mediada por FNT-alfa (por ejemplo, los que se describen en Chirinos-Rojas *et al*, *J. Immunol.* 161:5621-5626 (1998)), agonistas de péptido del receptor de eritropoyetina (por ejemplo, los que se describen en McConnel *et al*, *Biol. Chem.* 379:1279-1286 (1998) o en Wrighton *et al*, *Science* 273:458-464 (1996)), péptido 1 similar al glucagón (GLP-1, por ejemplo, GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)amida y análogos de ellos (Véase por ejemplo, Ritzel U. *et al*, *J. Endocrinology* 159:93- 102 (1998)), e interferones (por ejemplo, INF-α, INF-β, INF-λ). Otros polipéptidos y fármacos de péptidos apropiados incluyen inhibidores de integrina

(por ejemplo, péptidos RGD, tales como H-Glu[ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys)]$_2$ (Janssen, M.L., *et al*, *Cancer Research* 62:6146-6151 (2002)), ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Phe-Lys) (Kantlehner M., *et al*, *Agnew. Chem. Int. Ed.* 38:560 (1999)), ciclo(Arg-Gly-Asp-D-Tyr-Lys) (Haubner, R., *et al*, *J. Nucl. Med.* 42:326-336 (2001)), proteínas inactivadoras de ribosoma (RIPs) tales como la Saporina (por ejemplo, SEQ ID NO:67), inhibidores de matriz metaloproteinasa (por ejemplo, patente estadounidense número 5,616,605), y péptidos y polipéptidos antivirales, tales como los inhibidores de fusión de VIH (por ejemplo, T-1249 y T-20 (FUZEON® (enfuvirtide); Trimeris Inc.), y los antagonistas del receptor soluble tales como las immunoadhesinas (por ejemplo, LFA3-Ig, CTLA4-Ig).

Los polipéptidos y fármacos de péptidos antimicrobianos también son apropiados para su uso en la invención. Los ejemplos de polipéptidos y fármacos de péptidos apropiados incluyen adenoregulina, dermcidina-1L, catelicidinas (por ejemplo, péptido similar a la catelcidina, LL-37/hCAP-18 humano), defensinas, incluyendo α-defensinas (por ejemplo, péptido 1 neutrófilo humano (HNP-1), HNP-2, HNP-3, HNP-4, defensina 5 humana, defensina 6 humana), β-defensinas (por ejemplo, β-defensin-1 humana, β-defensina-2 humana), y θ-defensinas (por ejemplo, θ-defensina-1), histatinas (por ejemplo, histatina 1, histatina 3, histatina 5), péptido derivado de lactoferrina y péptidos relacionados (Véase Tomita M., *et al*, *Acta Paediatr. Jpn.* 36:585-591 (1994) y Strom, M.B., *et al* Biochem Cell Biol 80:65-74 (2002)). En una modalidad preferida de la

invención, los fármacos son fármacos insulinotrópicos.

Los ejemplos de fármacos insulinotrópicos apropiados incluyen GLP-1, derivado de GLP-1, análogos de GLP-1 o un derivado de un análogo de GLP-1. Además incluyen exedina 4, análogos de exedina-4 análogos y derivados de exedina 4 y exedina 3, derivados de exedina 3 derivados y análogos de exedina 3.

Otros fármacos apropiados incluyen péptido YY (3-36) o sus análogos. El péptido YY (PYY) es un péptido amida de 36 residuos aislado originalmente de intestino porcino, y localizado en las células endocrinas del tracto gastrointestinal y del páncreas (Tatemoto, *et al. Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:2514, 1982). El péptido YY tiene amidas tirosina en el terminal N y en el terminal C; de acuerdo con esto, estas dos tirosinas le dan su nombre al PYY (Y representa el aminoácido tirosina en la nomenclatura de péptidos). Además, el PYY comparte una cantidad de papeles reguladores central y periférico con su péptido homólogo neuropéptido Y (NPY), el cual originalmente se aisló de cerebro porcino (Tatemoto, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 79:5485, 1982). En contraste con la ubicación celular del de PYY, el NPY está presente en neuronas submucosas y mientéricas que inervan las capas de mucosas y de músculos lisos, respectivamente (Ekblad *et al.* Neuroscience 20:169, 1987). Se cree que tanto el PYY como el NPY inhiben la motilidad intestinal y el flujo sanguíneo (Laburthe, *Trends Endocrinol. Metab.* 1:168, 1990), y también se piensa que atenúa la secreción basal (Cox *et al Br. J. Pharmacol.* 101 :247, 1990) e intestinal inducida por secretagogo en

las ratas (Lundberg *et al Proc. Natl. Acad. Sci USA* 79:4471, 1982), así como también estimulan la absorción neta (MacFadyen *et al.* Neuropeptides 7:219, 1986). Tomadas juntas, estas observaciones sugieren que el PYY y el NPY son liberados en la circulación después de una comida (Adrian *et al. Gastroenterology* 89:1070, 1985; Balasubramaniam *et al. Neuropeptides* 14:209, 1989), y por ello juega un papel fisiológico en regulación de la secreción y la absorción intestinal.

Un sistema receptor de PYY de alta afinidad que muestra una afinidad ligeramente más alta para el PYY que para el NPY ha sido caracterizado en epitelio intestinal de rata (Laburthe *et al Endocrinology* 118:1910, 1986) y demuestra que está acoplado negativamente a la adenilato ciclasa (Servin *et al.* Endocrinology 124:692, 1989). Los estudios de actividad estructural que utilizan varias secuencias parciales han conducido a la identificación de PYY(22-36) como el sitio activo para interactuar con receptores intestinales de PYY (Balsubramaniam *et al.* Pept. Res. 1 :32, 1988).

Además, el PYY ha estado implicado en una cantidad de actividades fisiológicas que incluyen absorción de nutrientes (Bilcheik *et al. Digestive Disease Week* 506:623, 1993), proliferación celular (Laburthe, *Trends Endocrinol. Metab.* 1:168, 1990; Voisin *et al.* J. Biol. Chem, 1993), lipólisis (Valet *et al*, *J. Clin. Invest.* 291, 1990), y vasoconstricción (Lundberg *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci.*, USA 79: 4471, 1982).

WO 03/057235 y WO 03/026591 describen métodos para

disminuir la absorción de calorías, la absorción de alimentos y el apetito mediante la administración de PYY o un agonista y GLP-1. Estas publicaciones están incorporadas aquí mediante referencia en su totalidad, en particular para proporcionar ejemplos de PYY y fármacos de GLP-1 y a métodos que se pueden utilizar en la presente invención.

Otros fármacos más que son apropiados para uso en la invención, incluyen insulina, resistina, leptina, antagonista de MC3R/MC4R, antagonista de AgRP, apolipoproteína A-IV, enterostatina, péptido liberador de gastrina (GRP), IGF1, BMP-9, IL-22, RegIV, interferón alfa, péptido INGAP, somatostatina, amilina, neurulina, interferón beta, híbridos de interferón, adiponectina, endocanabinoides, péptido C, WNT10b, orexina-A, adrenocorticotropina, enterostatina, colecistoquinina, oxintomodulina, hormonas estimuladores de melanocito, melanocortina, hormona concentradora de melanina, BB-2, agonistas de NPY Y2, antagonistas de NPY Y5/Y1, OXM, antagonistas de Gal-1R, antagonistas de MCH-IR, agonistas de MC-3/4, agonistas de BRS-3, polipéptido pancreático, fragmento anticuerpo anti-Grelina, factor neurotrófico de origen cerebral, hormona de crecimiento humana, hormona paratiroides, hormona estimuladora de folículo, péptido inhibitorio gástrico o un análogo de él.

Fusiones de fármaco

Las fusiones de fármaco de la invención son proteínas de fusión que contienen una cadena continua de polipéptido, dicha

cadena que contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero como una primera fracción, enlazadas a una segunda fracción que es un fármaco de polipéptido. La primera y segunda fracciones pueden estar unidas directamente una a la otra a través de una unión peptídica, o enlazadas a través de un aminoácido, o péptido o enlazante polipéptido apropiado. Otras fracciones (por ejemplo, tercera, cuarta) y/o secuencias enalzantes, pueden estar presentes según sea apropiado. La primera fracción puede estar en una ubicación en el terminal N, en una ubicación en el terminal C o interna con relación a la segunda fracción (es decir, el fármaco polipéptido). En ciertas modalidades, cada fracción puede estar presente en más de una copia. Por ejemplo, la fusión de fármaco puede contener dos o más primeras fracciones cada una que contengan un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero (por ejemplo, un V_H que se une a albúmina de suero humana y un V_L que enlaza a albúmina de suero humana o dos o más V_H o V_L que enlazan a albúmina de suero humana).

En algunas modalidades, la fusión de fármaco es una cadena continua de polipéptido que tiene la fórmula:

$a\text{-}(X)_{n1}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(Z)_{n3}\text{-}d$ o $a\text{-}(Z)_{n3}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(X)_{n1}\text{-}d$;

en donde X es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de enlace para un primer objetivo;

Y es un fragmento de enlace a antígeno de cadena simple, de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de

suero;

Z es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de enlace para un segundo objetivo;

a, b, c y d están ausentes cada uno independientemente o son desde uno hasta aproximadamente 100 residuos de aminoácido;

n1 es desde uno hasta aproximadamente 10;

n2 es desde uno hasta aproximadamente 10; y

n3 es cero hasta aproximadamente 10,

con la condición de que cuando n1 y n2 son ambos uno y n3 es cero, X no contenga una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo.

En una modalidad, ni X ni Z contienen una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo. En una modalidad, n1 es uno, n3 es uno y n2 es dos, tres, cuatro, cinco, seis, siete, ocho o nueve. Preferiblemente, Y es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero. Más preferiblemente, Y es un dAb (por ejemplo, un V_H, $V\kappa$ o V_λ) que se une a albúmina de suero humana, en una modalidad particular, X o Z es GLP-1 humano o un derivado de GLP-1 o análogo de él.

En ciertas modalidades, Y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14, SEQ

570

ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En otras modalidades, Y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

En otras modalidades, la fusión de fármaco contiene las fracciones X' y Y', en donde X' es un fármaco de polipéptido, con la condición de que X' no contenga una cadena de anticuerpo o un fragmento de una cadena de anticuerpo; y Y' es un fragmento de enlace a antígeno de cadena simple, de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero. Preferiblemente, Y' es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero. Más preferiblemente, Y' es un dAb (por ejemplo, un V_H, $V\kappa$ o V_λ) que enlaza a albúmina de suero humana. X' se puede ubicar amino terminalmente con respecto a Y', o Y' se puede ubicar amino terminalmente con respecto a X'.

En algunas modalidades, X' y Y' están separados por un aminoácido, o por un péptido o enlazante polipéptido que contiene desde dos hasta aproximadamente 100 aminoácidos. En una modalidad particular, X' es GLP-1 o derivado de GLP-1 humano o análogos de ellos.

En ciertas modalidades, Y' contiene una secuencia de

aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En otras modalidades, Y' contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

En modalidades particulares, la fusión de fármaco contiene un dAb que se une a albúmina de suero e IL-1ra humana (por ejemplo, SEQ ID NO: 28). Preferiblemente, el dAb se enlaza a albúmina de suero humana y contiene regiones de entramado humanas.

En otras modalidades, la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene una variante funcional de IL-1ra humana que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la forma madura de 152 aminoácidos de la IL-1ra humana y antagoniza al receptor de tipo 1 de interleucina 1. (Véase Eisenberg *et al.*, *Nature* 343:341-346 (1990)). La variante puede contener uno o más aminoácidos adicionales (por ejemplo, contener 153 o 154 o más aminoácidos).

Las fusiones de fármaco de la invención se pueden producir usando cualquier método apropiado. Por ejemplo, algunas

modalidades se pueden producir mediante la inserción de un ácido nucleico que codifica la fusión de fármaco en un vector de expresión apropiado. Luego se introduce la construcción resultante en una célula hospedera apropiada para la expresión. Con la expresión, se puede aislar la proteína de fusión o purificarse a partir de un lisado celular o preferiblemente del medio de cultivo o periplasma, usando cualquier método apropiado. (Véase por ejemplo, *Current Protocols in Molecular Biology* (Ausubel, RM. *et al*, eds., Vol. 2, Suppl. 26, pp. 16.4.1-16.7.8 (1991)).

En una modalidad adicional la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene un agente insulinotrópico, en una modalidad preferida la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene GLP-1, o un análogo o péptido de GLP-1. En una modalidad más preferida, la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene Ser^8GLP-1 (7-36) amida.

En una modalidad adicional, la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene un análogo de GLP-1 que tiene una o más de las siguientes sustituciones: Val^8 o Pro^9.

Preferiblemente, el análogo de GLP-1 es Pro^9GLP-1 (7-36) o Pro^9GLP-1 (7-37). Adicionalmente, el análogo o péptido de GLP-1 puede incluir cualquiera de las siguientes extensiones de terminal C: PSS, PSSGAP o PSSGAPPPS.

En otra modalidad, la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene un análogo de GLP-1 que contiene la secuencia de la Fórmula I.

His^{7}-Xaa^{8}-Xaa^{9}-Gly^{10}-Xaa^{11}-Phe^{12}-Thr^{13}-Xaa^{14}-Asp^{15}-Xaa^{16}-Xaa^{17}-Xaa^{18}-Xaa^{19}-Xaa^{20}-Xaa^{21}-Xaa_{22}-Xaa^{23}-Xaa^{24}-Xaa^{25}-Xaa^{26}-Xaa^{27}-Phe^{28}-Ile^{29}-Xaa^{30}-Xaa^{31}-Xaa^{32}-Xaa^{33}-Xaa^{34}-Xaa^{35}-Xaa^{36}-Xaa^{37}-Xaa^{38}-Xaa^{39}-Xaa^{40}-Xaa^{41}-Xaa^{42}-Xaa^{43}-Xaa^{44}-Xaa^{45}

Formula I - SEQ ID NO:172

en donde:

Xaa en la posición 8 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 9 es Glu, o Asp;

Xaa en la posición 11 es Thr, Ala, Gly, Ser, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 14 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Iie, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 16 es Val, Ala, Gly, Ser, Thr,. Leu, Ile, Tyr, Glu, Asp, Trp, o Lys;

Xaa en la posición 17 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 18 es Ser, Ala, Gly, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, Trp, Tyr, o Lys;

Xaa en la posición 19 es Tyr, Phe, Trp, Glu, Asp, Gln, o Lys; Xaa en la posición 20 es Leu,

Ala, Gly, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, Met, Trp, Tyr, o Lys; Xaa en la posición 21 es Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 22 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

574

Xaa en la posición 23 es Gln, Asn, Arg, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 24 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Arg, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 25 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 26 es Lys, Arg, Gln, Glu, Asp, o His;

Xaa en la posición 27 es Leu, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 30 es Ala, Gly, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 31 es Trp, Phe, Tyr, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 32 es Leu, Gly, Ala, Ser, Thr, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 33 es Val, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 34 es Asn, Lys, Arg, Glu, Asp, o His;

Xaa en la posición 35 es Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys;

Xaa en la posición 36 es Gly, Arg, Lys, Glu, Asp, o His;

Xaa en la posición 37 es Pro, Gly, Ala, Ser, Thr, Leu, Ile, Val, Glu, Asp, o Lys, o está eliminada;

Xaa en la posición 38 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, o His, o está eliminada;

Xaa en la posición 39 es Ser, Arg, Lys, Glu, Asp, o His, o está eliminada;

Xaa en la posición 40 es Gly, Asp, Glu, o Lys, o está

eliminada;

Xaa en la posición 41 es Ala, Phe, Trp, Tyr, Glu, Asp, o Lys, o está eliminada;

Xaa en la posición 42 es Ser, Pro, Lys, Glu, o Asp, o está eliminada;

Xaa en la posición 43 es Ser, Pro, Glu, Asp, o Lys, o está eliminada;

Xaa en la posición 44 es Gly, Pro, Glu, Asp, o Lys, o está eliminada; y

Xaa en la posición 45 es Ala, Ser, Val, Glu, Asp, o Lys, o está eliminada;

siempre que cuando el aminoácido en la posición 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, o 44 esté eliminado, entonces cada corriente de aminoácido de ese aminoácido también esté eliminada.

En otra modalidad la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene un análogo de GLP-1 que contiene la secuencia de aminoácidos de la fórmula (II):

Xaa^{7}-Xaa^{8}-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Xaa^{16}-Ser-Xaa^{18}-Xaa^{19}-Xaa^{20}-Glu-Xaa^{22}-Xaa^{23}-Ala-Xaa^{25}-Xaa^{26}-Xaa^{27}-Phe-Ile-Xaa^{30}-Trp-Leu-Xaa^{33}-Xaa^{34}-Xaa^{35}-Xaa^{36}-Xaa^{37}-Xaa^{38}-Xaa^{39}-Xaa^{40}-Xaa^{41}-Xaa^{42}-Xaa^{43}-Xaa^{44}-Xaa^{45}-Xaa^{46}

Formula (II) - SEQ ID NO: 173

en donde Xaa7 es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, (3-hidroxi-histidina, homohistidina, Nα-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-

piridilalanina o 4-piridilalanina;

Xaa8 es Ala, Gly, Val, Leu, He, Lys, Aib, ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;

Xaa^{16} es Val o Leu;

Xaa^{18} es Ser, Lys o Arg;

Xaa^{19} es Tyr o Gln ;

Xaa^{20} es Leu o Met;

Xaa^{22} es Gly, Glu o Aib;

Xaa^{23} es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa^{25} es Ala o Val;

Xaa^{26} es Lys, Glu o Arg;

Xaa^{27} es Glu o Leu;

Xaa^{30} es Ala, Glu o Arg;

Xaa^{33} es Val o Lys;

Xaa^{34} es Lys, Glu, Asn o Arg;

Xaa^{35} es Gly o Aib;

Xaa^{36} es Arg, Gly o Lys;

Xaa^{37} es Gly, Ala, Glu, Pro, Lys, amida o está ausente;

Xaa^{38} es Lys, Ser, amida o está ausente.

Xaa^{39} es Ser, Lys, amida o está ausente;

Xaa^{40} es Gly, amida o está ausente;

Xaa^{41} es Ala, amida o está ausente;

Xaa^{42} es Pro, amida o está ausente;

Xaa^{43} es Pro, amida o está ausente;

Xaa^{44} es Pro, amida o está ausente;

Xaa^{45} es Ser, amida o está ausente;

Xaa^{46} es amida o está ausente; siempre que si Xaa^{38}, Xaa^{39}, Xaa^{40}, Xaa^{41}, Xaa^{42}, Xaa^{43}, Xaa^{44}, Xaa^{45} o Xaa^{46} está ausente, entonces también está ausente cada corriente de residuo de aminoácido.

En otra modalidad de la invención, la fusión de fármaco o conjugado de fármaco contiene un péptido GLP-1 que contiene la secuencia de aminoácidos de formula (III):

Xaa^{7}-Xaa^{8}-Glu-Gly-Thr-Phe-Thr-Ser-Asp-Val-Ser-Xaa^{18}-Tyr-Leu-Glu-Xaa^{22}-Xaa^{23}-Ala-Ala-Xaa^{26}-Glu-Phe-Ile-Xaa^{30}-Trp-Leu-Val-Xaa^{34}-Xaa^{35}-Xaa^{36}-Xaa^{37}-Xaa^{38}

Formula (III) - SEQ ID NO: 174

En donde

Xaa^{7} es L-histidina, D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, N'1-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina o 4-piridilalanina;

Xaa^{8} es Ala, Gly, Val, Leu, He, Lys, ácido α-aminoisobutírico (Aib), ácido (1-aminociclopropil)carboxílico, ácido (1-aminociclobutil)carboxílico, ácido (1-aminociclopentil)carboxílico, ácido (1-aminociclohexil)carboxílico, ácido (1-aminocicloheptil)carboxílico, o ácido (1-aminociclooctil)carboxílico;

Xaa^{18} es Ser, Lys o Arg;

Xaa^{22} es Gly, Glu o Aib;

Xaa^{23} es Gln, Glu, Lys o Arg;

Xaa^{26} es Lys, Glu o Arg;

Xaa^{30} es Ala, Glu o Arg;

Xaa^{34} es Lys, Glu o Arg;

Xaa^{35} es Gly o Aib;

Xaa es Arg o Lys;

Xaa^{37} es Gly, Ala, Glu o Lys;

Xaa es Lys, amida o está ausente.

En todavía otra modalidad de la invención el péptido GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en: GLP-1 (7-35), GLP-1 (7-36), GLP-1 (7-36)-amida, GLP-1 (7- 37), GLP-1 (7-38), GLP-1 (7-39), GLP-1 (7- 40), GLP-1 (7-41) o un análogo o péptido de ellos.

En todavía otra modalidad de la invención, el péptido GLP-1 es GLP-1 (A-B) en donde A es un entero desde 1 hasta 7 y B es un entero desde 37 hasta 45 o un análogo de él que contiene un residuo de enlace a albúmina unido por medio de un separador hidrofílico al residuo de aminoácido en el terminal C y, opcionalmente, un segundo residuo de enlace a albúmina unido a uno de los otros residuos de aminoácido.

En otra modalidad el péptido GLP-1 contiene no más de quince residuos de aminoácido que han sido intercambiados, añadidos o eliminados en comparación con GLP-1 (7- 37) o no más de diez residuos de aminoácido que han sido intercambiados, añadidos o

eliminados en comparación con GLP-1 (7-37).

En otra modalidad el péptido GLP-1 contiene no más de seis (preferiblemente, no más de 5, 4, 3, 2 o 1) residuos de aminoácido que han sido intercambiados, añadidos o eliminados en comparación con GLP-1 (7-37).

En otra modalidad, el péptido GLP-1 contiene no más de 4 preferiblemente, no más de 3, 2 o 1) residuos de aminoácido que no están codificados por el código genético.

En otra modalidad, el péptido GLP-1 es un péptido GLP-1 protegido con DPPIV.

En otra modalidad, el agente insulinotrópico es DPPIV estabilizado.

En otra modalidad, el péptido GLP-1 contiene un residuo de ácido α-aminoisobutírico (Aib) en la posición 8.

En otra modalidad, el residuo de aminoácido en la posición 7 de dicho péptido GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en D-histidina, desamino-histidina, 2-amino-histidina, β-hidroxi-histidina, homohistidina, Nα-acetil-histidina, α-fluorometil-histidina, α-metil-histidina, 3-piridilalanina, 2-piridilalanina y 4- piridilalanina.

En otra modalidad el péptido GLP-1 se selecciona del grupo que consiste en: Arg^{34}GLP-1 (7-37), $Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38)-OH, $Lys^{36}Arg^{26,34}$GLP-1 (7-36), $Aib^{8,22,35}$ GLP-1 (7-37), $Aib^{8,35}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8,22}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1(7-38), $Aib^{8,22}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38),

$Aib^{8,35}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Arg^{26}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,35}Arg^{26}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22}Arg^{26}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Arg^{34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,35}Arg^{34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22}Arg^{34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Ala^{37}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,35}Ala^{37}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22}Ala^{37}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Lys^{37}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8,35}Lys^{37}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8}Arg^{26,34}Glu^{22,23,30}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1(7-38), GLP-1 (7-37)amida, GLP-1 (7-37) amida, $Aib^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-37), $Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-37), $Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-37), $Aib^{8,35}Lys^{37}$GLP-1 (7-37)-OH, $Ala^{8}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8,22,35}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), $Aib^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-36), $Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{36}$GLP-1 (7-37)-OH, $Aib^{8,22,35}Lys^{37}$GLP-1 (7-37)-NH_2, $Aib^{8}Arg^{34}$GLP-1 (7-37)-OH, $Gly^{8}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), Arg^{34}GLP-1 (7-37)-OH, $Gly^{8}Glu^{22,23,30}Arg^{18,26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), ácido imidazolilpropiónico $^{7}Asp^{18}Aib^{22,35}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), ácido imidazolil-propiónico$^{7}Aib^{22,35}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), [3-(5-imidazoil)-propionil$^{7}Aib^{8}Arg^{26,34}Lys^{38}$GLP-1 (7-38), y $Aib^{8,22}Lys^{37}$GLP-1 (7-38).

En otra modalidad, el péptido GLP-1 está unido a un separador hidrofílico por medio del residuo de aminoácido en la posición 23, 26, 34, 36 o 38 del GLP-1 natural o GLP-1 análogo.

En otra modalidad el agente insulinotrópico es Lys^{20}exendina 4(1-39)-NH_2.

En otra modalidad el péptido GLP-1 es

581

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK -amida - SEQ ID NO: 175.

En otra modalidad el péptido GLP-1 es

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGX - SEQ ID NO: 176

en donde X = P o Y, o un fragmento o un análogo de él.

En otra modalidad de la invención, el péptido GLP-1 es Arg^{18}, Leu^{20}, Gln^{34}, Lys^{33} (Nϵ-(γ-aminobutiroil(Nα-hexadecanoil)))Exendin-4-(7-45)-amida o Arg^{33}, Leu^{20}, Gln^{34}, Lys^{18} (Nϵ-(γ-aminobutiroil(Nα-hexadecanoil)))Exendin-4-(7-45)-amida.

Los ejemplos de agentes insulinotrópicos que pueden ser útiles como análogos de GLP-1 o derivados o fármacos similares a GLP-1 de acuerdo con la presente invención, se describen en la solicitud de patente internacional No. WO 87/06941 (The General Hospital Corporation), la cual se refiere a un fragmento de péptido que contiene GLP-1 (7-37) y derivados funcionales de él, y a su uso como un agente insulinotrópico (incorporada aquí mediante referencia, particularmente a manera de ejemplos de fármacos para su uso en la presente invención).

Otros análogos de GLP-1 se describen en la solicitud de patente internacional No. 90/11296 (The General Hospital Corporation), la cual se refiere un fragmento de péptidos que contiene GLP-1 (7-36) y derivados funcionales de él, y que tiene una actividad insulinotrópica que sobrepasa la actividad insulinotrópica de GLP-1 (1-36) o GLP-1 (1-37) y a su uso como agentes insulinotrópicos (incorporada aquí mediante referencia,

particularmente a manera de ejemplos de fármacos para su uso en la presente invención).

La solicitud de patente internacional No. WO 91/11457 (Buckley *et al.*.) describe análogos de los péptidos activos GLP-1 7-34, 7-35, 7-36, y 7-37 que también pueden ser útiles como fármacos de GLP-1 de acuerdo con la presente invención (incorporada aquí mediante referencia, particularmente a manera de ejemplos de fármacos para su uso en la presente invención).

Otros análogos de exendina que son útiles para la presente invención se describen en las publicaciones de patente del TCP WO 99/25728 (Beeley *et al.*), WO 99/25727 Beeley *et al.*), WO 98/05351 (Young *et al.*), WO 99/40788 (Young *et al.*), WO 99/07404 (Beeley *et al.*), y WO 99/43708 (Knudsen *et al*) (todas incorporadas aquí mediante referencia, particularmente a manera de ejemplos de fármacos para su uso en la presente invención).

Los vectores de expresión apropiados pueden contener una cantidad de componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de expresión, tales como un elemento de control de transcripción (por ejemplo, promotor, potenciador, terminador), y/o una o más señales de traducción, una secuencia señal o secuencia conductora, y similares. Los elementos de control de expresión y una secuencia señal, si están presentes, pueden ser proporcionados por el vector o por otra fuente. Por ejemplo, se puede usar secuencias de control transcripcional y/o traduccional de un ácido nucleico clonado que

codifica una cadena de anticuerpo para dirigir la expresión.

Se puede proporcionar un promotor para expresión en una célula hospedera deseada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede estar ligado operativamente a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, cadena de anticuerpo o porción de ella, de tal forma que dirija la transcripción del ácido nucleico. También está disponible una variedad de huéspedes apropiados para el promotor procariótico (por ejemplo, lac, tac, T3, T7 promotores para *E. coli*) y eucariótico (por ejemplo, promotor temprano o tardío de virus de simio 40, promotor tardío de adenovirus).

Además, los vectores de expresión típicamente incluyen un marcador seleccionable para la selección de células hospederas portadoras del vector, y en el caso de un vector de expresión replicable, un origen o replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o al fármaco son marcadores seleccionables comunes, y se pueden utilizar en células procarióticas (por ejemplo, gen lactamasa (resistencia a ampicilina), gen *Tet* para resistencia a tetraciclina) y en células eucarióticas (por ejemplo, neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, o genes de resistencia a la higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de huéspedes. Los genes que codifican el producto genético de marcadores auxotróficos del huésped (por ejemplo, *LEU2, URA3, HIS3*) con frecuencia se usan como

marcadores seleccionables en levadura. El uso de vectores virales (por ejemplo, baculovirus) o vectores de fagos, y de vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula hospedera, tales como vectores retrovirales, también están contemplados. Los vectores de expresión apropiados para su expresión en células procarióticas (*E. coli*), células de insecto (células de Drosophila Schnieder S2, Sf9) y levadura (*P. methanolica, P. pastoris, S. cerevisiae*) son bien conocidos en la técnica.

Se proporciona células hospederas recombinantes que expresan una fusión de fármaco y un método para preparar una fusión de fármaco como se describe aquí. La célula hospedera recombinante contiene un ácido nucleico recombinante que codifica una fusión de fármaco. Las fusiones de fármaco se pueden producir mediante la expresión de un ácido nucleico recombinante que codifica la proteína en una célula hospedera apropiada, o usando otros métodos apropiados. Por ejemplo, las construcciones de expresión descritas aquí pueden ser introducidas en una célula hospedera apropiada, la célula resultante se puede mantener (por ejemplo, en cultivo, en un animal) bajo condiciones apropiadas para la expresión de las construcciones. Las células hospederas apropiadas pueden ser procarióticas, incluyendo células bacterianas tales como las de *E. coli, B. subtilis* y/u otras bacterias apropiadas; eucarióticas, tales como células de hongos y de levaduras (por ejemplo, de *Pichia pastoris, Aspergillus species, Saccharomyces cerevisiae, Schizosaccharomyces pombe, Neurospora crassa*), u

otras células eucarióticas inferiores, y células de eucariotas superiores, tales como las de insectos (por ejemplo, células de insecto Sf9 (WO 94/26087 (O'Connor)) o de mamíferos (por ejemplo, células COS, como COS-1 (Número de acceso a ATCC CRL-1650) y COS-7 (Número de acceso a ATCC CRL-1651), CHO (por ejemplo, Número de acceso a ATCC CRL-9096), 293 (Número de acceso a ATCC CRL- 1573), HeLa (Número de acceso a ATCC CCL-2), CV1 (Número de acceso a ATCC CCL-70), WOP (Dailey *et al*, *J. Virol.* 54:739-749 (1985)), 3T3, 293T (Pear *et al*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 90:8392-8396 (1993)), células NSO, SP2/0, células HuT 78, y similares (véase por ejemplo, Ausubel, F.M. *et al*, eds. *Current Protocols in Molecular Biology*, Greene Publishing Associates y John Wiley & Sons Inc., (1993)).

La invención también incluye un método para producir una fusión de fármaco, que comprende mantener una célula hospedera recombinante de la invención bajo condiciones apropiadas para la expresión de una fusión de fármaco. El método puede comprender además el paso de aislar o recubrir la fusión de fármaco, si se desea, en otra modalidad, los componentes de la fusión de fármaco (por ejemplo, dAb que se une a albúmina de suero humana y IL-1ra) están ensamblados químicamente para crear una cadena continua de polipéptido.

Conjugados

En otro aspecto, la invención proporciona conjugados que contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que

se une a albúmina de suero que se une a un fármaco. Estos conjugados incluyen "conjugados de fármaco", que contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, a la cual está unido un fármaco de manera covalente, y "conjugados de fármaco no covalentes", los cuales contienen un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, al cual está unido un fármaco de manera no covalente.

Preferiblemente, los conjugados son lo suficientemente estables como para que el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero y el fármaco permanezcan sustancialmente unidos (ya sea covalente o no covalentemente) uno al otro bajo condiciones *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano). Preferiblemente, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 15%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, o sustancialmente ninguno de los conjugados se disocia o se divide para liberar el fármaco y fragmento de enlace a antígeno bajo condiciones *in vivo*. Por ejemplo, la estabilidad bajo condiciones "*in vivo*" puede evaluarse convenientemente incubando conjugado de fármaco o conjugado de fármaco no covalente durante 24 horas en

suero (por ejemplo, suero humano) a 37 °C. En un ejemplo este método, cantidades iguales de un conjugado de fármaco y el fármaco no conjugado se diluyen en dos frascos de suero diferentes. La mitad del contenido de cada frasco se congela inmediatamente a -20 °C, y la otra mitad se incuba durante 24 horas a 37 °C. Luego se puede analizar las cuatro muestras usando cualquier método apropiado, tal como SDS-PAGE y/o detección Western. Las detecciones Western se pueden sensibilizar usando un anticuerpo que se une al fármaco. Todos los fármacos en las líneas de conjugado de fármaco correrán al tamaño del conjugado de fármaco si no hubiera disociación. Se puede usar muchos otros métodos apropiados para evaluar la estabilidad bajo condiciones "*in vivo*", por ejemplo, analizando muestras preparadas como se describió anteriormente aquí, usando métodos analíticos, tales como cromatografía (por ejemplo, de filtración en gel, de intercambio iónico, y de fase inversa), ELISA, espectroscopía de masa y similares.

Conjugados de fármaco

En otro aspecto, la invención proporciona un conjugado de fármaco que contiene un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, y un fármaco que está unido covalentemente a dicho fragmento de enlace a antígeno, con la condición de que el conjugado de fármaco no esa una sola cadena de polipéptido continua.

En algunas modalidades, el conjugado de fármaco contiene un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que

tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, y un fármaco que está unido covalentemente a dicho VH o V_L, con la condición de que el conjugado de fármaco no sea una sola cadena de polipéptido continua. Preferiblemente, el conjugado de fármaco contiene un solo V_H que se une a albúmina de suero o un solo V_L que se une a albúmina de suero. En ciertas modalidades, el conjugado de fármaco contiene un dAb $V\kappa$ que se une a albúmina de suero humana y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26. En otras modalidades, el conjugado de fármaco contiene un dAb V_H que se une a albúmina de suero humana y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO:16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

Los conjugados de fármaco pueden contener cualquier fármaco deseado, y se pueden preparar usando cualesquiera métodos apropiados. Por ejemplo, el fármaco puede unirse al fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero directamente o indirectamente a través de una fracción enlazante apropiada en una o más posiciones, tal como el terminal amino, el terminal carboxilo o a través de cadenas laterales de aminoácidos.

En una modalidad, el conjugado de fármaco contiene un dAb que se une a albúmina de suero humana y un fármaco de polipéptido (por ejemplo, IL-1ra humana o una variante funcional de IL-1ra humana), y el terminal amino del fármaco polipéptido (por ejemplo, IL-1ra humana o una variante funcional de IL-1ra humana) está unido al terminal carboxilo del dAb directamente o a través de una fracción enlazante apropiada. En otra modalidad, el conjugado de fármaco contiene un dAb que se une a albúmina de suero humana y un fármaco insulinotrópico (por ejemplo, GLP-1 o un análogo de GLP-1) y el terminal amino del fármaco insulinotrópico es libre (es decir no está acoplado o enlazado en el conjugado) y el terminal carboxilo está unido al terminal amino del dAb directamente o a través de una fracción enlazante apropiada.

En otras modalidades, el conjugado de fármaco contiene un dAb que se une a albúmina de suero humana y dos o más fármacos diferentes que están unidos covalentemente al dAb. Por ejemplo, un primer fármaco puede estar unido covalentemente (directamente o indirectamente) al terminal carboxilo del dAb y un segundo fármaco puede estar unido covalentemente (directamente o indirectamente) al terminal amino o a través de un grupo amino de cadena lateral (por ejemplo, un grupo amino de lisina). En una modalidad preferida el terminal amino del fármaco insulinotrópico (por ejemplo GLP-1 o un análogo de GLP-1) es libre. Estos conjugados de fármaco se pueden preparar usando métodos bien conocidos de acoplamiento selectivo. (Véase por ejemplo, Hermanson, G.T., *Bioconjugate Techniques*,

Academic Press: San Diego, CA (1996).)

Se puede usar una variedad de métodos para conjugar fármacos a un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero. El método particular seleccionado dependerá del fármaco que va a ser conjugado. Si se desea, se puede utilizar enlazantes que contengan grupos funcionales terminales para enlazar el fragmento de enlace a antígeno y el fármaco. Generalmente, la conjugación se lleva a cabo haciendo reaccionar un fármaco que contiene a grupo funcional reactivo (o que está modificado para que contenga un grupo funcional reactivo) con un enlazante, o directamente con un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero. Los enlaces covalentes se forman haciendo reaccionar un fármaco que contiene (o o que está modificado para que contenga) una fracción química o grupo funcional que puede reaccionar, bajo condiciones apropiadas, con un segundo grupo químico, formando así un enlace covalente. Si se desea, se puede añadir un grupo químico reactivo apropiado al fragmento de enlace a antígeno o a un enlazante usando cualquier método apropiado. (Véase por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996).) Muchas combinaciones apropiadas de grupos químicos reactivos son conocidas en la técnica, por ejemplo un grupo amina puede reaccionar con un grupo electrofílico tal como tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, fluoro, yodo), éster N-hidroxisuccinimidílico (NHS), y similares. Los tioles

pueden reaccionar con maleimida, yodoacetilo, acrilolilo, piridil disulfuros, ácido 5-tiol-2-nitrobenzoico tiol (TNB-tiol), y similares. Un grupo funcional aldehído puede estar acoplado a moléculas que contienen amina o hidrazida, y un grupo azida puede reaccionar con un grupo fosforoso trivalente para formar enlaces fosforamidato o fosforimida. Los métodos apropiados para introducir grupos activadores en móleculas son conocidos en la técnica. (Véase, por ejemplo, Hermanson, G. T., *Bioconjugate Techniques*, Academic Press: San Diego, CA (1996)).

En algunas modalidades, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero está unido a un fármaco mediante reacción de dos tioles para formar un enlace disulfuro. En otras modalidades, el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero está unido a un fármaco mediante reacción de un grupo isotiocianato y una amina primaria para producir una unión isotiourea.

Las fracciones enlazantes apropiadas pueden ser lineales o ramificadas, e incluyen, por ejemplo, tetraetilen glicol, C_2-C_{12} alquileno, -NH-$(CH_2)_p$-NH- o -$(CH_2)_p$-NH- (en donde p es desde uno hasta doce), -CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH_2-CH_2-O-CH-NH-, una cadena de polipéptido que contiene desde uno hasta aproximadamente 100 (preferiblemente desde uno hasta aproximadamente 12) aminoácidos y similares.

Conjugado de fármaco no covalentes

Algunos enlaces no covalentes (por ejemplo, enlaces hidrógeno, interacciones de van der Waals) pueden producir conexiones intermoleculares estables, altamente específicas. Por ejemplo, las interacciones de reconocimiento molecular logradas a través de múltiples enlaces no covalentes entre compañeros de enlace complementarios, apoyan muchas interacciones biológicas importantes, tales como el enlace de enzimas a sus sustratos, el reconocimiento de antígenos por los anticuerpos, la unión de ligandos a sus receptores, y la estabilización de la estructura tridimensional de proteinas y péptidos. De acuerdo con esto, estas interacciones débiles no covalentes (por ejemplo, unión hidrógeno, interacciones de van Der Waals, interacciones electrostáticas, interacciones hidrofóbicas y similares) se pueden utilizar para enlazar un fármaco al fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero.

Preferiblemente, la unión no covalente que enlaza el fragmento de enlace a antígeno y el fármaco es de resistencia suficiente como para que el fragmento de enlace a antígeno y el fármaco permanezcan sustancialmente unidos uno al otro bajo condiciones *in vivo* (por ejemplo, cuando se administra a un ser humano). Generalmente, la unión no covalente que enlaza el fragmento de enlace a antígeno y el fármaco tiene una resistencia de al menos aproximadamente $10^{10}M^{-1}$.

En modalidades preferidas, la resistencia de la unión no covalente es de al menos aproximadamente $10^{11}M^{-1}$, al menos

aproximadamente $10^{12}M^{-1}$, al menos aproximadamente 10^{13} M^{-1} al menos aproximadamente $10^{14}M^{-1}$ o al menos aproximadamente $10^{15}M^{-1}$. Se sabe que las interacciones entre biotina y avidina y entre biotina y estreptavidina son muy eficientes y estables bajo muchas condiciones, y como se describe aquí, se puede utilizar enlaces no covalentes entre biotina y avidina o entre biotina y estreptavidina para preparar un conjugado de fármaco no covalente de la invención.

La unión no covalente se puede formar directamente entre el fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene una especificidad para albúmina de suero y fármaco, o se puede formar entre compañeros de enlace complementarios apropiados (por ejemplo, biotina y avidina o estreptavidina) en donde un compañero está unido covalentemente al fármaco y el compañero de enlace complementario está unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno. Cuando se emplea compañeros de enlace complementarios, uno de los compañeros de enlace puede estar unido covalentemente al fármaco directamente o a través de una fracción enlazante apropiada, y el compañero de enlace complementario puede estar unido covalentemente al fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero directamente o a través de una fracción enlazante apropiada.

Los compañeros de enlace complementarios son pares de moléculas que se unen selectivamente uno al otro. Muchos compañeros de enlace complementarios son conocidos en la técnica, por ejemplo, anticuerpo (o un fragmento de enlace a antígeno de él)

y su antígeno o epítopo cognado, enizmas y sus sustratos, y receptores y sus ligandos. Los compañeros de enlace complementarios preferidos son biotina y avidina, y biotina y estreptavidina.

La unión covalente directa o indirecta de un miembro de un par de enlace complementario a un fragmento de enlace a antígeno que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero o un fármaco, se puede realizar como se describió anteriormente, por ejemplo, haciendo reaccionar a compañero de enlace complementario que contiene un grupo funcional reactivo (o que está modificado para que contenga un grupo funcional reactivo) con un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, con o sin el uso de un enlazante. El método particular seleccionado dependerá de los compuestos (por ejemplo, fármaco, compañero de enlace complementario, fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero) que van a ser conjugados. Si se desea, se puede utilizar enlazantes (por ejemplo, enlazantes homobifuncionales, enlazantes heterobifuncionales) que contengan un grupo funcional terminal reactivo para ligar el fragmento de enlace a antígeno y/o el fármaco a un compañero de enlace complementario.

En una modalidad, se puede utilizar un enlazante heterobifuncional que contiene dos fracciones reactivas distintas. El enlazante heterobifuncional se puede seleccionar de tal forma que una de las fracciones reactivas reaccionará con el fragmento de

enlace a antígeno de un anticuerpo que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero o el fármaco, y la otra fracción reactiva reaccionará con el compañero de enlace complementario. Se puede utilizar cualquier enlazante apropiado (por ejemplo, enlazante heterobifuncional), y muchos de estos enlazantes se conocen en la técnica y están disponibles en fuentes comerciales (por ejemplo, Pierce Biotechnology, Inc., IL).

Composiciones y métodos terapéuticos y de diagnóstico

Se proporciona composiciones que contienen composiciones de fármacos de la invención (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco), incluyendo composiciones farmacéuticas o fisiológicas (por ejemplo, para administración humana y/o veterinaria). Las composiciones farmacéuticas o fisiológicas contienen una o más composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco), y un portador aceptable farmacéutica o fisiológicamente. Típicamente, estos portadores soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, incluyendo salina y/o medio tamponado. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y lactado de Ringer. Los adyuvantes apropiados, aceptables fisiológicamente, si son necesarios para mantener un complejo de polipéptidos en suspensión, pueden escogerse de espesantes, tales como carboximetilcelulosa, polivinil pirrolidona, gelatina y alginatos. Los

vehículos intravenosos incluyen reabastecedores de nutrientes y reabastecedores de electrolitos, tales como los que se basan en dextrosa de Ringer. También pueden estar presentes conservadores y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelatantes y gases inertes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16a. Edición).

Las composiciones pueden contener una cantidad deseada de composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco). Por ejemplo las composiciones pueden contener aproximadamente 5% hasta aproximadamente 99% de conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente o fusión de fármaco por peso. En modalidades particulares, la composición puede contener desde aproximadamente 10% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 20% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 30% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 40% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 50% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 60% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 70% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 80% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 90% hasta aproximadamente 99%, o desde aproximadamente 95% hasta aproximadamente 99% de composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco), por peso. En un ejemplo, la composición es secada por

congelación (liofilizada).

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco), descritas aquí, típicamente encontrarán uso en prevenir, suprimir o tratar estados inflamatorios (por ejemplo, enfermedades inflamatorias agudas y/o crónicas), tales como enfermedad pulmonar obstructiva crónica (por ejemplo, bronquitis crónica, bronquitis obstructiva crónica, enfisema), hipersensibilidad alérgica, cáncer, infección bacteriana o viral, neumonía, tal como neumonía bacteriana (por ejemplo, neumonía estafilocócica)), trastornos autoinmunitarios (los cuales incluyen, sin limitarse a ellos, diabetes de tipo 1, esclerosis múltiple, artritis (por ejemplo, osteoartritis, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriásica, lupus artrítico, espondiloartropatía (por ejemplo, espondilitis anquilosante)), lupus eritematoso sistémico, enfermedad inflamatoria intestinal (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerosa), síndrome de Behcet y miastenia gravis), endometriosis, psoriasis, adhesiones abdominales (por ejemplo, cirugía post abdominal), asma, y choque séptico.

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco), descritas aquí, se pueden utilizar para prevenir, suprimir o tratar dolor, tal como dolor traumático crónico o agudo, dolor neuropático crónico o agudo, dolor musculo esquelético crónico o agudo, dolor canceroso crónico o agudo y similares. Las

composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugado de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco), descritas aquí también se pueden administrar para propósitos terapéuticos.

Los cánceres que pueden ser prevenidos, suprimidos o tratados usando las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco), descritos aquí, incluyen linfomas (por ejemplo, linfoma de células B, linfoma mieloide agudo, linfoma de Hodgkin, linfoma que no es de Hodgkin), mielomas (por ejemplo, mieloma múltiple), cáncer de pulmón (por ejemplo, carcinoma pulmonar de células pequeñas, carcinoma pulmonar de células no pequeñas), cáncer colorectal, cáncer de cabeza y cuello, cáncer pancreático, cáncer hepático, cáncer de estómago, cáncer de mama, cáncer ovárico, cáncer de vejiga, leucemias (por ejemplo, leucemia mielogenosa aguda, leucemia mielogenosa crónica, leucemia linfocítica aguda, leucemia linfocítica crónica, adrenocarcinomas, cáncer renal, cánceres hematopoyéticos (por ejemplo, síndrome mielodisplásico, trastorno mieloproliferativo (por ejemplo, vera policitemia, trombocitemia esencial (o primaria), mielofibrosis idiopática), y similares.

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) descritas aquí también son apropiadas para su uso en prevenir, suprimir o tratar endometriosis, fibrosis, infertilidad, parto prematuro, disfunción eréctil, osteoporosis, diabetes (por ejemplo, diabetes de

tipo II), trastornos de crecimiento, infección por VIH, síndrome de distensión respiratoria, tumores e incontinencia nocturna.

En una modalidad preferida, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hiperglicemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, (apoptosis de células β, deficiencia de células β, infarto al miocardio, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia, trastornos cognitivos, por ejemplo mejoramiento cognitivo, neuroprotección, ateroesclerosis, enfermedad cardiaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares. En modalidades específicas para estas indicaciones, el fármaco se selecciona de un agente insulinotrópico, e incretina, un péptido 1 similar al glucagón, un péptido GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, PYY, un péptido PYY, un análogo de PYY, un derivado de PYY, exendina 3, un péptido exendina 3, un análogo de exendina 3, un derivado de exendina 3, exendina 4, un péptido exendina 4, un análogo de exendina 4, un derivado de exendina 4 o una combinación de dos o más de estos (por ejemplo, péptido GLP-1 y un péptido PYY).

En otra modalidad, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de síndrome de intestino pequeño, síndrome inflamatorio intestinal o enfermedad de Crohn. En modalidades específicas para estas indicaciones, el fármaco se

600

selecciona de un agente insulinotrópico, e incretina, un péptido 1 similar al glucagón, un péptido GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, PYY, un péptido PYY, a análogo de PYY, un derivado de PYY, exendina 3, un péptido exendina 3, un análogo de exendina 3, un derivado de exendina 3, exendina 4, un péptido exendina 4, un análogo de exendina 4, un derivado de exendina 4 o una combinación de dos o más de estos (por ejemplo, péptido GLP-1 y un péptido PYY).

En otra modalidad, la presente invención se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la invención para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hiperglicemia, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 o deficiencia de células β.

En modalidades específicas para estas indicaciones, el fármaco se selecciona de un agente insulinotrópico, e incretina, un péptido 1 similar al glucagón, un péptido GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, PYY, un péptido PYY, a análogo de PYY, un derivado de PYY, exendina 3, un péptido exendina 3, un análogo de exendina 3, un derivado de exendina 3, exendina 4, un péptido exendina 4, un análogo de exendina 4, un derivado de exendina 4 o una combinación de dos o más de estos (por ejemplo, péptido GLP-1 y un péptido PYY).

El tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente invención también se puede combinar con una segunda o más sustancias activas farmacológicamente, que pueden o no ser parte del conjugado o fusión de fármaco . Por ejemplo, un ingrediente

activo seleccionado de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensores, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones resultantes de o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos resultantes de o asociados con obesidad. En el contexto de la presente la expresión "agente antidiabético" incluye compuestos para el tratamiento y/o profilaxis de resistencia a la insulina y enfermedades en donde la resistencia a la insulina es el mecanismo patofisiológico.

Ejemplos de estas sustancias activas farmacológicamente son: insulina, agonistas de GLP-1, sulfonilureas (por ejemplo tolbutamida, glibenclamida, glipizida y gliclazida), biguanidas, por ejemplo metformina, meglitinidas, inhibidores de glucosidasa (por ejemplo acorbosa), antagonistas de glucagón, inhibidores de DPP-IV (dipeptidil peptidasa IV), inhibidores de enzimas hepáticas involucradas en la estimulación de gluconeogenesis y/o glicogenólisis, moduladores de absorción de glucosa, tiasolidinodionas, tales como troglitazona y ciglitazona, compuestos que modifican el metabolismo de lípidos, tales como agentes antihiperlipidémicos como inhibidores de HMG CoA (estatinas), compuestos que disminuyen la absorción de alimentos, agonistas de RXR y agentes que actúan sobre el canal de potasio dependiente de ATP de las células β, por ejemplo glibenclamida, glipizida, gliclazida y repaglinida; colestiramina, colestipol, clofibrato, gemfibrozil, lovastatina, pravastatina, simvastatina, probucol, dextrotiroxina,

neteglinida, repaglinida; bloqueadores β tales como alprenolol, atenolol, timolol, pindolol, propranolol y metoprolol, ACE (enzima convertidora de angiotensina) inhibidores tales como benazepril, captopril, enalapril, fosinopril, lisinopril, alatriopril, quinapril y ramipril, bloqueadores del canal de calcio, tales como nifedipina, felodipina, nicardipina, isradipina, nimodipina, diltiazem y verapamil, y a-bloqueadores, tales como doxazosin, urapidil, prazosin and terazosin; agonistas de CART (transcripto regulado de cocaína y anfetamina) agonists, antagonistas de NPY (neuropéptido Y), agonistas de MC4 (melanocortina 4), antagonistas de orexina, agonistas de TNF (factor de necrosis tumoral), agonistas de CRF (factor de liberación de corticotropina), antagonistas de CRF BP (proteína enlazadora de factor de liberación de corticotropina) agonistas de urocortina, agonistas de B3, agonistas de MSH (hormona estiuladora de melanocitos), antagonistas de MCH (hormona concentradora de melanocitos), agonistas de CCK (colecistoquinina), inhibidores de reabsorción de serotonina, inhibidores de reabsorción de serotonina y noradrenalina, compuestos mixtos de serotonina y noradrenérgicos, agonistas de 5HT (serotonina), agonistas de bombesina, antagonistas de galanina, hormona del crecimiento, compuestos liberadores de hormona del crecimiento, agonistas de TRH (hormona liberadora de tireotropina), moduladores de UCP 2 o 3 (proteína desacopladora 2 o 3), agonistas de leptina, agonistas de DA (bromocriptina, doprexina), inhibidores de lipasa/amilasa, moduladores de RXR (receptor del retinoide X),

agonistas de TR β, antagonistas de histamina.

Adicionalmente, la insulina puede tener la forma de uno de los siguientes análogos: AspB28-insulina humana, LysB28, ProB29-insulina humana, LysB3 GluB29-insulina humana, GlyA21, ArgB31, ArgB32-insulina humana y des (B30) insulina humana.

Otros fármacos activos adicionales incluyen hormona del crecimiento humana o un análogo de ella, hormona paratiroidea o un análogo de ella, un factor de crecimiento tal como factor de crecimiento derivado de plaquetas (PDGF), factor de crecimiento de transformación α (TGF-α), factor de crecimiento de transformación β (TGF-β), factor de crecimiento epidérmico (EGF), factor de crecimiento endotelial vascular (VEGF), una somatomedina tal como factor de crecimiento I de insulina (IGF-I), factor de crecimiento II de insulina (IFG-II), eritropoyetina (EPO), trombopoyetina (TPO) o angiopoyetina, interferón, prouroquinasa, uroquinasa, activador de plasminógeno tisular (t-PA), inhibidor de activador de plasminógeno 1, inhibidor de activador de plasminógeno 2, factor de von Willebrandt, una citocina, por ejemplo una interleucina, tal como interleucina (IL) 1, IL-1 Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18, IL-20 o IL-21, un factor de estimulación de colonia (CFS) tal como GM-CSF, factor de célula madre, un factor de necrosis tumoral, tal como TNF-α, linfotoxina-α, linfotoxina-β, CD40L, o CD30L, un inhibidor de proteasa, por ejemplo aprotinina, hormona estimuladora de folículo humana o un análogo de ella, una enzima tal como superóxido dismutasa, asparaginasa,

arginasa, arginina desaminasa, adenosina desaminasa, ribonucleasa, catalasa, uricasa, bilirubin oxidasa, tripsina, papaína, fosfatasa alcalina, (3-glucuronidasa, purina nucleósido fosforilas o batroxobina, un opioide, por ejemplo endorfinas, encefalinas u opioides no naturales, una hormona o neuropeptido, por ejemplo calcitonina, glucagón, gastrinas, hormona adrenocorticotrópica (ACTH), colecistoquininas, hormona luteinizante, hormona liberadora de gonadotropina, gonadotropina coriónica, factor de liberación de corticotropina, vasopresina, oxitocina, hormonas antidiuréticas, hormona estimuladora de tiroides, hormona liberadora de tirotropina, relaxina, prolactina, péptido YY, neuropéptido Y, polipéptido pancreático, leptina, CART (transcripto regulado de cocaína y anfetamina), un péptido relacionado con CART, perlipina, melanocortinas, (hormonas estimuladoras de melanocitos), tales como MC-4, hormonas concentradoras de melanina, péptidos natriuréticos, adrenomedulina, endotelina, secretina, amilina, peptido intestinal vasoactivo (VIP), polipéptido activador de adenilato ciclasa pituitaria, CD4 soluble, factor de liberación hipotálmico, melanotoninas y análogos de ellas.

El conjugado de fármaco o fusión de fármaco descrito aquí también se puede administrar para propósitos terapéuticos o como un agente para formación de imágenes.

En la presente solicitud, el término "prevención" implica la administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad. “Supresión” se refiere a la administración de la

composición después de un evento inductivo, pero antes de la aparición clínica de la enfermedad. "Tratamiento" implica la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se hacen manifiestos.

Los sistemas de modelo en animales que se pueden utilizar para explorar la efectividad de las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) para proteger contra la enfermedad o para tratarla, están disponibles. Los métodos para la prueba de lupus eritematoso sistémico (SLE) en ratones susceptibles son conocidos en la técnica (Knight *et al.* (1978) *J. Exp. Med.*, 147: 1653; Reinersten *et al.* (1978) *New Eng. J. Med.*, 299: 515). La miastenia gravis (MG) se somete a prueba en ratones hembras SJL/J induciendo la enfermedad con proteína AchR soluble de otra especie (Lindstrom *et al.* (1988) *Adv. Immunol.*, 42: 233). La artritis es inducida en una cepa de ratones susceptible, mediante inyección de colágeno tipo II (Stuart *et al.* (1984) *Ann. Rev. Immunol.*, 42: 233). Un modelo mediante el cual se induce la artritis en ratas susceptibles mediante inyección de proteína micobacterial de choque térmico, ha sido descrito (Van Eden *et al.* (1988) *Nature*, 331: 171). La efectividad para tratar osteoartritis se puede evaluar en un modelo murino en el cual la artritis es inducida mediante inyección intra articular de colagenasa (Blom, A.B. *et al.*, *Osteoarthritis Cartilague* 12:627-635 (2004). La tiroiditis se induce en ratones mediante administración de tirolglobulina, según se describe (Maron *et al.*

(1980) *J. Exp. Med.,* 152: 1115). La diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) aparece de manera natural o puede ser inducida en ciertas cepas de ratones tales como las descritas por Kanasawa *et al.* (1984) *Diabetologia*, 27: 113. La EAE en ratón y rata sirve como un modelo para la MS en seres humanos. En este modelo, la enfermedad desmielinizante es inducida mediante la administración de proteína básica de mielina (véase Paterson (1986). *Textbook of Immunopathology*, Mischer *et al*, eds., Grune and Stratton, New York, pp. 179-213; McFarlin *et al.* (1973) *Science,* 179: 478: y Satoh *et al.* (1987) *J Immunol*, 138: 179).

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) de la presente invención, se pueden utilizar como composiciones administradas separadamente o en conjunto con diversos fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, inmunotoxinas y similares. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cocteles" de diversos agentes citotóxicos u otros agentes, en conjunto con la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de la presente invención, o combinaciones de composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusiones de fármaco) de acuerdo con la presente invención que contiene fármacos diferentes.

Las composiciones de fármacos (por ejemplo, conjugados de

fármaco, conjugados de fármaco no covalentes,, fusiones de fármaco) se pueden administrar a cualquier individuo o sujeto de acuerdo con cualesquiera técnicas apropiadas. Una variedad de vías de administración es posible, incluyendo, por ejemplo, vías de administración oral, dietaria, tópica, transdérmica, rectal, parenteral (por ejemplo, inyección intravenosa, intra arterial, intramuscular, subcutánea, intradérmica, intraperitoneal, intratecal, intra articular), e inhalación (por ejemplo, inhalación intrabronquial, intranasal u oral, gotas intranasales), dependiendo de la composición de fármacos y la enfermedad o condición que va a ser tratada. La administración puede ser local o sistémica según se indique. La forma de administración preferida puede variar dependiendo de la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) escogida (por ejemplo, enfermedad) que está siendo tratada. La dosis y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y condición del paciente, de la administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que deben ser tomados en cuenta por el médico. Se administra una cantidad efectiva terapéuticamente de una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco). Una cantidad efectiva terapéuticamente es una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico deseado, bajo las condiciones de administración.

En una modalidad preferida de la invención, las composiciones

farmacéuticas que contienen un fármaco GLP-1 o análogo o derivado de GLP-1 de acuerdo con la presente invención, se pueden administrar por vía parenteral a pacientes que necesitan de este tratamiento.

La administración parenteral se puede realizar mediante inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa similar a pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción adicional es una composición que puede ser un polvo o un líquido para la administración del fármaco de GLP-1 o análogo o derivado de GLP-1 en la forma de un atomizador nasal o pulmonar. Como todavía una opción adicional, el fármaco de GLP-1 o análogo o derivado de GLP-1 de la invención, se puede administrar también por vía transdérmica, por ejemplo desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético, o por vía transmucosa, por ejemplo, bucalmente. En otras modalidades, las composiciones se administran por vía oral, por ejemplo, como una píldora, cápsula, bebida (por ejemplo, comercializada como una bebida para perder peso en el tratamiento de obesidad).

Una composición para administración parenteral de Compuestos de GLP-1 se puede preparar por ejemplo, tal como se describe en WO 03/002136 (incorporada aquí mediante referencia).

Una composición para la administración nasal de ciertos péptidos, se puede preparar por ejemplo tal como se describe en la

patente europea No. 272097 (de Novo Nordisk A/S) o en WO 93/18785 (todas incorporadas aquí mediante referencia).

El término "sujeto" o "individuo" se define aquí como incluyendo animales tales como mamíferos, incluyendo, sin limitación a ellos, primates (por ejemplo, seres humanos), vacas, ovejas, cabras, caballos, perros, gatos, conejos, cerdos de Guinea, ratas, ratones u otras especies bovinas, ovinas, equinas, caninas, felinas, de roedores o murinas.

La composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) se puede administrar como un compuesto neutro o como una sal. Las sales de compuestos (por ejemplo, composiciones de fármacos, conjugados de fármaco, conjugados de fármaco no covalentes, fusiones de fármaco) que contienen una amina u otro grupo básico se pueden obtener, por ejemplo, haciéndolos reaccionar con un ácido orgánico o inorgánico apropiado, tal como cloruro de hidrógeno, bromuro de hidrógeno, ácido acético, ácido perclórico y similares. Los compuestos con un grupo amonio cuaternario también contienen un anión de carga contraria, tal como cloruro, bromuro, yoduro, acetato, perclorato y similares. Las sales de compuestos que contienen un ácido carboxílico u otro grupo funcional ácido se pueden preparar haciéndolos reaccionar con una base apropiada, por ejemplo, una base hidróxido. Las sales de grupos funcionales ácidos contienen un catión de carga contraria, tal como sodio, potasio y similares.

La invención también proporciona un estuche para su uso en la administración de una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) a un sujeto (por ejemplo, paciente), que contiene una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco), un dispositivo para el suministro del fármaco, y opcionalmente, instrucciones para su uso. La composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) se puede proporcionar como una formulación, tal como una formulación secada por congelación. En ciertas modalidades, el dispositivo para suministro de fármaco es seleccionado del grupo que consiste en una jeringa, un inhalador, un dispositivo para administración intranasal u ocular (por ejemplo, un nebulizador, gotero oftálmico o nasal), y un dispositivo para inyección sin aguja.

La composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de esta invención puede ser liofilizada para su almacenamiento y reconstituida en un portador apropiado antes de su uso. Se puede emplear cualquier método apropiado para liofilización (por ejemplo, secado por pulverización, secado en torta) y/o técnicas de reconstitución. Las personas hábiles en la técnica se darán cuenta de que la liofilización y la reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad de anticuerpos (por ejemplo, con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a

tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ser ajustados para compensarlo. En una modalidad particular, la invención proporciona una composición que contiene una composición de fármacos liofilizada (secada por congelación) (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) como se describe aquí. Preferiblemente, la composición de fármacos liofilizada (secada por congelación) (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) pierde no más de aproximadamente 20%, o no más de aproximadamente 25%, o no más de aproximadamente 30%, o no más de aproximadamente 35%, o no más de aproximadamente 40%, o no más de aproximadamente 45%, o no más de aproximadamente 50% de su actividad (por ejemplo, actividad de enlace a albúmina de suero) cuando se rehidrata. La actividad es la cantidad de composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) requerida para producir el efecto de la composición de fármacos antes de que fuera liofilizada. Por ejemplo, la cantidad de conjugado de fármaco o fusión de fármaco necesaria para lograr y mantener una concentración en suero deseada durante un periodo de tiempo deseado. La actividad de la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) se puede determinar usando cualquier método apropiado antes de la liofilización, y la actividad se puede determinar usando el mismo método después de la

rehidratación para determinar la cantidad de actividad perdida.

Las composiciones que contienen la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) o un coctel de ellas, se pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad suficiente para lograr el efecto terapéutico o profiláctico deseado, bajo las condiciones de administración, tales como al menos inhibición parcial, supresión, modulación, eliminación o cualquier otro parámetro mensurable, de una población de células seleccionadas, se define como "cantidad o dosis efectiva terapéuticamente". Las cantidades necesarias para lograr esta dosis dependerán de la gravedad de la enfermedad y del estado general del propio sistema inmunitario del paciente y de su estado de salud general, pero generalmente abarcan desde aproximadamente 10 μg/kg hasta aproximadamente 80 mg/kg, o desde aproximadamente 0.005 hasta 5.0 mg de conjugado de fármaco o fusión de fármaco por kilogramo de peso corporal, siendo la dosis más usada, desde 0.05 hasta 2.0 mg/kg/dosis. Por ejemplo, una composición de fármacos (por ejemplo, fusión de fármaco, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente) de la invención se puede administrar diariamente (por ejemplo, hasta cuatro administraciones por día), cada dos días, cada tres días, dos veces semanalmente, una vez semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o una vez cada dos meses, en una dosis, por ejemplo, desde aproximadamente 10 μg/kg hasta

aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 100 μg/kg hasta aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 60 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 20 mg/kg , aproximadamente 1 mg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 μg/kg hasta aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 μg/kg hasta aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 μg/kg hasta aproximadamente 2.5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg o aproximadamente 10 mg/kg.

Para aplicaciones profilácticas, las composiciones que contienen la composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) o cocteles de ellas, también pueden ser administradas en dosis similares o ligeramente menores. Una composición que contiene una composición de fármacos (por ejemplo, conjugado de fármaco, conjugado de fármaco no covalente, fusión de fármaco) de acuerdo

con la presente invención se puede utilizar en entornos profilácticos y terapéuticos para ayudar en la alteración, inactivación, eliminación o extracción de una población de células objetivo seleccionada en un mamífero.

Ejemplos

El antagonista del receptor de interleucina 1 (IL1-ra) es un antagonista que bloquea la actividad biológica de la IL-1 inhibiendo completamente el enlace de la IL-1 al receptor de tipo 1 de interleucina 1 (IL-1RI). La producción de IL-1 es inducida en respuesta a estímulos inflamatorios y media diversas respuestas fisiológicas incluyendo respuestas inflamatorias e inmunológicas. La IL-1 tiene una gama de actividades, incluyendo degradación de cartílago y estimulación de resorción ósea. En pacientes con artritis reumatoide, la cantidad de IL-1 producida localmente es elevada, y los niveles de IL1-ra de origen natural son insuficientes para competir con estas cantidades anormalmente aumentadas. Hay arios tratamientos disponibles para la RA, incluyendo fármacos antirreumáticos que modifican la enfermedad (DMARDS) tales como metotrexato, y sustancias biológicas tales como KINERET® (Anakinra, Amgen).

El KINERET® (Anakinra, Amgen) es una forma recombinante, no glicosilada del antagonista del receptor de interleucina 1 humana que está constituido por 153 aminoácidos y tiene un peso molecular de 17.3 kiloDalton. (La secuencia de aminoácidos de KINERET® (Anakinra, Amgen) corresponde a los 152 aminoácidos en IL-1ra de

origen natural y un terminal adicional N metionina). El KINERET® (Anakinra, Amgen) está indicado para la reducción de signos y síntomas de artritis reumatoide de moderada a grave en pacientes de 18 años de edad en quienes ha fallado uno o más DMARD. La dosis es una inyección subcutánea de uno solo uso diaria, con 100 mg de fármaco. El $T_{\beta 1/2}$ es de 4 a 6 horas y 71% de los pacientes desarrolla reacciones en el sitio de la inyección en 14 a 28 días.

Aquí, nosotros demostramos que ligando un polipéptido terapéutico a un Ab que enlaza a albúmina de suero, se obtiene como resultado un compuesto que (i) tiene actividad similar a la del polipéptido terapéutico solo, y (ii) también se enlaza a albúmina de suero. Adicionalmente, la presente invención proporciona un método para crear una versión del polipéptido terapéutico con vida media larga. Por ejemplo, hemos ligado un dAb con enlace a albúmina de suero a IL1-ra, lo que da como resultado un compuesto con una vida media en suero más larga que la IL-1ra sola.

Ejemplo 1. Selección de anticuerpos de dominio que enlazan a albúmina de suero de ratón, rata y humana

Este ejemplo explica un método para elaborar un solo anticuerpo de dominio (dAb) dirigido contra albúmina de suero. Se describe la selección de dAb contra la albúmina de suero de ratón (MSA), albúmina de suero humana (HSA) y albúmina de suero de rata (RSA).

Los dAb contra la albúmina de suero de ratón fueron seleccionados tal como se describe en WO 2004/003019 A2. Se

utilizaron tres bibliotecas de anticuerpo con exhibición de fago. Cada biblioteca se basó en un entramado humano solo para V_H (V3-23/DP47 y J_H4b) o V_κ (o12/o2/DPK9 y J_k1) con diversidad de cadenas laterales codificadas por codones NNK incorporados en regiones determinantes de complementariedad (CDR1, CDR2 y CDR3).

Biblioteca 1 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98.

Tamaño de biblioteca: 6.2×10^9

Biblioteca 2 (V_H):

Diversidad en las posiciones: H30, H31, H33, H35, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H97, H98, H99, H100, H100A, H100B. Tamaño de biblioteca: 4.3×10^9

Biblioteca 3 ($V\kappa$):

Diversidad en las posiciones: L30, L31, L32, L34, L50, L53, L91, L92, L93, L94, L96

Tamaño de biblioteca: 2×10^9

Las bibliotecas de V_H y $V\kappa$ han sido preseleccionadas para unirse a proteínas de ligando genéricas A y proteína L respectivamente, de tal forma que la mayoría de los clones en las bibliotecas seleccionadas fueron funcionales. Los tamaños de las bibliotecas mostrados anteriormente corresponden a los tamaños después de la preselección.

Dos rondas de selección se realizaron en albúmina de suero usando cada una de las bibliotecas por separado. Para cada

selección, se recubrió el antígeno en un inmunotubo (nunc) en 4 mL de PBS con una concentración de 100 μg/mL. En la primera ronda de selección, cada una de las tres bibliotecas fue encapsulada por separado contra HSA (Sigma) o MSA (Sigma). En la segunda ronda de selección, fagos de cada una de las seis selecciones de la primera ronda fueron encapsulados contra (i) el mismo antígeno contra (por ejemplo primera ronda MSA, 2da. ronda MSA) y (ii) contra el antígeno recíproco (por ejemplo primera ronda MSA, 2da. ronda HSA) dando como resultado un total de doce selecciones en 2da. ronda. En cada caso, después de la ronda de selección, 48 clones fueron sometidos a prueba para determinar el enlace de HSA y MSA. Los fragmentos de dAb solubles fueron producidos como se describió por fragmentos scFv por Harrison *et al*, *Methods Enzymol.* 1996; 267: 83-109 y se siguió el procedimiento estándar para ELISA (Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic acids Res.*, 19: 4133) excepto porque se utilizó 2% de Tween PBS como un regulador bloqueador y los anticuerpos dAb enlazados fueron detectados con cualquier proteína L-HRP (Sigma) (para los $V\kappa$) y proteína A-HRP (Amersham Pharmacia Biotech) (para los V_H).

Los dAb que dieron una señal por encima de la de fondo, indicando enlace a MSA, HSA o ambos, fueron sometidas a prueba en forma insoluble en ELISA para determinar su enlace a plástico solo, pero todos fueron específicos para albúmina de suero. Los clones fueron secuenciados luego (véase la Tabla 1), revelando que 21 secuencias de dAb únicas habían sido identificadas. La similitud

618

mínima (en el nivel de aminoácidos) entre los clones Vκ de dAb seleccionados fue de 86.25% ((69/80) X100; el resultado cuando todos los residuos diversificados son diferentes, por ejemplo, los clones 24 y 34). La similitud mínima entre los clones V_H de dAb seleccionados fue de 94 % ((127/136) X100).

Luego, los dAb que enlazaron a albúmina de suero fueron sometidos a prueba para determinar su capacidad de capturar antígeno biotinilado de la solución. Se siguió el procedimiento ELISA (como anteriormente), excepto porque la placa ELISA se recubrió con 1 μg/mL de proteína L (para los clones Vκ) y 1 μg/mL de proteína A (para los clones V_H). Se capturó dAb de la solución como en el procedimiento y detección fue con MSA o HSA biotinilado y estreptavidina HRP. Los MSA y HSA han sido preparados de acuerdo con las instrucciones del fabricante, con el objetivo de lograr un promedio de 2 biotinas por molécula de albúmina de suero. Se identificaron veinticuatro clones que capturaron MSA biotinilado de la solución en el ELISA. Dos de estos (clones 2 y 38 más abajo) también capturaron HSA biotinilado. A continuación, los dAb fueron sometidos a prueba para determinar su capacidad de enlazarse a MSA recubierto sobre un chip Biacore CM5. Se encontró que otro clones que enlazaron al MSA en el Biacore.

Los dAb contra la albúmina de suero humana y albúmina de suero de rata fueron seleccionados como se describió previamente para los dAb anti-MSA, excepto porque se hicieron las siguientes modificaciones al procedimiento: La biblioteca de fagos de dominios

de V_H sintético fue la biblioteca 4G, la cual está basada en un V_H3 humano que comprende la línea germinal DP47 y el segmento J_H4. La diversidad en las siguientes posiciones específicas fue introducida por mutagénesis (usando codones NNK; numeración de acuerdo con Kabat) en CDR1: 30, 31, 33, 35; en CDR2: 50, 52, 52a, 53, 55, 56; y en CDR3: 4-12 residuos diversificados: por ejemplo H95, H96, H97, y H98 en 4G H11 y H95, H96, H97, H98, H99, H100, H100a, H100b, H100c, H100d, H100e y H100f en 4G H19. Los últimos tres residuos CDR3 son FDY, de tal forma que las longitudes de CDR3 varían desde 7 hasta 15 residuos. La biblioteca contiene $>1x10^{10}$ clones individuales.

Un subconjunto de las bibliotecas de V_H y $V\kappa$ se había seleccionado previamente para su enlace a ligandos genéricos proteína A y proteína L respectivamente, de manera que la mayor parte de los clones en las bibliotecas no seleccionadas fueron funcionales. Los tamaños de las bibliotecas que se muestran arriba corresponde a los tamaños después de la preselección.

Se realizaron dos rondas de selección en albúmina de suero humana y de rata, usando subconjuntos de las bibliotecas de V_H y $V\kappa$ por separado. Para cada selección, el antígeno fue (i) recubierto en inmunotubo (nunc) en 4 mL de PBS con una concentración de 100 μg/mL, o (ii) biotinilado y luego utilizado para selección soluble, seguida por captura en perlas de estreptavidina (en la primera ronda) y perlas de neutravidina (en la segunda ronda). (Véase Tabla 1 para detalles de la estrategia de selección utilizada para aislar cada clon).

620

En cada caso, después de la segunda ronda de selección, los 24 clones de fago fueron sometidos a prueba para determinar su enlace a HSA o RSA.

Si una proporción significativa de los clones en una de las selecciones fue positiva en el ELISA de fagos, entonces el ADN de esta selección se clonó en un vector de expresión para la producción de dAb soluble, y se escogieron colonias de individuos. Los fragmentos de dAb fueron producidos como se describe para los fragmentos scFv por Harrison *et al* (*Methods Enzymol.* 1996;267:83-109) y se siguió el procedimiento estándar para ELISA (Hoogenboom *et al.* (1991) *Nucleic acids Res.*, 19: 4133) excepto porque se utilizó 2% de TWEEN PBS como un regulador bloqueador y se detectaron los dAb enlazados con anti-myc-HRP. Los clones que fueron positivos en ELISA en donde fueron seleccionados por su unión a MSA, RSA o HSA usando un instrumento de resonancia con plasma en superficie BIACORE (Biacore AB). Los dAb que enlazaron a MSA, RSA o HSA fueron analizados adicionalmente. Los clones fueron secuenciados luego y se identificaron secuencias únicas de dAb.

Tabla 1. Procedimientos de selección para dAb que enlazan a albúmina de suero

dAb	Biblioteca	Selección R1	Selección R2	Fijación Biacore
DOM7r-1	4G V*k*	RSA tubo de 10 µg/mL	RSA tubo de 10 µg/mL	RSA
DOM7r-3	4G V*k*	RSA tubo de 10 µg/mL	RSA tubo de 10 µg/mL	RSA

DOM7r-4	4G V*k*	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA, MSA
DOM7r-5	4G V*k*	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA
DOM7r-7	4G V*k*	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA, MSA
DOM7r-8	4G V*k*	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA tubo de 10 μg/mL	RSA, MSA
DOM7h-1	4G V*k*	HSA tubo de 10 μg/mL	HSA tubo de 10 μg/mL	HSA
DOM7h-2	4G V*k*	HSA 100 nM soluble	HSA 50 nM soluble	HSA
DOM7h-3	4G V*k*	HSA tubo de 10 μg/mL	HSA tubo de 10 μg/mL	-
DOM7h-4	4G V*k*	HSA tubo de 10 μg/mL	HSA tubo de 10 μg/mL	-
DOM7h-6	4G V*k*			
DOM7h-7	4G V*k*			
DOM7h-8	4G V*k*	HSA 200 nM soluble	HSA 50 nM soluble	HSA, RSA, MSA
DOM7r-13	4G V*k*	HSA 200 nM soluble	HSA 50 nM soluble	RSA, MSA
DOM7r-14	4G V*k*	HSA 200 nM soluble	HSA 50 nM soluble	RSA, MSA

DOM7h-21	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-22	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-23	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-24	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-25	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-26	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA
DOM7h-27	4G V*k*	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA tubo de 100 µg/mL	HSA

Los dAb que enlazaron a albúmina de suero en un chip BIACORE (Biacore AB) se analizaron adicionalmente para obtener información de afinidad. El análisis se realizó usando un chip CM5 (matriz dextrán carboximetilada) que se recubrió con albúmina de suero. La célula de fluido 1 era un control negativo bloqueado no recubierto, la célula de fluido 2 se recubrió con HSA, la célula de fluido 3 se recubrió con RSA y la célula de fluido 4 se recubrió con MSA. Las albúminas de suero se inmovilizaron en regulador acetato con pH 5.5 usando el recubrimiento BIACORE Wizard, el cual estaba

programado para dirigirse a 500 unidades de resonancia (RU) de material recubierto. Cada dAb de interés fue expresado en el periplasma de *E. coli* en una escala de 200 mL-500 mL y purificada del supernadante usando absorción de lote a proteína A-resina de afinidad con flujo laminar (Amersham, UK) para los V_H y para la resina de afinidad de proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) para los V_κ , seguido por elución con glicina con un pH de 2.2 y cambio del regulador por PBS. Se preparó una gama de concentraciones de dAb (en el rango desde 5nM hasta 5/μM) mediante dilución en regulador BIACORE HBS-EP y se hizo fluir a través del chip BIACORE.

Se calculó la afinidad (KD) a partir de los restos de BIACORE, ajustando las curvas de tasa de activación y tasa de desactivación a los restos generados por las concentraciones de dAb en la región de la KD. Se identificaron los dAb con una gama de diferentes afinidades con albúmina de suero. Las afinidades de DOM7h-8 para HSA, DOM7h-2 para HSA y DOM7r-1 para RSA, estuvieron incluidas en el rango de 10-100 nM. Las afinidades de DOM7h-7 para HSA, DOM7h-8 para RSA y DOM7h-26 para HSA, estuvieron incluidas en el rango de 100 nM hasta 500 nM. Las afinidades de DOM7h-23 para HSA y DOM7h-1 para HSA, estuvieron incluidas en el rango de 500 nM hasta 5 μM. Los ejemplos de restos están incluidos en las figuras 6A-6C.

Ejemplo 2. Formateo de anticuerpos anti-albúmina de suero como una fusión con antagonista del receptor de IL-1 (IL-1ra)

624

Este ejemplo describe un método para elaborar una proteína de fusión que contiene IL-1ra y un dAb que enlaza a albúmina de suero. Se elaboraron dos fusiones, una con el dAb en el terminal N de IL-1ra (MSA16IL-1ra) y una con el dAb en el terminal C de la IL-1ra (ILI-raMSA 16). Las secuencias de las fusiones y el vector se muestran en la figura 2C and 2D. También se produjo una fusión de control que no se enlaza a MSA, y su secuencia se muestra en la figura 2E.

El KINERET (Anakinra, Amgen) tiene una vida media corta de 4-6 horas, y el régimen de dosificación recomendado contempla inyecciones diarias. Este régimen conduce a reacción en el sitio de inyección en 14-28 días en 71% de los casos. Por lo tanto, una forma de IL-1ra humana que tenga una vida media en suero podría ser beneficiosa y podría aumentar la eficacia y reducir la frecuencia de dosificación. Ambas son propiedades deseables para una sustancia farmacéutica.

Clonación

De manera resumida, se designaron dos sitios de clonación múltiple (MCS) según se detalla más abajo y se insertaron en un vector de expresión con un promotor T7. Los sitios de restricción fueron diseñados para la inserción de IL1I-ra, dAb, GAS conductor y enlazante. Un (MCS 1+3) codifica una proteína con el dAb del terminal N de la IL-1ra, y el otro (MCS 2+4) codifica una proteína con el dAb del terminal C de la IL-1ra.

Sitio de clonación 1+3 para la fusión de dAbIL1-ra

NdeI, rellenador, Sa1I, NotI, rellenador, XhoI, BamHI

625

gcgcatatgttagtgcgtcgacgtcaaaaggccatagcgggcggccgctgcaggtctc gagtgcgatggatcc (SEQ ID NO:35)

Sitio de clonación 2+4 para la fusión ILI-radAb

Ndel, rellenador, StUI, SacI, rellenador, Sa1I, NotI, TAA TAA BamHI

gcgcatatgttaagcgaggccttctggagagagctcaggagtgtcgacggacatccag atgacccaggcggccgctaataaggatccaatgc (SEQ ID NO:36)

El, conductor GAS se insertó luego en cada vector digiriendo el MCS usando las enzimas de restricción apropiadas y ligando sensibilizadores apareados que codifican el conductor. Luego, la codificación del ADN enlazante para el enlazante, fue insertada en una forma similar. La codificación del ADN para IL-1ra se obtuvo mediante PCR (usando sensibilizadores diseñados para añadir los sitios de restricción requeridos) de un clon de ADNc y se insertó en un vector de clonación TOPO. Después de confirmar la secuencia correcta mediante secuenciación de ácido nucleico, la codificación de ADN para IL-1ra fue extraída del vector TOPO y ligada en los vectores que contenían conductor y enlazante. Finalmente, la codificación de ADN para el dAb fue extraída del vector de expresión de dAb e insertada en los vectores mediante digestión con Sa1I/NotI del inserto (purificado mediante purificación en gel) y del vector.

Expresión y purificación

El MSA16IL-1ra, ILI-raMSA16 y la IL-1ra ficticia fueron expresados en el periplasma de *E. coli* y purificados del supernadante utilizando absorción en lote para la resina de afinidad

626

de proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) seguida por elución con glicina con un pH de 2.2. Los dAb purificados fueron analizados luego mediante electroforesis en gel SDS-PAGE seguida por tinción con Coomassie. Para una de las proteínas (IL-1raMSA 16), > 90% de la proteína fue del tamaño esperado, y por lo tanto fue analizada para determinar su actividad sin purificación adicional. Las otras proteínas (MSAI 6IL 1-ra y IL-1ra ficticia) estuvieron contaminadas por una banda más pequeña y por lo tanto fueron purificadas adicionalmente mediante cromatografía de intercambio iónico FPLC en la columna de intercambio iónico RESOURSEQ con un pH de 9. La proteína se eluyó usando un gradiente de sal lineal desde 0 hasta 500 mM de NaCl. Después del análisis mediante electroforesis en gel con SDS-PAGE , las fracciones que contenían una proteína del tamaño esperado fueron combinadas para producir una fracción combinada de >90% de pureza. Esta proteína se utilizó para análisis adicionales.

Ejemplo 3. Determinación de la actividad de la fusión dAb IL1-ra *in vitro*

Análisis de MRC-5 IL-8

Se sometieron a prueba las fusiones de MSA16 IL-1ra, para determinar su capacidad para neutralizar la inducción de secreción de IL-8 por IL-1 en células MRC-5s (Número de acceso a ATCC CCL-171; American Type Culture Collection, Manassas, VA). El método es adaptado de Akeson, L. *et al* (1996) *Journal of Biological Chemistry* 271, 30517-30523, el cual describe la inducción de IL-8 por IL-1 en

627

HUVEC, se utilizaron células MRC-5 e lugar de la línea celular HUVEC. De manera resumida, células MRC-5 colocadas en placas para microtitulación se incubaron de un día para otro con proteínas de fusión dAbIL-1ra o IL-1ra control, y con IL-1 (100 pg/mL). Después de la incubación, se aspiró el supernadante de las células y se midió la concentración de IL-8 por medio de un ELISA en sándwich (R&D Systems).

La actividad de IL-1ra en las proteínas de fusión condujo a una reducción en la secreción de IL-8. La reducción de secreción de IL-8 resultante de la actividad de la fusión de MSA16IL1-ra y de la actividad de la fusión de IL-1raMSA16 fue comparada con la reducción observada con la IL-1ra de control (IL-1ra humana recombinante, R&D systems). La dosis de neutralización 50 (ND_{50}) de cada una de las proteínas sometidas a prueba se determinó y se presenta en la Tabla 2.

Tabla 2

Proteína	ND_{50}
IL-1ra	0.5 nM
MSA 16IL-ra	2 nM
IL.1ra MSA 16	8 nM

Los resultados demuestran que la IL-1ra permaneció activa como parte de una construcción de fusión con un dAb anti-albúmina de suero. La proteína MSA16IL-1ra fue estudiada adicionalmente para tener acceso a su farmacocinética (estudio PK).

628

Albúmina de suero, ELISA en sándwich anti IL-1ra

Tres fusiones de dAb/IL-1ra fueron sometidas a prueba para determinar su capacidad para unirse a albúmina de suero y simultáneamente ser detectadas por un anticuerpo monoclonal anti-IL1ra. Las fusiones sometidas a prueba fueron MSA16IL-1ra, IL-1raMSA16 y IL-1ra ficticia. De manera resumida, se recubrió la placa para ELISA de un día para otro con albúmina de suero de ratón en 10 µg/mL, se lavó 5 x con Tween PBS al 0.05% y luego se bloqueó durante 1 hora con Marvel PBS al 4%. Después del bloqueo, la placa se lavó 5 x con Tween PBS al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con cada dAb, la fusión de IL-1ra se diluyó en MPBS al 4%. Cada fusión se incubó en una concentración de 1 µM y en 7 diluciones secuenciales de 4 veces (es decir 60 pM). Después de la incubación, se lavaron las placas 5 x con Tween PBS al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con la dilución recomendada por los fabricantes de un anticuerpo policlonal de conejo (ab-2573) para el antagonista del receptor de IL-1 humano (Abeam, UK) diluido en MPBS al 4%. Después de esta incubación, se lavaron las placas 5 x con Tween PBS al 0.05% y luego se incubó durante 1 h con una dilución 1/2000 de anticuerpo secundario (anti-IgG de conejo-HRP) diluido en MPBS al 4%. Después de la incubación con el anticuerpo secundario, se lavaron las placas 3 x con Tween PBS al 0.05% y 2 x con PBS, y luego se desarrollaron con 50 µL por receptáculo de sustrato peroxidasa con micro receptáculos TMB (KPL, MA) y se detuvo la reacción con 50 µL por receptáculo de HCL. Se leyó la

absorción a 450 nM.

Tanto la proteína MSA16IL-1ra como la proteína IL-1raMSA16 fueron detectadas a un nivel de fondo de más de 2x en una concentración de 1 μM en la ELISA en sándwich. La proteína MSA16IL-1ra fue detectada en diluciones de 2x el nivel de fondo, o mayores, disminuyendo hasta 3.9 nM, mientras que la proteína IL-1raMSA16 fue detectada en 2x el fondo solamente, bajando hasta 500 nM. El enlace de la fusión de MSA16IL-1ra a la albúmina de suero demostró ser específica para la albúmina de suero, mientras que la construcción de control (IL-1ra ficticia) no se enlazó a la albúmina de suero.

Ejemplo 4. Determinación de vida media en suero de fusiones de fármaco estudios PK de ratón.

A. Determinación de la vida media en suero en ratón de una proteína de fusión con etiqueta de epítopo dAb/HA de enlace a MSA.

La proteína de fusión con etiqueta de epítopo dAb/HA de enlace a MSA fue expresada en el periplasma de *E. coli* y purificada usando absorción de lote a resina de afinidad de proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) seguida por elución con glicina con un pH de 2.2. La vida media en suero de la proteína de fusión se determinó en el ratón después de una sola inyección intravenosa (i.v.) aproximadamente en 1.5 mg/kg en animales machos de la cepa CD1. El análisis de los niveles en suero se realizó mediante ELISA usando captura en anti-HA de cabra (Abeam, UK) y detección en proteína L-

HRP (Invitrogen, USA), la cual estaba bloqueada con Marvel al 4%. El lavado se realizó con Tween-20 al 0.05%, PBS. Las curvas estándar de concentraciones conocidas de enlace a MSA de la fusión de dAb/HA se determinaron en la presencia de suero de ratón 1x para asegurar la comparabilidad con las muestras de prueba. El modelado con un modelo de 1 compartimiento (Software WinNonlin, Pharsight Corp., USA) mostró que la proteína de fusión con etiqueta de epítopo dAb/HA de enlace a MSA tenía una fase terminal t 1/2 de 29.1 horas y un área bajo la curva de 559 h.μg/mL. Esto demuestra una gran mejora sobre la vida media predicha para un péptido con etiqueta de epítopo HA solo, que podría ser tan corta como de solamente varios minutos.

Los resultados de este estudio usando la etiqueta de epítopo HA como un modelo de fármaco, demuestran que la vida media en suero *in vivo* de un fármaco puede ser extendida cuando el fármaco se prepara como una fusión de fármaco o conjugado de fármaco con un fragmento de enlace a antígeno de (por ejemplo, dAb) de un anticuerpo que se une a albúmina de suero.

También se evaluó la vida media *in vivo* en ratones del DOM7m-16 y DOM7m-26 del dAb anti-MSA, y un dAb de control que no se enlaza a MSA. De nuevo el DOM7m-16, el DOM7m-26 y el dAb de control contenían una etiqueta de epítopo HA, la cual sirve como modelo para un fármaco (por ejemplo, un fármaco de péptido). En este estudio, el dAb de control, que no se enlaza a MSA, tuvo una vida media *in vivo* de 20 minutos, mientras que las vidas medias *in*

vivo de DOM7m-16 y DOM7m-26 fueron extendidas significativamente (figura 12). En estudios adicionales, se encontró que el DOM7m-16 tiene una vida media *in vivo* en ratones de 29.5 horas.

En otro estudio, la vida media *in vivo* (t1/2 β) de DOM7h-8 que contenía una etiqueta de epítopo HA, se evaluó en ratones. El modelado con un modelo de 2 compartimientos (Software WinNonlin, Pharsight Corp., USA) mostró que el DOM7h-8 tuvo una t 1/2 β de 29.1 horas.

Los resultados de cada uno de estos estudios usando la etiqueta de epítopo HA como modelo para un fármaco (por ejemplo, un fármaco de péptido), demuestran que la vida media en suero *in vivo* de un fármaco puede extenderse considerablemente cuando el fármaco se prepara como una fusión de fármaco o conjugado de fármaco con un fragmento de enlace a antígeno (por ejemplo, dAb) de un anticuerpo que se une a albúmina de suero.

B. Determinación de la vida media en suero en ratón de enlace a MSA de proteína de fusión dAb/IL-1ra.

El enlace a MSA de la proteína de fusión dAb/IL-1ra (MSA16IL-1ra) se expresó en el periplasma de *E. coli* y se purificó usando absorción de lote para resina de afinidad de proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) seguida por elución con glicina con un pH de 2.2. Se determinó la vida media en suero de MSA16IL-1ra (DOM7m-16/TL-1ra), una fusión de IL-1ra con un dAb que no se enlaza a MSA (dAb/IL-1ra ficticio), y un dAb anti-MSA fusionado a la etiqueta de

epítopo HA (DOM7m-16 etiqueta HA), en ratones después de una sola inyección i.v. en aproximadamente 1.5 mg/kg en animales machos de la cepa CD1.

El análisis de los niveles en suero se realizó mediante ELISA en sándwich de IL-1ra (R&D Systems, USA). Las curvas estándar de concentraciones conocidas de fusión de dAb/IL-1ra se establecieron en la presencia de suero de ratón 1x para asegurar la comparabilidad con las muestras de prueba. El modelado se realizó utilizando el software para farmacocinética WinNonlin (Pharsight Corp., USA).

Se esperaba que la fusión de IL-1ra con el dAb anti-MSA pudiera aumentar considerablemente la vida media en suero en comparación con el control que tenía una fusión de un dAb que no se enlazaba a MSA dAb con IL-1ra. Se pronosticó que el control de fusión de dAb/IL-1ra sin enlace a MSA tendría una vida media corta en suero.

Los resultados del estudio se presentan en la Tabla 3, y muestran que la fusión de IL-1ra con dAb anti-MSA (DOM7m-16/IL-1ra) tuvo una vida media en suero que fue aproximadamente 10 veces mayor que la de la fusión de IL-1ra con un dAb que no se enlaza a MSA (dAb/IL-1ra ficticio). Los resultados también revelaron que hubo una mejora (aumento) de > 200 veces en el área bajo la curva de concentración en el tiempo para el DOM7m-16/IL-1ra (AUC: 267 h.μg/mL) en comparación con la IL-1ra ficticia (AUC: 1.5 h.μg/mL)

Tabla 3

Agente	Vida media en suero
DOM7m-16/IL-1ra	4.3 horas
ficticio/IL-1ra	0.4 horas

etiqueta DOM7m-16 HA	29 horas

Los resultados de estos estudios demuestran que la vida media en suero *in vivo* y el AUC de un fármaco puede ser extendida significativamente cuando el fármaco se prepara como una fusión de fármaco o conjugado de fármaco con un fragmento de enlace a antígeno (por ejemplo, dAb) de un anticuerpo que se une a albúmina de suero.

Ejemplo 5. Determinación de la vida media en suero en ratas, de proteínas de fusión con epítopo dAb/HA que enlazan a RSA

Los dAb anti-albúmina de suero de rata fueron expresados con etiquetas HA del terminal en el periplasma de *E. coli* y purificados usando absorción en lote para resina de afinidad de proteína L-agarosa (Affitech, Noruega) para dAb Vκ y absorción en lote para resina de afinidad de proteína A para dAb VH, seguida por elución con glicina con un pH de 2.2. Con el fin de determinar la vida media en suero, se le administró una sola inyección i.v. a grupos de 4 ratas en 1.5 mg/Kg de DOM7r-27, DOM7r-31, DOM7r-16, DOM7r-3 o un dAb de control (HEL4) que se une a un antígeno irrelevante. Las muestras de suero se obtuvieron mediante extracciones de sangre en serie de la vena de la cola durante un periodo de 7 días y se analizaron mediante ELISA en sándwich usando anti-HA de cabra

(Abeam, Cambridge UK) recubierto sobre una placa ELISA, seguida por detección con proteína A-HRP (para el dAb V_H) o proteína L-HRP (para el dAb VK). Las curvas estándar de concentraciones conocidas de dAb se establecieron en la presencia de suero de rata 1x para asegurar la comparabilidad con las muestras de prueba. El modelado con un modelo de 2 compartimientos (usando el software para farmacocinética WinNonlin (Pharsight Corp., USA)) se usó para calcular 11/2/3 y el área bajo la curva (AUC) (Tabla 4).

Tabla 4

Agente	Armazón proteínico	Afinidad (KD) para albúmina de suero en ratas	T1/2β	AUC (µg.h/mL)
DOM7r-3	V_K	12 nM	13.7 horas	224
DOM7r-16	V_K	1 µM	34.4 horas	170
DOM7r-27	V_H	250 nM	14.8 horas	78.9
DOM7r-31	V_H	5 µM	5.96 horas	71.2

Los resultados de este estudio en ratas usando la etiqueta de epítopo HA como modelo para un fármaco (por ejemplo, un fármaco de péptido), demuestran que la vida media en suero *in vivo* de un fármaco puede extenderse considerablemente cuando el fármaco se prepara como una fusión de fármaco o conjugado de fármaco con un fragmento de enlace a antígeno de (por ejemplo, dAb) de un anticuerpo que se une a albúmina de suero.

Predicción de vida media en seres humanos.

La vida media *in vivo* de un dAb, fusión de fármaco o

conjugado de fármaco en seres humanos se puede estimar a partir de los datos de vida media obtenidos en animales usando escalado alométrico. El log de las vidas medias *in vivo* determinado en 3 animales se grafica contra el log del peso del animal. Se dibuja una línea a través de los puntos graficados y se utiliza la pendiente y el intercepto de la línea en Y para calcular la vida media *in vivo* en seres humanos, utilizando la fórmula log Y = log(a) + b log(W), en la cual Y es la vida media *in vivo* en seres humanos, log(a) es el intercepto en y, b es la pendiente, y W es el peso de un ser humano. La línea se puede producir usando los datos de vida media *in vivo* vida media obtenidos en animales que pesan aproximadamente 35 gramos (por ejemplo, ratones), aproximadamente 260 gramos (por ejemplo, ratas) y aproximadamente 2,710 gramos. Para este cálculo, se puede considerar que el peso de un ser humano es de 70,000 gramos.

Ejemplo 6. Eficacia de la fusión de fármaco dAb/IL-1ra anti-SA en un modelo de artritis reumatoide en ratón inducida por colágeno.

Se evaluó la eficacia de la fusión DOM7m-16/IL-1ra y la eficacia de IL-1ra en un modelo de artritis reumatoide reconocida en ratón (artritis inducida por colágeno tipo II (CIA) en ratones DBA/1). Durante el estudio, se mantuvo a los ratones en una instalación de prueba en jaulas estándar de tipo 2 que estaban alojadas en un gabinete Scantainer filtrado con HEPA a 20-24 °C con un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Se les proporcionó alimento (dieta universal Harlan-Teklad 2016) y agua esterilizada con rayos

UV *ad libitum*. Los ratones fueron importados a la instalación de prueba al menos 7 días antes de iniciar el estudio para asegurarse de la aclimatación adecuada.

Se inyectó a los ratones DBA/1 a las 7-8 semanas de edad (obtenidos de Taconic M and B, Domholtveg, Dinamarca) una vez con una emulsión de adyuvante Arthrogen-CIA y colágeno Arthrogen-CIA (ambos de MD Biosciences) emulsificados en una proporción de 1:1 hasta que la emulsión estuvo estable. La emulsión se consideró estable cuando una gota de la emulsión añadida a un vaso de precipitados con agua formó un grumo sólido. Luego se le inyectó la emulsión a los ratones.

Veintiún días después de que se inyectó la emulsión, los 20 animales con la enfermedad artrítica más avanzada fueron eliminados del estudio, y los ratones restantes fueron divididos en grupos de 10 animales (cada grupo contenía 5 machos y 5 hembras). Los ratones fueron tratados como se muestra en la Tabla 5, y todos los tratamientos fueron suministrados en una concentración calculada de tal forma que se administraron 10 mL/kg.

Tabla 5

Grupo	Tratamiento
1	IL-1ra, a mg/Kg (bolo intraperitoneal (ip.))
2	IL-1ra, a mg/Kg (bolo ip.)
3	DOM7m-16/IL-1ra, 1 mg/Kg (bolo ip.)
4	DOM7m-16/IL-1ra, 10 mg/Kg (bolo ip.)
5	ENBREL® (ENTARECEPT; IMMUNEX CORPORATION), 5mg/Kg (bolo ip.)
6	Salina (control negativo), 10 ml/Kg (bolo ip.)

7	Dexametasona (control positivo) 0.4 mg/kg (inyección subcutánea)

Se registraron las puntuaciones clínicas para la gravedad de la artritis 3 veces por semana desde el día 21 hasta día 49. Se eutanizaron los ratones el día 49. Ratones individuales fueron eutanizados antes si presentaban una puntuación artrítica de 12 o más, o tenían serios problemas de movimiento.

Para la puntuación clínica, se le asignó puntuación a cada pata de acuerdo con los criterios siguientes, y se añadieron las puntuaciones para las cuatro patas para producir la puntuación total para el ratón. Este método dio como resultado una puntuación de 0 a 16 para cada ratón. Los criterios de puntuación fueron: 0 = normal; 1 = enrojecimiento leve pero definido a inflamación del talón o muñeca, o enrojecimiento aparente e inflamación limitada a dedos individuales, sin considerar la cantidad de dedos afectados; 2 = enrojecimiento moderado e inflamación de talón y muñeca; 3 = fuerte enrojecimiento e inflamación de la pata completa, incluyendo los dedos; 4 = pata inflamada al máximo con involucramiento de múltiples articulaciones.

Las puntuaciones artríticas promedio del grupo fueron calculadas para cada grupo de tratamiento en cada día de

tratamiento, usando puntuaciones clínicas de ratones individuales. A cualesquiera animales que habían sido sacados del estudio por razones éticas se les asignó la puntuación máxima de 16. Las puntuaciones artíticas promedio del grupo fueron graficadas contra el tiempo (figura 13).

El análisis estadístico análisis de las puntuaciones artríticas promedio del grupo fue realizado utilizando la prueba Wilcoxon. El análisis estadístico reveló que los dos grupos tratados con DOM7m-16/IL-1ra (en 1 mg/Kg o 10 mg/Kg (Grupos 3 y 4)) tuvieron puntuaciones artríticas mejoradas significativamente el día 49 (en los niveles de significancia P <1% y P <0.05% respectivamente) comparadas con las del grupo de control con salina (Grupo 6). En contraste, el tratamiento con IL-1ra en 1 mg/Kg (Grupo 1) no dio resultado un mejoramiento significativo estadísticamente en el día 49, mientras que el tratamiento con IL-1ra en 10 mg/Kg (Grupo 2) dio como resultado una mejora significativa en el nivel de significancia P <5%. El tratamiento con ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation) (Grupo 5) dio como resultado una mejora significativa en la puntuación artrítica el día 49 en el niel de significancia P <10%.

El tratamiento con DOM7m-16/IL-1ra con la dosis de 10 mg/kg (Grupo 4), fue efectivo para mejorar la calificación artrítica el día 49 (significativa en el nivel P<0.5%) comparada con el tratamiento estándar con ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation) en 5mg/Kg (Grupo 5). Adicionalmente, el tratamiento con DOM7m-

16/IL-1ra en la dosis inferior de 1 mg/kg (Grupo 3), fue más eficaz para mejorar la calificación artrítica el día 49 que el tratamiento con IL-1ra sola en la misma dosis (Grupo 1) (significativo en el nivel P<10%).

Los resultados del estudio muestran que en ciertas dosis, el DOM7m-16/IL-1ra fue más efectivo que la IL-1ra o el ENBREL® (Entarecept; Immunex Corporation) en este estudio. La respuesta a IL-1ra fue dependiente de la dosis, como se esperaba, y la respuesta a DOM7m-16/TL-1ra también fue dependiente de la dosis. Las puntuaciones promedio para el tratamiento con DOM7m- 16/IL-1ra en 1 mg/Kg fueron consistentemente inferiores que las puntuaciones promedio obtenidas mediante el tratamiento con IL-1ra en 10 mg/kg. Estos resultados graficados (figura 13) indican que el tratamiento con DOM7m-16/IL-1ra fue aproximadamente 10 veces más efectivo que con IL-1ra en este estudio.

Esta eficacia superior de DOM7m-16/IL-1ra se observó aún a pesar de que la proteína de fusión DOM7-16/IL-1ra contiene aproximadamente la mitad de la cantidad de epítopos de enlace al receptor de IL-1 que a la IL-1ra con base en el peso (por ejemplo, 1 mg de DOM7m-16/IL-1ra (PM 31.2 kD) contiene aproximadamente la mitad de la cantidad de epítopos de enlace al receptor de IL-1 que 1 mg de IL-1ra (PM 17.1 kD).

Los resultados de este estudio demuestran que un dAb que se une a albúmina de suero se pueden enlazar a IL-1ra (una terapia probada clínicamente para la RA) y que la fusión resultante de

fármaco tiene tanto propiedades de vida media en suero larga (conferidas por el dAb) como propiedades de enlace al receptor de IL-1 (conferidas por la IL-1ra). Debido al tiempo de residencia en suero de la fusión de fármaco, la dosis de DOM7-16/IL-1ra que fue efectiva para tratar la CIA fue reducida drásticamente con relación a la IL-1ra.

Los resultados de este estudio demuestran que además de los beneficios de vida media extendida y AUC aumentada, los fármacos preparados como fusiones de fármaco o conjugados de fármaco con un fragmento de enlace a antígeno (por ejemplo, dAb) de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, son agentes terapéuticos altamente efectivos que proporcionan ventajas sobre el fármaco solo. Por ejemplo, tal como se demostró en el modelo con ratón CIA, una dosis más baja de fusión de fármaco fue efectiva e inhibió la inflamación de articulaciones y el daño en articulaciones ocasionado por la IL-1 durante un periodo de tiempo más largo en comparación con la IL-1ra sola, y proporcionó mayor protección contra el avance de la enfermedad.

Ejemplo 7. Conjugado de fármaco no covalente dAb/Saporina Anti-SA

La proteína inactivadora de ribosoma saporina (un fármaco anticanceroso) es altamente estable a los desnaturalizantes y proteasas, y se ha utilizado como una toxina apuntada a linfocitos T. Se preparó un conjugado de fármaco covalente mediante acoplamiento de Saporina a DOM7h-8 por medio de un enlace

biotina-estreptavidina. Los resultados obtenidos con este conjugado de fármaco no covalente demuestran que el DOM7h-8 mantiene sus características de enlace a albúmina de suero cuando se acopla a un fármaco.

Una variante de DOM7h-8 denominada DOM7h-8cys, en la cual la arginina del terminal C en la posición 108 (aminoácido 108 de la SEQ ID NO: 24) fue reemplazada con un residuo de cisteína mediante expresión de un ácido nucleico recombinante en células HB2151. Las células se cultivaron y se indujeron a 30°C en mezcla lista TB para autoinducción de expresión de un día para otro (Merck KGa, Alemania) durante 72 horas antes de recuperar el supernadante mediante centrifugación. Se purificó el DOM7h-8cys del supernadante usando captura por afinidad en proteína L-agarosa. Luego se lavó la resina con 10 volúmenes de columna de 2 x PBS, y se eluyó el DOM7h-8cys con 0.1 M de glicina pH2. El DOM7h-8cys eluido fue neutralizado con volumen de 0.2 x de Tris con pH 8 y se concentró hasta 1 mg/mL (usando un concentrador CENTRICON de 20 mL (Millipore Corp., MA).

Al DOM7h-8cys concentrado se le cambió el regulador por PBS usando una columna de desalinización NAP5 (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ) y se determinó la concentración. Luego se biotiniló el dAb (por medio de aminas primarias) usando EZ-LINK sulfo-NHS-LC-biotina (Pierce Biotechnology Inc., IL). El dAb biotinilado fue mezclado con estreptavidina-saporina en una proporción molar 1:1.

Con el fin de confirmar que el complejo dAb/saporina se había formado, se usó una prueba ELISA en sándwich para detectar complejos intactos. Se recubrió con albúmina de suero humana (HAS) la mitad de los receptáculos de una placa para ELISA (Nunc, NY) de un día para otro a 10 μg/mL en un volumen de 100 μL por receptáculo. Después de incubación de un día para otro, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se bloquéo la placa completa durante 2 horas con 2% PBS. Después del bloqueo, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con conjugado de DOM7h-8/saporina no covalente diluido hasta 0.5 μM en Tween PBS al 2%. Como controles en la misma placa para ELISA, se incubaron saporina no acoplada en 0.5 μM y DOM7h8 no acoplado en 0.5 μM se incubaron en Tween PBS al 2%. Los controles adicionales fueron las mismas tres proteínas diluidas incubadas en receptáculos de la placa para ELISA no recubierta con HSA y bloqueada con Tween al 2%. Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con una dilución 1/2000 de anticuerpo policlonal anti-saporina de cabra (Advanced Therapeutic Systems) diluido en Tween PBS al 2%. Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con la detección del anticuerpo secundario (de conjugado anti-Ig HRP de cabra 1/2000). Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y una vez con PBS y se secó con golpecitos sobre papel. El ELISA se desarrolló con 100 μL de

3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato y se detuvo la reacción con 50 μL de ácido clorhídrico 1M. La presencia de conjugados no covalentes de DOM7h-8 y saporina se confirmó comparando la OD600 del conjugado con la de cualquiera de las partes no conjugadas.

Tabla 6

	DOM7h-8/saporina	DOM7h-8 solo	Saporina sola
OD600 (placa recubierta con HAS)	0.311	0.060	0.079
OD600 (placa bloqueada con PBS-Tween al 2%)	0.078	0.068	0.075

Los resultados de este estudio demuestran que un fármaco puede estar conjugado con un fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero, y que el fragmento de enlace a antígeno conjugado mantiene la actividad de enlace a albúmina de suero. Además, debido a la estabilidad y resistencia de la interacción biotina-estreptavidina, los resultados muestran que los conjugados unidos covalentemente y no covalentemente se pueden preparar de forma tal que mantengan la actividad de enlace a albúmina de suero del fragmento de enlace a antígeno de un anticuerpo que se une a albúmina de suero.

Ejemplo 8. Conjugado de dAb/Fluoresceína Anti-SA

El isocianato de fluoresceína (FITC) puede estar entrecruzado

con grupos amino, sulfhidrilo, imidazolilo, tirosilo o carbonilo en una proteína. Tiene un peso molecular de 389 Da, el cual es comparable en tamaño a muchos fármacos. Los resultados obtenidos con este conjugado demuestran que el dAb anti-sa mantiene sus características de enlace a albúmina de suero cuando se acopla a una entidad química pequeña, e indica que los fármacos de molécula pequeña pueden ser conjugados con dAb anti-SA.

Se preparó DOM7h-8cys concentrado como se describe en el Ejemplo 7. Al dAb concentrado se le cambió el regulador a 50 mM de borato con pH 8 (regulador de acoplamiento) usando una columna desalinizante NAP5 (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ) y luego se concentró hasta 2.3 mg/mL usando un concentrador CENTRICON de 2 mL (Millipore Corp., MA). El FITC (Pierce Biotechnology Inc.) se diluyó hasta 10 mg/mL en dimetil formamida (DMF) de acuerdo con las instrucciones el fabricante y luego se mezcló con el dAb en regulador de acoplamiento en una proporción molar de 24:1 de FITC:dAb. Luego se dejó proseguir la reacción durante 30 minutos. En este punto, se eliminó de la reacción el exceso de FITC que no reaccionó, usando una columna desalinizante PD10 (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ) que fue equilibrada previamente con PBS, y se eluyó el conjugado de DOM7h-8cys/FITC con PBS.

Con el fin de confirmar que la reacción de acoplamiento de FITC/dAb fuera exitosa, se usó una prueba ELISA en sándwich para detectar el dAb acoplado. Se recubrió con albúmina de suero humana

(HSA) la mitad de los receptáculos de una placa para ELISA (Nunc, NY) de un día para otro a 10 μg/mL en un volumen de 100 μL por receptáculo. Después de la incubación de un día para otro, se lavó 3 veces la placa completa con PBS, Tween al 0.05% y luego todos los receptáculos fueron bloqueados durante 2 horas con Tween PBS al 2%. Después del bloqueo, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con DOM7h-8cys/FITC diluido hasta 1 μM en Tween PBS al 2%. Como controles en la misma placa para ELISA, se incubó un anticuerpo acoplado a FITC en 1 μM y DOM7h-8 no acoplado en 1 μM en Tween PBS al 2%. Otros controles adicionales fueron las mismas tres proteínas diluidas incubadas en receptáculos de la placa para ELISA no recubierta con HSA y bloqueada con Tween al 2%. Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubó durante 1 hora con una dilución 1/500 de anticuerpo anti FITC de rata (Serotec) diluido en Tween PBS al 2%. Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05%, y luego se incubó durante 1 hora con el anticuerpo de detección secundaria diluido en Tween PBS al 2% (conjugado de anti-Ig de rata HRP 1/5000). Después de la incubación, se lavó la placa 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y una vez con PBS se secó sobre papel con golpecitos de los dedos. El ELISA se desarrolló con 100 μL por receptáculo de 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato, y se detuvo la reacción con 50 μL por receptáculo de ácido clorhídrico 1M. La presencia de conjugados de DOM7h-8 y FITC se confirmó

comparando la OD600 del conjugado con la de cualquiera de las partes no conjugadas.

Tabla 7

	DOM7h-8/FITC	DOM7h-8 solo	Anticuerpo acoplado a FITC (control negativo)
OD600 (placa recubierta con HAS)	0.380	0.042	0.049
OD600 (placa bloqueada con PBS-Tween al 2%)	0.041	0.041	0.045

Ejemplo 9. Conjugados de dAb/péptido anti-SA

Muchos péptidos tienen efectos terapéuticos. Los péptidos modelo con una cisteína en el terminal N o C pueden ser acoplados a un dAb anti-albúmina de suero.

En este caso, para diferentes péptidos se usará: péptido 1 YPYDVPDYAKKKKKECC (SEQ ID NO:68); péptido 2 CKKKKKKYPYD VPDYA (SEQ ID NO:69); péptido 3 HHHHHHKKKKKKC (SEQ ID NO:70) y péptido 4: CKKKKKKHHHHHH (SEQ ID NO:71). Los péptidos 1 y 2 incluyen la secuencia de la etiqueta hemaglutinina (etiqueta HA) y los péptidos 3 y 4 incluyen la secuencia de la

etiqueta His. Los DOM7h-8cys concentrados se prepararán como se describe en el Ejemplo 7.

El dAb concentrado será reducido con 5 mM de ditiotreitol y luego se le cambiará el regulador por regulador de acoplamiento (20 mM de BisTris con pH 6.5, 5 mM de EDTA, glicerol al 10%) usando una columna de desalinización NAP5 (GE Healthcare/ Amersham Biosciences, NJ). Las cisteínas serán bloqueadas (para evitar que el dAb se dimerice con sí mismo) usando una concentración final de 5 mM de ditiodipiridina, la cual será añadida a la solución de dAb de una solución madre de 100 mM de ditiodipiridina en DMSO. El dAb y la ditiodipiridina se dejarán acoplar durante 20-30 minutos. Luego se eliminará la ditiopiridina que no ha reaccionado usando una columna de desalinización PD10 y el dAb será eluido en regulador de acoplamiento (20 mM de BisTris con pH 6.5, 5 mM de EDTA, glicerol al 10%). La proteína resultante será congelada entonces hasta que sea requerido.

Los péptidos 1-4 serán disueltos individualmente en agua con una concentración de 200 μM, serán reducidos usando 5 mM de DTT y luego serán desalados usando una columna de desalinización NAP5 (GE Healthcare/Amersham Biosciences, NJ). Cada péptido se añadirá luego a una solución de dAb reducida y bloqueada en una proporción de 20:1, para que ocurra el acoplamiento péptido-dAb. Con el fin de confirmar el éxito de las reacciones de acoplamiento péptido, dAb, se utilizará un ELISA en sándwich para detectar conjugados de dAb/péptido anti-SA .

La albúmina de suero humana será recubierta en una placa ELISA (Nunc, NY) de un día para otro a 10 μg/mL en un volumen de 100 μL por receptáculo. Después de incubación de un día para otro, la placa se lavará 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se bloqueará durante 2 horas con Marvel PBS al 4%. Después del bloqueo, la placa se lavará 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubará durante 1 hora con conjugados de DOM7h-8/péptido diluidos hasta 1 μM en Marvel PBS al 4%. Como controles en la misma placa para ELISA, se incubará péptido no acoplado en 20 μM y DOM7h-8 no acoplado en 1 μM, en MPBS al 4%.

Después de la incubación, la placa se lavará 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y luego se incubará durante 1 hora con una dilución 1/2000 de anticuerpo de cabra anti-HA (Abeam) para los péptidos 1 y 2, y una dilución 1/2000 de Ni NTA-HRP (para los péptidos 3 y 4) diluido en Marvel PBS al 4%. Después de la incubación, la placa se lavará 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y los receptáculos con el anticuerpo anti HA de cabra serán incubados durante 1h con anticuerpo secundario anti-HRP de cabra diluido 1/2000 en MPBS al 4% (otros receptáculos fueron bloqueados durante 1h). Después de la incubación, la placa se lavará 3 veces con PBS, Tween al 0.05% y una vez con PBS y luego se secarán con golpecitos de los dedos sobre papel. La prueba ELISA se desarrollará con 3,3',5,5'-tetrametilbencidina como sustrato, y la reacción se detendrá con ácido clorhídrico 1M. La presencia de conjugados de DOM7h-8/péptido se confirmará comparando la OD600 del conjugado con la

Tabla 8 Péptidos anticancerosos

Categoría de péptido	Secuencia de péptido	Acción/Aplicación

de cualquiera de las partes no conjugadas.

Agonistas y antagonistas de LH-RH	SEQ ID NO: 89 p-Glu-His-Trp-Ser-Tyr-Gly-Leu-Arg-Pro-Gly-NH2	Tratamiento de enfermedades malignas dependientes de hormona sexual
Péptido liberador de gastrina	SEQ ID NO:90 p-Glu-Gln-Arg-Leu-Gly-Asn-Trp-Ala-Val_gly_his-Leu-Met-NH2	Carcinoma de células pequeñas de pulmón
Somatostatina	SEQ ID NO: 91 p-Ala-Gly-Cys-Lys-Asn-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-Thr-Ser-Cys	Tumores (general)
GH-RH	SEQ ID NO: 92 Gln-Trp-Ala-Val-Gly-His-Leu-psi(CH2-NH)-Leu-NH2 (RC-3094	Tumor glioblastoma, tumor de próstata
VEGF	SEQ ID NO: 93 Arg-Arg-Lys-Arg-Arg-Arg-Arg	Carcinoma de colon humano
	SEQ ID NO: 94 Ala-Thr-Trp-Leu-Pro-Pro-Arg	Proliferación de células tumorales
	SEQ ID NO: 95 Arg-Thr-Glu-Leu-Asn-Val-Gly-Ile-Asp-Phe-Asn-Trp-Glu-Tyr-Pro-Ala-Ser-Lys	Proliferación y migración de células tumorales
	SEQ ID NO: 96 His-His-Glu-Val-Val-Lys-Phe-Mel-Asp-Val-Tyr-Gln	Inhibe respuestas de células endoteliales

	SEQ ID NO: 97 Asn-Ile-Thr-Val-Thr-Leu-Lys-Lys-Phe-Pro-Leu	Inhibidor de antiogénesis
EGF	SEQ ID NO: 98 Cys-His-Ser-Gly-Tyr-Val-Gly-Val-Arg-Cys	Inhibe la proliferación de células basada en EGF
	SEQ ID NO: 99 Tyr-Cys-Asp-Gly-Phe-Tyr-Ala-Cys-Tyr-Met-Asp-Val-Nh2	Se fija a HER2
IL-6	SEQ ID NO: 100 Gly-Gly-Cys-Lys-Leu-Trp-Thr-Ile-Pro-Glu-Cys-Gly-Gly	Inhibe el crecimiento celular
IL-8	SEQ ID NO: 101 Ala-Val-Leu-Pro-Arg	Inducción de apoptosis y efecto antitumoral *in vivo*
PDGF	SEQ ID NO: 102 Tyr-Gly-Arg-Pro-Arg-Glu-Ser-Gly-Lys-Lys-Arg-Lys-Arg-Lys-Arg-Leu-Lys-Pro-Thr	Inhibe el crecimiento de glioma maligno
TNF	SEQ ID NO: 103 acCys-Pro-s-er-Glu-Gly-Leu-Cys-NH2	Inhibe el crecimiento tumoral
	SEQ ID NO: 104 Ac-Cys-Pro-Ser-Glu-Gly-Thr-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Cys—NH2	
	SEQ ID NO: 105 Ac-Leu-Ala-Asn-Gly-Val-Glu	

650

	SEQ ID NO: 106 Pro-Gln-Ala-Glu-Gly-Gln-Leu-NH2	
	SEQ ID NO: 107 Val-Ala-Asn-Pro-Gln-Ala-Glu-Gly-Gln-Leu	
	SEQ ID NO: 108 Lys-Gly-Asp-Gln-Leu-Ser cíclica	
	SEQ ID NO: 109 Tyr-Ser-Cln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly cíclica	
Proteína alfa-feto	SEQ ID NO: 110 Glu-Met-Thr-Pro-Val-Asn-Pro-Gly	Inhibe células cancerosas de mama dependientes de estrógeno
Imitadores Sialil-Lewis	SEQ ID NO: 111 Ile-Glu-Leu-Leu-Gln-Ala-Arg	Inhibe colonización del pulmón por células tumorales
Activador de plasminógeno tipo uroquinasa	SEQ ID NO: 112 Cys-Val-Ser-Asn-Lys-Tyr-Phe-Ser-Asn-Ile-His-Trp-Cys	Antagonista de uPA/uPAR
	SEQ ID NO: 113 Phe-X-X-Tyr-Lys-Trp	Antagonista de uPA/uPAR
	SEQ ID NO: 114 Lys-Trp-X-X-Ar	Antagonista de uPA/uPAR
	SEQ ID NO: 115 Leu-Asn-Phe-Ser-Gln-Tyr-Leu-	Antagonista de uPA/uPAR

651

	SEQ ID NO: 116 Ac.Lys-Pro-Ser-Ser-Pro-Pro-Glu-Glu-NH2	Inhibe el avance y la angiogénesis tumoral
P53	SEQ ID NO: 117 Ac-Met-Pro-Arg-Phe-Met-Asp-Tyr-Trp-Glu-Gly-Leu-Asn-NH2	Inhibe la fijación de Hdm2 y p53
	SEQ ID NO: 118 Met-Val.Arg-Arg-Phe-Leu-Val-Thr-Leu-Arg-Ile-Arg-Arg-Ala-Cys-Gly-Pro-Pro-Arg-Val	Previene la ubiquitinación de p53
	SEQ ID NO: 119 Gly-Ser-Arg-Ala-His-Ser-Ser-His-Leu-Lys-Ser-Lys-Gly-Gln-Ser-Thr-Ser-Arg-His-Lys-Lys-Leu	Activa p53
P34cdc2	SEQ ID NO: 120 Cys-Ala-Phe-Tyr-Ile	Inhibe la interacción entre p34/p33 y pRb2 y p107
	SEQ ID NO: 121 Leu-Cys-Ala-Phe-Tyr-Ile-Met-Ala-Lys	
	SEQ ID NO: 122 Met-Cys-Ser-Met-Tyr-Gly-Ile-Cys-Lys	
Cdk2	SEQ ID NO: 123 Tyr-Ser-Phe-Val-His-Gly-Phe-Phe-Asn-Phe-Arg-Val-Ser-Trp-Arg-Glu-Met-Leu-Ala	Inhibe la interacción entre Cdk2 e histona H1

p21WAF1	SEQ ID NO: 124 Lys-Arg-Arg-Gln.Thr-Thr-Ser-Met-Thr-Ala-Phe-Tyr-His-Ser-Lys-Arg-Arg-Leu-Ile-Phe-Ser	Induce la detención del crecimiento de G1/S
	SEQ ID NO: 125 Lys-Arg-Arg-Leu-Ile-Phe-Ser-Lys	
	SEQ ID NO: 126 Phe-Leu-Asp-Thr-Leu-Val-Val-Leu-His-Arg	
Trascripción de E2F/DP	SEQ ID NO: 127 Arg-Cys-Val-Arg-Cys-Arg-Arg-Phe-Val-Val-Trp-Ile-Gly-Leu-Arg-Val-Arg-Cys-Leu-Val	Inhibió la función de E2F *in vitro*
	SEQ ID NO: 128 Leu-Asn-Trp-Ala-Trp-Ala-Ala-Glu-Val-Leu-Lys-Val-Gln-Lys-Arg-Arg-Ile-Tyr-Asp-Ile-Thr-Asn-Val	
	SEQ ID NO: 129 Leu-Glu-Gly-Ile-Gln-Leu-Ile-Ala-NH2	
	SEQ ID NO: 130 Phe-Trp-Leu-Arg-Phe-Thr	
	SEQ ID NO: 131 Trp-Val-Arg-Trp-His-Phe	
	SEQ ID NO: 132	

	SEQ ID NO: 133 Trp-His-Phe-Ile-Phe-Trp	
	SEQ ID NO: 134 Ile-Trp.Leu.Ser-Gly-leu-Ser-Arg-Gly-Val-Trp-Val-Ser-Phe-Pro	
	SEQ ID NO: 135 Gly-Ser-Arg-Ile-Leu.Thr-Phe-Arg-Ser-Gly-Ser-Trp-Tyr-Ala-Ser	
	SEQ ID NO: 136 Asp-Glu-LeuLys-Arg-Ala-Phe-Ala-Ala-Leu-Arg-Asp-Gln-Ile	
Bcl2	SEQ ID NO: 137 Lys-Lys-Leu-Ser-Glu-Cys-Leu-Lys-Lys-Arg-Ile-Gly-Asp-Glu-Leu-ASp-Ser	Dispara la apoptosis en un sistema libre de células
	SEQ ID NO: 138 Gly-Gln-Val-Gly-Arg-Gln-Leu-Ala-Ile-Ile-Gly-asp-Asp-Ile-Asn-Arg	
	SEQ ID NO: 139 Arg-Asn-Ile-Ala-Arg-His-Leu-Ala-Gln-Val-Gly-Asp-Ser-Met-Asp-Arg	
Integrinas	SEQ ID NO: 140 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH2	Inhibe la fijación de células tumorales a ECM

	SEQ ID NO: 141 Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NH2	
	SEQ ID NO: 142 Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg-NHCH3	
	SEQ ID NO: 143 Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg- N(CH3)2	
	SEQ ID NO: 144 Phe(pNH2)-Ile-Gly-Ser-Arg- NH2	
	SEQ ID NO: 145 Ac-Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg- NHCH(CH3)2	
	SEQ ID NO: 146 CO(Asp-TyrIle-Gly-Ser-Arg- NHPr)2	
	SEQ ID NO: 147 Arg-Gly-Asp	
	SEQ ID NO: 148 Tyr-Ile-Gly-Ser-Arg	
	SEQ ID NO: 149 Ile-Pro-Cys-Asn-Asn-Lys-Gly- Ala-HisSer-Val-Gly-Leu-Met- Trp-Trp-Met-leu-Ala-Arg	
Análogos de Angiostatina	SEQ ID NO: 150 Ser-Pro-His-Arg-Pro-Arg-Phe- Ser-Pro-Ala	

	SEQ ID NO: 151 Ser-Pro-His-Ala-His-Gly-Tyr-Ile-Pro-Ser	
	SEQ ID NO: 152 Thr-Pro-His-Thr-His-Asn-Arg-Thr-Pro-Glu	
	SEQ ID NO: 153 Thr-Pro-His-Arg-His-Gln-Lys-Thr-Pro-Glu	
	SEQ ID NO: 154 Glu-Pro-His-Arg-His-Ser-Ile-Phe-Thr-Pro-Glu	
Caderinas	SEQ ID NO: 155 Ac-Cys-His-Ala-Val-Cys-NH2	Inhibidor de antiogénesis
Histona Desacetilasa	SEQ ID NO: 156 Cys-Glu-Lys-His-Ile-Met-Glu-Lys-Ile-Gln-Gly-Arg-Gly-Asp-Asp-Asp-Asp	Inhibición de leucemia
MMP2	SEQ ID NO: 157 Cys-Thr-Thr-His-Trp-Gly-Phe-Thr-Leu-Cys	Metástasis tumoral

Ejemplo 10. Análisis de una composición de fármacos con GLP

La potencia de un agente insulinotrópico se puede determinar

calculando el valor de la EC50 a partir de la curva de dosis-respuesta. Las membranas plasmáticas purificadas de una línea celular transfectada estable, BHK467-12A (tk-tsl3), que expresa el receptor de GLP-1, serán estimuladas con GLP-1 y análogos de péptido, y la potencia de la producción de cAMP será medida usando el equipo para análisis de cAMP AlphaScreen™ de Perkin Elmer Life Sciences.

Se preparará una línea celular transfectada estable y un clon con alta expresión seleccionado para la detección. Luego las células serán cultivadas en CO2 al 5% en DMEM, FCS al 5%, Pen/Strep al 1% y 0.5 mg/mL de G418. Las células en una confluencia aproximada de 80% serán lavadas 2X con PBS y cosechadas con Versene, centrifugadas 5 min a 1000 rpm y se eliminará el supernadante. Los pasos adicionales se realizarán sobre hielo. Los gránulos de células serán homogeneizados mediante el Ultrathurax durante 20-30 seg en 10 mL de regulador 1 (20 mM de Na-HEPES, 10 mM de EDTA, pH 7.4), centrifugados durante 15 min a 20.000 rpm y los gránulos serán resuspendidos en 10 mL de regulador 2 (20 mM de Na-HEPES, 0.1 mM de EDTA, pH 7.4). La suspensión será homogeneizada durante 20-30 seg, y centrifugada durante 15 min a 20.000 rpm. La suspensión en regulador 2, homogenización y centrifugación serán repetidas una vez, y las membranas serán resuspendidas en regulador 2 y estarán listas para análisis adicional o serán almacenadas a -80°C.

El análisis del receptor funcional se llevará a cabo midiendo la

producción de cAMP inducida por el péptido mediante la tecnología AlphaScreen. El principio básico de la tecnología AlphaScreen es una competencia entre la cAMP endógena y la cAMP con biotina añadida exógenamente. La captura de cAMP se logra usando un anticuerpo específico conjugado con perlas aceptoras. La cAMP formada será contada y medida con un analizador de microplacas Alpha Fusion. Los valores de EC50 se calcularán usando el software Graph-Pad Prisme.

La resistencia de un péptido a la degradación por dipeptidil aminopeptidasa IV se puede determinar mediante el siguiente análisis de degradación: Se incubará alícuotas de los péptidos a 37 °C con una alícuota de dipeptidil aminopeptidasa IV purificada durante 4-22 horas en un regulador apropiado con un pH de 7-8 (regulador que no sea albúmina). Las reacciones enzimáticas se terminarán mediante la adición de ácido trifluoroacético, y los productos de degradación del péptido serán separados y cuantificados usando análisis con HPLC o LC-MS. Las mezclas se aplicarán en una columna Zorbax 300SB-C18 (poros de 30 nm, partículas de 5 um) de 150 x 2.1 mm y serán eluidas a una velocidad de flujo de 0.5 mL/min con un gradiente lineal de acetonitrilo en ácido trifluoroacético al 0.1% (0%-100% de acetonitrilo durante 30 min). Los péptidos y sus productos de degradación pueden ser vigilados por su absorbancia a 214 nm (uniones de péptido) o 280 nm (aminoácidos aromáticos), y serán cuantificados mediante integración de sus áreas pico. El patrón de degradación se puede

determinar usando LC-MS en donde los espectros de MS del pico se puedan determinar por separado. El porcentaje de compuesto intacto/degradado en un momento dado se usa para la estimación de la estabilidad de los péptidos con la DPPIV.

Un péptido se define como estabilizado para la DPPIV cuando éste es 10 veces más estable que el péptido natural basado en el porcentaje de compuesto intacto en un momento dado. Así, un compuesto de GLP-1 estabilizado para la DPPIV es al menos 10 veces más estable que el GLP-1 (7-37).

Estimulación de adenilato ciclasa

Se sembraron células BRIN-BD11 en placas de 24 receptáculos ($3x10^5$/receptáculo) y se cultivaron durante 48 h antes de ser pre incubadas en medio complementado con adenina tritiada (2mCi) durante 16 h. Las células serán lavadas dos veces con salina tamponada de Hank (HBS) fría y se le añadirá solución de prueba (400 uL; 37 °C). Luego, las células serán expuestas a concentraciones variables (10-10-10-5 M) de compuestos de GLP-1 en regulador HBS, en la presencia de 1mM de IBMX y 5.6 mM de glucosa (20 min; 37 °C). Después de la incubación, se sacarán las soluciones de prueba y se añadirá 300 uL de solución para lisis (5% de TFA, 3% de SDS, 5mM de ATP no marcado, y 300 μM de cAMP no marcada). Se utilizará Dowex y resinas de intercambio de alúmina para separar la cAMP de la adenina tritiada y del ATP en el lisado celular, tal como se describe en (Miguel JC, *et al.* Biochem. Pharmacol. 2003, 65:283).

Las respuestas secretorias de insulina pueden ser medidas en las células β BRIN- células BD11. Las células se sembrarán en placas de 24 receptáculos múltiples en una densidad de $1x10^5$/receptáculo, y se dejarán unir durante cultivo de un día para otro. Los estudios de liberación de insulina aguda serán precedidos por pre incubación durante 40 min a 37 °C en 1.0 mL de regulador de Krebs-Ringer bicarbonato (115 mM de NaCl, 4.7 mM de KCl, 1.28 mM de $CaCl_2$-$2H_2O$, 1.2 mM de KH_2PO_4, 1.2 mM de $MgSO_4$-H_2O, 10 mM de NaHCO, y 5 g/L de albúmina de suero bovina, pH 7.4) complementada con 1.1 mM de glucosa. Las incubaciones de prueba serán realizadas a 37 °C en la presencia de 5.6 mM de glucosa con una gama de concentraciones de compuestos de GLP-1 (10-12-10-6 M). Después de 20 min de incubación, el regulador será eliminada de cada receptáculo y se almacenará alícuotas a -20 °C para la medición de insulina.

Disminución de glucosa y actividad secretora de insulina en ratones diabéticos obesos (ob/ob)

La actividad biológica *in vivo* de los compuestos de GLP-1 se puede evaluar en ratones diabéticos obesos (ob/ob) de 12 a 16 semanas de edad. Los animales serán alojados individualmente en un cuarto con aire acondicionado a 22 ± 2 °C con un ciclo de 12 h de luz: 12 h de oscuridad. A los animales se les permitirá beber agua *ad libitum* y el acceso continuo a dieta de mantenimiento estándar para roedores. Los ratones se someterán a ayuno durante 18 h y se les administrará por vía intraperitoneal 8 mL/kg de peso corporal de

salina (9 g/L NaCl), glucosa sola (18 mM/kg de peso corporal), o en combinación con un compuesto de GLP-1 (25 nM/kg de peso corporal). Se recolectarán muestras de sangre en tubos micro centrífugos con fluoruro/heparina enfriados inmediatamente antes de la inyección, y a los 15, 30, y 60 min después de la inyección, y se almacenó el plasma obtenido a -20 °C.

Otros análisis

Se puede determinar los niveles de glucosa en plasma usando un analizador de glucosa Analox (Hammersmith, London, UK), el cual emplea el método de glucosa oxidasa (Stevens JF, Clin. Chim. Acta 1971, 32:199). Se puede analizar los niveles de insulina mediante inmunoanálisis radiactivo con carbón recubierto con dextrán (Flatt PR y Bailey CJ, Diabetologia 1981,20:573). Se puede calcular las áreas incrementales bajo glucosa en plasma y las curvas de insulina (AUC) usando el software GraphPad PRISM versión 3.0 (Graphpad Software, San Diego, CA, USA).

La actividad del compuesto de GLP-1 puede ser parte de la composición de fármacos de la presente invención siempre que el fármaco de GLP-1 sea capaz de enlazarse y de inducir señalización a través del receptor de GLP-1. El enlace al receptor de GLP-1 y la transducción de la señal se puede evaluar usando análisis *in vitro* tales como los que están descritos en Ejemplos 2, 3, y 4 de EP 619,322 y en los ejemplos 1, 2, y 3 de la patente estadounidense número 5,120,712, respectivamente (incorporada aquí mediante referencia).

Los estudios de farmacocinética se pueden realizar tal como se describe en Ejemplo 7 de WO 02/46227 (incorporada aquí mediante referencia).

Extensión de la vida media de los derivados de GLP-1 después de su administración i.v. o s.c.

La extensión de la vida media de los análogos de GLP-1 se puede determinar haciendo seguimiento a la concentración en plasma de ellos después de su administración s.c. a cerdos saludables. Para comparación, se puede hacer seguimiento a la concentración en plasma de GLP-1 (7-37) (activa natural de la forma de GLP-1 y usada como control) después de su administración s.c.

Las sustancias de prueba serán disueltas en un vehículo apropiado para su administración subcutánea o intravenosa. La concentración será ajustada de tal forma que el volumen de dosificación sea de aproximadamente 1 mL. El estudio será realizado en 12 mini cerdos Gottingen machos de Ellegaard Gottingen Minipigs ApS. Se permitirá un periodo de aclimatación de aproximadamente 10 días antes de que los animales entren en el estudio. Al inicio del periodo de aclimatación los mini cerdos serán de aproximadamente 5 meses de edad, y tendrán un rango de peso de 8-10 kg.

El estudio será realizado en una habitación apropiada para los animales con una temperatura ambiente establecida en 21-23°C y humedad relativa de aproximadamente 50%. La habitación será iluminada, para dar un ciclo de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La luz será desde las 06.00 hasta las 18.00 h. Los

animales serán alojados en corral. Los animales tendrán acceso libre al agua de beber con calidad doméstica durante el estudio, pero serán sometidos a ayuno desde aproximadamente 16.00 h el día anterior a la dosis hasta aproximadamente 12 horas después de la dosis. Los animales serán pesados al llegar y en los días de dosificación.

Los animales recibirán una sola inyección intravenosa o subcutánea. La inyección subcutánea será proporcionada en el lado derecho del cuello, aproximadamente 5-7 cm desde la oreja y 7-9 cm desde la mitad del cuello. Las inyecciones serán suministradas con un tapón en la aguja, dejando que se introduzca 0.5 cm de la aguja. Cada animal recibió una dosis de 2 nmol/kg de peso corporal. Seis animales recibieron una dosis por semana, mientras que los seis restantes descansaron.

Se obtendrá un perfil completo de concentración en plasma-tiempo de cada animal. Se recolectarán muestras de sangre de acuerdo con el siguiente programa: Después de administración intravenosa: Pre dosis (0), 0.17 (10 minutos), 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, y 120 horas después de la inyección. Después de administración subcutánea: Pre dosis (0), 0.5, 1, 2, 4, 6, 8, 12, 24, 48, 72, 96, y 120 horas después de la inyección.

En cada momento de muestreo, se extraerá 2 mL de sangre de cada animal. Las muestras de sangre se recolectarán en tubos de ensayo que contienen un regulador para su estabilización con el fin de evitar la degradación enzimática de los análogos de GLP-1. El

plasma será transferido inmediatamente a tubos micrónicos. Aproximadamente 200 μL plasma serán transferidos a cada tubo micrónico. El plasma se almacenó a -20°C hasta ser analizado para determinar el contenido de análogos de GLP-1 usando un inmunoanálisis.

Los perfiles de concentración en plasma-tiempo serán analizados mediante un análisis farmacocinético no compartimental. Se calcularán los siguientes parámetros farmacocinéticos en cada ocasión: AUC, AUC/Dosis, $AUC_{\%\ Extrap}$, C_{max}, t_{max}, λ_2, $t_{1/2}$, CL, CL/f, V_z, V_z/f y MRT.

Las composiciones de la invención también se pueden someter a prueba en cerdos daneses Landrace.

Los cerdos (50% Duroc, 25% Yorkshire, 25% Danish Landrace, aprox. 40 kg) serán sometidos a ayuno desde el inicio del experimento. A cada cerdo se le administrará 0.5 nmol de composición de prueba por kg de peso corporal en una solución isotónica de 50 pM (5 mM de fosfato, pH 7.4, Tween®-20 al 0.02% (Merck), 45 mg/mL de manitol (libre de pirógenos, Novo Nordisk). Se extrajeron muestras de sangre de un catéter en la vena yugular. Se vaciaron 5 mL de las muestras de sangre en vasos enfriados que contenían 175 μL de la siguiente solución: 0.18 M de EDTA, 15000 KIE/mL de aprotinina (Novo Nordisk) y 0.30 mM de Valina-Pirrolidida (Novo Nordisk), pH 7.4. Dentro de 30 min, las muestras serán centrifugadas durante 10 min a 5-6000*g. La temperatura se mantendrá a 4 °C. El supernadante será pipeteado en vasos

diferentes y mantenido a menos 20°C hasta su uso.

Las concentraciones en plasma de péptidos serán determinadas en una ELISA en sándwich o mediante RIA usando diferentes anticuerpos mono o policlonales. La selección de anticuerpos depende del análogo de GLP-1. El momento en el cual se logra la concentración pico en plasma varía dentro de amplios límites, dependiendo del análogo de GLP-1 particular seleccionado.

Procedimiento general de análisis para sándwich ELISA en placa para microtitulación de 96 receptáculos

Regulador de recubrimiento (PBS): Salina fosfatada regulada, pH7.2

Regulador de lavado (lavado con PBS): Salina fosfatada regulada, 0.05 % v/v de Tween 20, pH 7.2

Regulador de análisis (regulador BSA): Salina fosfatada regulada, 10 g/L de albúmina de suero bovino (Fluka 05477), 0.05 % v/v de Tween 20, pH 7.2

Regulador de estreptavidina: Salina fosfatada regulada, 0.5 M de NaCl, 0.05 % v/v de Tween 20, pH 7. 2

Patrón: Compuestos individuales en una matriz de plasma.

A-TNP: Anticuerpo inverso

AMDEX: Estreptavidina-rábano picante-peroxidasa (Amersham RPN4401V)

Sustrato TMB: 3,3',5,5'tetrametilbencidina (<0.02 %), peróxido de hidrógeno.

El análisis se puede llevar a cabo como sigue

(volumen/receptáculo):

1.) Recubrir con 100 uL de anticuerpo atrapador, en una cantidad de 5 ug/mL en regulador PBS, incubar de un día para otro, a 4 °C, lavar 5x con PBS, bloqueado con lavado de duración mínima de 30 minutos, luego vaciar la placa.

2.) 20 uL de muestra + 100 uL de anticuerpo detector biotinilado, en una cantidad de 1 ug/mL en regulador BSA con 10 ug/mL de A-TNP; incubar 2 h, a temperatura ambiente, en una mezcladora; lavar 5x con PBS, luego vaciar la placa.

3.) 100 μL de AMDEX 1:8000 en regulador estreptavidina, incubar 45-60 minutos, a temperatura ambiente, en una mezcladora; lavar 5x con PBS, luego vaciar la placa.

4.) 100 μL de sustrato TMB, incubar a temperatura ambiente en una mezcladora; detener la reacción con 100 μL de H_3PO_4 4 M. Leer la absorbencia a 450 nm con 620 nm como referencia. La concentración en las muestras se puede calcular a partir de las curvas estándar.

Procedimiento general de análisis para RIA.

Regulador DB: 80 mM de regulador fosfatado, 0.1 % de albúmina de suero humana, 10 mM de EDTA, 0.6 mM de tiomersal, pH 7.5.

Regulador FAM: 40 mM de regulador fosfatado, albúmina de suero humana al 0.1 %, 0.6 mM de tiomersal, pH 7.5.

Carbón: 40 mM de regulador fosfatado, 0.6 mM de tiomersal, plasma bovino al 16.7%, 15 g/L de carbón activado, pH 7.5 (mezclar

la suspensión mínimo durante 1 h antes de su uso a 4 °C)

Patrón: Compuestos individuales en una matriz de plasma.

El análisis se llevará a cabo tubos Minisorp de 12x75 mm (volumen/tubo) como sigue:

	Regulador DB	muestra	Anticuerpo	FAM	Trazador	Carbón	H_2O
Dia 1							
Total					100 µl		
NSB	330 µl			100 µl			
muestra	300 µl	30 µl	100 µl		100 µl		
Mezcla, incubada de un día para otro a 4°C Día 2							
Total							1.5ml
NSB						1.5ml	
muestra						1.5ml	

Mezclar e incubar 30 min a 4 °C. Centrifugar a 3000 rpm durante 30 min e inmediatamente después, transferir los supernadantes a nuevos tubos, cerrar con tapón y contar en contador gamma durante 1 minuto. La concentración en las muestras se calculará a partir de las curvas estándar individuales.

Análisis con radio receptor de GLP-1 (RRA):

El análisis con radio receptor de GLP-1 es un análisis de enlace de ligando radiométrico usando partículas para formación de imágenes LEAD*seeker*. El análisis está compuesto de fragmentos de membrana que contienen el receptor de GLP-1, análogos no marcados de GLP-1, GLP-1 humana marcada con ^{125}I y partículas PS

LEAD*seeker* recubiertas con aglutinina de germen de trigo (WGA). La GLP-1 fría y marcada con ^{125}I competirá por la unión al receptor. Cuando las partículas LEAD*seeker* se añaden, ellas se enlazarán a residuos de carbohidratos en los fragmentos de membrana por medio de los residuos de WGA. La proximidad entre las moléculas de ^{125}I y las partículas de LEAD*seeker* ocasiona la emisión de luz desde las partículas. El LEAD*seeker* formará la imagen de la luz emitida y ésta será correlacionada de manera reversible con la cantidad de análogo de GLP-1 presente en la muestra.

Reactivos y materiales

Pre tratamiento de plasma animal: Se tratará el plasma animal con calor durante 4 h a 56 °C y se centrifugará a 10,000 rpm durante 10 minutos. Después de esto, se añadirá Val-Pyr (10 μM) y aprotenina (500 KIE/mL) y se almacenará a -18 °C hasta su uso.

Patrones de análogos de GLP-1: Se fortalecerá a los análogos de GLP-1 en plasma tratado con calor para producir líneas de dilución que abarcan desde aproximadamente 1 μM hasta 1 pM.

Regulador para análisis RRA de GLP-1: 25 mM de Na-HEPES (pH 7.5), 2.5 mM de $CaCl_2$, 1 mM de $MgCl_2$, 50 mM de NaCl, 0.1% de ovalbúmina, 0.003% de Tween 20, 0.005% de bacitracina, 0.05% de NaN_3.

Suspensión del receptor de GLP-1: Se purificará a los fragmentos de membrana del receptor de GLP-1 de células de riñón de hámster bebé (BHK) que expresan el receptor de GLP-1 humano. Se almacena a - 80°C hasta su uso.

Perlas para formación de imágenes LEAD*seeker* de poliestireno acopladas con WGA (RPNQ0260, Amersham): Las perlas serán reconstituidas con regulador para análisis RRA de GLP-1 hasta una concentración de 13.3 mg/mL. La suspensión de membrana del receptor de GLP-1 se añadirá entonces y se incubará fría (2-8 °C) durante al menos 1 h antes de su uso.

Materiales

^{125}I-GLP- 1 (7-36) amida (Novo Nordisk A/S). Almacenada a -18°C hasta su uso.

Etanol 99.9% vol (De Dansk Sprotfabrikker A/S). Almacenado a -18°C hasta su uso.

Multiscreen® Solvinert 0.45 μm placa hidrofóbica PTFE (MSRPN0450, Millipore Corp.).

Placas de 384 receptáculos de polipropileno (No. de cat. 781075, Greiner Bio-One).

Aparatos:

Mezcla para placa horizontal

Centrífuga con un conjunto de rotor de placa para microtitulación con cubo oscilante.

Concentrador para muestras UltrVap, Drydown (Provair).

Sistema de formación de imágenes multimodalidad LEAD*seeker*® (Amersham)

Procedimiento:

Preparación de la muestra: Montar la placa para filtro Multiscreen® Solvinert en una placa receptora comparable química

(es decir, placas de polipropileno), para recolectar el filtrado.

Añadir 150 μL de etanol al 99.9% enfriado con hielo en los receptáculos vacíos de la placa con filtro MultiScreen Solvinert, seguido por 50 μL de calibrador o muestra de plasma. Colocar la tapa para almacenamiento en la placa filtrante e incubar durante 15 minutos a 18-22 °C en una mezcladora de placa horizontal.

El filtro y placa receptora ensamblados, con la tapa, s colocarán en un conjunto de rotor de placa para microtitulación con cubo oscilante estándar. El filtrado será recolectado en los receptáculos vacíos de la placa receptora a 1500 rpm durante 2 minutos. El filtrado se secará usando el UltraVap con N_2 calentado (40°C) durante 15 minutos. El material seco será reconstituido añadiéndole 100 μL de regulador para análisis RRA de GLP-1 en cada receptáculo. Esto será incubado durante 5 minutos en una mezcladora horizontal.

Radio análisis del receptor de GLP-1: Use el siguiente esquema de pipeteo y placas de poliestireno blancas de 384 receptáculos:

1. 35μL de regulador para análisis RRA de GLP-1.
2. 5μL de filtrado reconstituido
3. 10 μL de ^{125}I-GLP-1 (7-36)amida. La solución madre fue diluida en regulador para análisis RRA de GLP-1 RRA hasta 20,000 cpm/receptáculo antes de su uso.
4. 15 μL de fragmentos de membrana del receptor de GLP-1 (0.5 μg/receptáculo) recubierto previamente en perlas para formación

de imágenes de WGA-poliestireno LEAD*seeker* (0.2 mg/receptáculo).

Las placas serán selladas e incubadas de un día para otro a 18-22 °C. La emisión de luz de cada receptáculo será detectada usando el sistema de formación de imágenes multimodalidad LEAD*seeker* con una duración de 10 minutos.

Estimulación de formación de cAMP en una línea celular que expresa el receptor de GLP-1 humano clonado.

Se estimulará a membranas de plasma purificadas de una línea celular transfectada estable, BHK467-12A (tk-tsl3), que expresa el receptor de GLP-1 humano, con GLP-1 y análogos de péptido, y se medirá la potencia de la producción de cAMP usando el equipo para análisis de cAMP AlphaScreen™ de Perkin Elmer Life Sciences.

Se preparará una línea celular transfectada estable y se seleccionará un clon con alta expresión para la exploración. Las células se cultivarán con 5% de CO_2 en DMEM, FCS al 5%, Pen/Strep al 1% y 0. 5 mg/mL de G418.

Las células con una confluencia aproximada de 80% serán lavadas 2X con PBS y recolectadas con Versene, se centrifugarán 5 min a 1000 rpm y se eliminará el supernadante. Los pasos adicionales serán realizados todos en hielo. El granulado de células será homogeneizado por el Ultrathurax durante 20-30 seg. en 10 mL de regulador 1 (20 mM Na-HEPES, 10 mM EDTA, pH 7.4), se centrifugará 15 min a 20,000 rpm y se re suspenderá el granulado en 10 mL de regulador 2 (20 mM de Na-HEPES, 0.1 mM de EDTA, pH 7.4). La suspensión será homogeneizada durante 20-30 seg y

centrifugada 15 min a 20.000 rpm. La suspensión en regulador 2, homogenización y centrifugación, se repetirán una vez que las membranas sean resuspendidas en regulador 2 y estén listas para análisis adicional o almacenadas a -80 °C. El análisis de receptor funcional se llevará a cabo midiendo la producción de cAMP inducida por el péptido mediante la tecnología AlphaScreen. El principio básico de la tecnología AlphaScreen es una competencia entre cAMP endógena y cAMP con biotina añadida exógenamente. La captura de cAMP se logrará utilizando un anticuerpo específico conjugado con perlas aceptoras. Las cAMP formadas serán contadas y medidas en un analizador de microplacas Alpha Fusion. Los valores de EC_{50} se calcularán usando el software Graph-Pad Prisme.

Ejemplo 11. Expresión bacteriana de una fusión genética de péptido 1 similar al glucagón y de iDom7h-8 usando el conductor GAS.

Se clonó GLP-1 (7-37), con el glutamato en la posición 9 reemplazado por prolina ([Pro^9] GLP-1(7-37)), como una fusión con iDOM7h-8 (una mutación P96E por numeración Kabat en CDR3) en el vector pET 12a con un conductor GAS (Véase WO 05/093074). El reemplazo del glutamato en el GLP-1 con prolina 9 reemplazo fue con el fin de hacer al GLP-1 parte de la fusión resistente a la degradación por escisión con dipeptidil peptidasa IV (DPPIV) (Brian D. Green *et al.* (2003) *Metabolic Stability, Receptor Binding, cAMP Generation, Insulin secretion and Antihyperglycaemic Activity de Novel terminal N Glu9-substituted Analogues of Glucagon-like-*

peptide-1 : Biol. Chem. (384) 1543-1555). En total, se elaboraron tres construcciones, una sin enlazante, una con aminoácidos PSS entre [Pro^9]GLP-1(7-37) y iDOM7h-8 y una con aminoácidos PSSGAP entre [Pro^9]GLP-1(7-37) y iDOM7h-8 (se muestra en la figura 16 como la forma enlazadora a albúmina Dom7h-8). La expresión fue en células BL21 DE3 Plys S a 30°C durante 48 horas usando TB Readymix (Novagen) para autoinducción de expresión de un día para otro antes de la recuperación del supernadante por centrifugación. La fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37) iDom7h-8 fue purificada a partir del supernadante utilizando captura por afinidad sobre proteína L-agarosa. Luego se lavó la resina con 10 volúmenes de columna de PBS y se enlazó la proteína eluida con 0.1 M de glicina con pH de 2. La fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37)-iDom7h-8 se cargó luego en el regulador glicina, en una columna de intercambio catiónico (columna S de 1 mL, GE healthcare) que se equilibró previamente con 20 mM de regulador citrato con un pH de 6.2. La elución fue con un gradiente de 0 - 50% del mismo regulador suplementado con NaCl 1 M. Se recolectaron los picos y se determinó el tamaño de las proteínas mediante electroforesis con SDS PAGE. Los picos con proteína del tamaño esperado fueron agrupados y se les cambió el regulador por PBS. Se confirmó la identidad de la proteína mediante espectrometría de masa y secuenciación en el terminal N.

Ejemplo 12. Determinación de la actividad de la fusión de [Pro^9] GLP-1(7-37)-PSSGAP-iDOM7h-8 en GLP-1

Con el fin de confirmar que la fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37)-

PSSGAP-iDOM7h-8 demostraba actividad en GLP-1, la fusión fue sometida a dos diferentes análisis biológicos. En el primer análisis, la línea celular de insulinoma de rata RINm5f (desarrollada en 1980 por Gadzar *et al.* a partir de insulinoma de rata trasplantable inducido con rayos X) se incubó con concentraciones variables (10 pM hasta 0.1 μM) de GLP-1 y la fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37)-PSSGAP-iDOM7h-8 durante 60 min. Adicionalmente, se agregó un análisis de un solo punto de exendina 4, un análogo de GLP-1 resistente a la degradación por dipeptidil peptidasa IV, y análisis único con regulador de un solo punto, como controles. Si bien las células de rata RTNm5f respondieron débilmente a la glucosa, cuando se expusieron a nutrientes o a no secretagogos, mostraron respuestas secretoras similares a las de las células beta. Por lo tanto, los efectos de los compuestos en la proliferación celular fueron evaluados midiendo los niveles incorporados de 5-bromo-2'-desoxiuridina (BrdU) durante síntesis de ADN en células proliferantes usando el sistema ELISA para proliferación de células (Amersham, Little Chalfont, UK) véase la figura 17. Usando OD450 para medir los niveles de ADN, hubo un aumento en el nivel de ADN dependiente de la dosis, con niveles aumentados de fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37)-PSSGAP-iDOM7h-8 hasta una concentración de 100 nM de la fusión. El GLP-1 también demostró la respuesta esperada dependiente de la dosis.

En el segundo análisis, se incubaron células RINm5f con concentraciones variables (10 pM hasta 0.1 μM) de GLP-1 y la fusión

de [Pro^9]GLP-1(7-37)-PSSGAP-iDOM7h-8 en 5.6 mM de glucosa durante 60 min. Adicionalmente, un análisis de un solo punto de exendina 4, un análogo de GLP-1 resistente a la degradación por DPPIV y un análisis único de un solo punto con regulador Krebs-Ringer bicarbonato (KRB) se agregaron como controles. La secreción de insulina se analizó después de la incubación durante 60 min a 37 °C usando regulador GLP-1 suplementado con regulador KRB, 3A23 o exendina 4. Se recolectó el medio, se centrifugó y el supernadante se analizó para determinar la concentración de insulina usando radioinmunoanálisis. La concentración de insulina se normalizó para la cantidad de células dentro de cada receptáculo. Luego se graficó la concentración de insulina (medida en ng/mL/h) contra la concentración del compuesto. Hubo un aumento dependiente de la dosis en la liberación de insulina con dosis en aumento de la fusión de [Pro^9]GLP-1(7-37)-PSSGAP-iDOM7h-8 hasta una concentración de fusión de 10 nM (véase la figura 18). Esto concuerda con los datos publicados sobre el GLP-1 solo.

Ejemplo 13. Expresión bacteriana de una fusión genética de péptido 1 similar al glucagón y iDom7h-8 usando el conductor OMP-T.

Se prepararon nuevamente las mismas tres construcciones descritas en el ejemplo 11 (una sin enlazante, una con aminoácidos PSS entre [Pro^9]GLP-1(7-37) y iDOM7h-8 y una con aminoácidos PSSGAP entre [Pro^9]GLP-1(7-37) y iDOM7h-8) con el conductor OMP-T. Para mayor claridad, el orden de los elementos en la

construcción fue conductor OMP-T, [Pro^9] GLP-1, enlazante (en donde fuera apropiado) y el iDom7h-8. La expresión fue en las células BL21 DE3 Plys S a 25 °C durante 4 horas en medio TB inducido con 0.5 mM de IPTG con OD 16 antes de la recuperación de las células del granulado de células por centrifugación. Las proteínas secretadas fueron recuperadas luego mediante preparación periplásmica. Las fusiones de GLP-1 iDom7h-8 fueron purificadas a partir de la fracción periplasmática usando captura por afinidad en proteína L-agarosa. Luego se lavó la resina con 10 volúmenes de columna de PBS y la proteína enlazada se eluyó con 0.1 M de glicina con pH 2. Luego se cargó la fusión de [Pro]^{9}JGLP-1(7-37) en el regulador de glicina, en una columna de intercambio catiónico (columna S de 1 mL, GE Healthcare) que estaba equilibrada previamente con 20 mM de regulador citrato con pH de 6.2. La elución fue con un gradiente de 0 - 50% del mismo regulador complementado con NaCl 1M. En este caso, el lavado de la columna con 20 mM de regulador citrato con un pH de 6.2 (0% NaCl) condujo al fluido a través de de la banda del tamaño esperado, y por ello fue concentrado usando una columna de 5K de vivaspina (Vivascience).

Ejemplo 14. Expresión de una fusión genética de péptido 1 similar al glucagón y de iDom7h-8 en *Pichia pastoris*.

La construcción de fusión de [Pro^9]GLP-1-PSS-iDOM7h-8 (tal como se describe en la figura 16b, pero usando iDom7h-8) será clonada en el vector pPICz*α* tanto solo como con una extensión EAEA en el terminal N y transformada en KM71h de *Pichia pastoris*.

La proteína será expresada (i) usando inducción con metanol durante 4 días a 30°C; y (ii) usando inducción con metanol durante 2 días a 25°C. El supernadante será recuperado mediante centrifugación y se verificará el tamaño de la proteína en un gel SDS PAGE.

Se espera que las fusiones tengan el tamaño correcto mediante SDS Page y que sean activas en el análisis de GLP-1 tal como se describe en Ejemplo 10 y en Ejemplo 12.

Ejemplo 15. Expresión de péptido 1 similar al glucagón y de iDom7h-8 en cuerpos de inclusión BL21 DE3 de *E. coli.*

Las mismas fusiones descritas en el ejemplo 11 serán clonadas en el vector de expresión pET21 (Novagen), el cual está diseñado para expresión de proteína en el citoplasma. Opcionalmente, se incluirá un sitio de escisión de proteasa en las construcciones entre un término N sacrificial y el HAP... del [Pro^9]GLP-1(7-37). Esto permitirá que la proteína sea digerida para asegurar un término N totalmente originario. Las enzimas que se podría utilizar para esto incluyen Factor Xa, trombina o DPP1. Luego la proteína será expresada en altos niveles en células BL21(DE3) con inducción por IPTG y se acumularán en cuerpos de inclusión intracelulares. Los cuerpos de inclusión serán aislados de células BL21 y solubilizados en guanidina HCl. Después de la reducción, los cuerpos de inclusión serán replegados en un sistema de regulación con combinación redox (Buchner, J., Pastan, I. y Brinkmann, U. (1992). *A method for increasing the yield of properly folded recombinant fusion proteins. Anal. Biochem.* 205, 263-270. Después de replegarse, la proteína

será dializada y concentrada en una columna de vivaspina de 5K (Vivascience) y purificada en una columna S (GE healthcare).

Se espera que las fusiones tendrán el tamaño correcto mediante SDS Page y serán activas en un análisis de GLP-1 tal como se describe en el ejemplo 10 y en el ejemplo 12.

Ejemplo 16. Expresión de péptido 1 similar al glucagón y de un Dom7h-8 en mamíferos

La construcción de fusión de [Pro^9]GLP-1-PSS-DOM7h-8 (tal como se describe en la figura 16b) será clonada en el vector de expresión PcDNA(-) usando péptido señal secretora murino para promover la secreción de la proteína traducida en los medios, se preparará 1 mg de ADN de *E. coli* usando lisis alcalina (equipo Mega Prep, Qiagen, CA) y será transfectada en 1.5 L de células HEK293 en medio de Eagle modificado con Dulbecco (Gibco) para una expresión de proteína transitoria. La proteína se expresará incubando el cultivo a 37° durante 5 días y se recuperará el supernadante (que contiene la proteína expresada) por centrifugación. La fusión de [Pro^9]GLP-1-PSS-DOM7h-8 será purificada a partir de la fracción periplásmica usando captura por afinidad en proteína L-agarosa. Luego la resina será lavada con 10 volúmenes de columna de PBS y la proteína enlazada será eluida con 0.1 M de glicina con pH2. Luego se cagará la proteína en el regulador glicina, en una columna de intercambio catiónico (columna S de 1 mL, GE healthcare) equilibrada previamente con 20 mM de regulador citrato con un pH de 6.2. La elución será con un gradiente

de 0 - 50% del mismo regulador complementado con NaCl 1 M. La proteína del tamaño correcto en un gel SDS-PAGE será concentrada entonces usando una columna de vivaspina de 5K (Vivascience) y se cambiará el regulador por PBS para análisis biológico.

Ejemplo 17. expresión de Péptido YY fusionado con un Dom7h-8 en *E.coli*

El péptido YY (3-36) (PYY: secuencia de aminoácidos ID No. 167 secuencia de ácido nucleico ID No. 168 KPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY) inhibe la absorción de alimentos en seres humanos y tiene una vida media en plasma corta (10-30min). Éste se libera en respuesta a un alimento y actúa por medo del Y2R en el núcleo arqueado para regular fisiológicamente la absorción de alimentos. El PYY será clonado en el vector pET GAS (WO 05093074) colindante con el DOM7h-8 (véase las figuras 20a y 20b, las cuales muestran el péptido en el terminal C y en el terminal N del DOM7h-8, respectivamente.) La expresión será en células BL21 DE3 Plys S a 25 °C durante 4 horas en medio TB inducido con 0.5 mM de IPTG antes de la recuperación del granulado de células por centrifugación. Las proteínas secretadas serán recuperadas luego mediante preparación periplásmica. La fusión de PYY Dom7h-8 se purificará a partir de la fracción periplasmática usando captura por afinidad en proteína L-agarosa. Luego se lavará la resina con 10 volúmenes de columna de PBS y la proteína enlazada será eluida con glicina 0.1 M con pH 2 y se purificará adicionalmente mediante intercambio iónico. Se

cambiará el regulador de la proteína purificada por PBS mediante diálisis, concentrado en una columna de vivaspina de 5K (Vivascience) y sometido a análisis biológico para medir la estimulación de liberación de cAMP como se describe en (Goumain *et al.* (2001) *The peptide YY-Preferring Receptor Mediating Inhibition de Small Intestinal Secretion Is a Peripheral Y_2 Receptor: Pharmacological Evidence and Molecular Cloning:* Molecular pharmacology: 60 124-134). De manera resumida, las células de la cripta intestinal aisladas en 200 μg de proteína/mL serán incubadas bajo agitación continua durante 45 min a 15 °C en 0.5 mL de salina regulada fosfatada, pH 7.0, con un contenido de 1.4% (w/v) de albúmina de suero bovino, 0.1% de acitracina, y 0.2 mM de 3-isobutil-1-metilxantina (TBMX) como se describe en (Servin *et al.* (1989): *Peptide-YY and neuropeptide-Y inhibit vasoactive intestinal peptide-stimulated adenosine 3',5'-monophosphate production in rat small intestine: structural requirements of peptides for interacting with PYY-preferring receptors. Endocrinology* 124: 692- 700). Se añadirá PYY solo o fusión de PYY-Dom7h-8 junto con un potente estimulante fisiológico de producción de cAMP en enterocitos (por ejemplo, VIP). La reacción se iniciará añadiendo células y será detenida después de 45 min añadiéndole 50 μL de ácido perclórico 11M. Después de centrifugación durante 10 min a 4,000 g, la cAMP presente en el supernadante será succinilada, y su concentración se medirá mediante radio inmunoanálisis como se describe en (Laburthe *et al.*, (1982) *Alpha-adrenergic inhibition of cyclic AMP accumulation*

in epithelial cells isolated from rat small intestine. Biochim Biophys Acta 721: 101-108).

Se espera que la fusión sea del tamaño esperado y que mostrará actividad de PYY equivalente a la de los controles que no están en fusión.

Ejemplo 18. Expresión de una fusión de péptido YY Dom7h-8 GLP-1, en *E. coli*

Una fusión de [Pro^{9}]GLP-1(7-37)-DOM7h-8-PYY (véase la figura 19c) será clonada en el vector pET GAS y luego expresada como se describe para el PYY Dom7h-8 en el ejemplo 17. Después de la purificación, la fusión será analizada para determinar la actividad biológica tanto de PYY como de GLP-1 de acuerdo con los análisis descritos en el ejemplo 17 y en el ejemplo 12 respectivamente.

Se espera que las fusiones serán del tamaño esperado y que mostrarán actividad de PYY y de GLP-1 equivalente a la de los controles que no están en fusión.

Si bien esta invención ha sido mostrada y descrita particularmente con referencias a modalidades preferidas de ella, las personas con habilidades en la técnica entenderán que se puede hacer diversos cambios en la forma y detalles en ella, sin apartarse del alcance de la invención comprendido por las reivindicaciones anexas.

REIVINDICACIONES

1. Una fusión de fármaco que tiene la fórmula:

$a\text{-}(X)_{n1}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(Z)_{n3}\text{-}d$ o $a\text{-}(Z)_{n3}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(X)_{n1}\text{-}d$,

en donde

X es un agente insulino trópico o un análogo de él;

Y es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero;

Z es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de enlace para un objetivo;

a, b, c y d son independientemente un polipéptido que contiene desde uno hasta aproximadamente 100 residuos de aminoácido o está ausente;

n1 es desde uno hasta aproximadamente 10;

n2 es desde uno hasta aproximadamente 10; y

n3 es desde cero hasta aproximadamente 10.

2. La fusión de la reivindicación 1, caracterizada además porque el X o cada X es GLP-1(7-37), GLP-1(7-36) amida, [Ser^8]GLP-1(7-36)amida [Pro^9]GLP(7-37) o un análogo de él.

3. La fusión de cualquier reivindicación precedente, caracterizada además porque n1 y n3 son ambos uno, y n2 es desde dos hasta aproximadamente 10.

4. La fusión de cualquier reivindicación precedente,

caracterizada además porque el Y o cada Y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO:11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

5. La fusión de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 4, en donde en y o cada Y contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO:17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

6. Una fusión de fármaco que contiene fracciones X' y Y', en donde X' es GLP-1 o un análogo de él; y

Y' es un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero.

7. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, en donde X' está ubicado amino terminalmente con relación a Y'.

8. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, en donde Y' está ubicado amino terminalmente con relación a X'.

9. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, 7 u 8, caracterizada además porque dichos V_H y V_L tienen especificidad de enlace para albúmina de suero humana.

10. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, en donde Y' contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que

consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:12, SEQ ID NO:13, SEQ ID NO:14, SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25 y SEQ ID NO:26.

11. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, en donde Y' contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

12. Un conjugado de fármaco que contiene un dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero; y GLP-1 o un análogo de él que está unido covalentemente a dicho V_H o V_L.

13. El conjugado de fármaco de la reivindicación 12, caracterizado además porque el conjugado de fármaco contiene un solo V_H.

14. El conjugado de fármaco de la reivindicación 12, caracterizado además porque el conjugado de fármaco contiene un solo V_L.

15. El conjugado de fármaco de la reivindicación 12, 13 o 14, caracterizado además porque dicho GLP-1 o análogo está unido covalentemente a dicho V_H o V_L a través de una fracción enlazante.

16. El conjugado de fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 12 hasta 15, que contiene uno o más fármacos

diferentes unidos covalentemente a dicho V_H o V_L.

17. El conjugado de fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 12 hasta 16, caracterizado además porque dicho dominio variable de cadena pesada de inmunoglobulina (V_H) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, o dicho dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de enlace para albúmina de suero, contiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 10, SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, SEQ ID NO: 14, SEQ ID NO: 15, SEQ ID NO:24, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26, SEQ ID NO: 16, SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 18, SEQ ID NO: 19, SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 y SEQ ID NO:23.

18. Un ácido nucleico recombinante que codifica la fusión de fármaco de la reivindicación 1 o de la reivindicación 6.

19. Una construcción de ácido nucleico que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 18.

20. Una célula hospedera que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 18.

21. Un método para producir una fusión de fármaco que comprende mantener la célula hospedera de la reivindicación 20 bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicho ácido nucleico recombinante, mediante el cual se produce una fusión de fármaco.

22. Una composición farmacéutica que contiene una fusión de fármaco de la reivindicación 1 o de la reivindicación 6, o el

conjugado de fármaco de la reivindicación 12 y un portador aceptable fisiológicamente.

23. Un conjugado o fusión de fármaco que contiene un agente insulinotrópico y un fragmento de anticuerpo que se une a un antígeno, en donde el antígeno actúa para aumentar la vida media del conjugado o fusión de fármaco *in vivo*.

24. El conjugado o fusión de fármaco de la reivindicación 23, caracterizado además porque el fármaco es un fármaco de proteínas de fusión que contiene el agente insulinotrópico péptido unido al fragmento de anticuerpo.

25. El fármaco de la reivindicación 24, en donde el agente insulinotrópico está fusionado al fragmento de anticuerpo por medio de una fracción enlazante de péptido.

26. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 23 hasta 25, en donde el antígeno es albúmina de suero.

27. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 23 hasta 26, en donde el agente insulinotrópico es un péptido similar al glucagón.

28. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 23 hasta 27, en donde el agente insulinotrópico se selecciona del grupo que consiste en GLP-1, análogo de GLP-1, exendina 3, un análogo de exendina 3, exendina 4 y un análogo de exendina 4.

29. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 12 y 28, caracterizado además porque el GLP-1 o análogo contiene una secuencia de aminoácidos que es al menos 80% homóloga con

respecto a una secuencia seleccionada del grupo que consiste en SEQ ID NO: 157 o 159.

30. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 12 y 28, caracterizado además porque el análogo de GLP-1 contiene Gly^{10}, Thr^{12}, Asp^{14}, Phe^{27} e Ile^{29}.

31. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 29 y 30, en donde el análogo de GLP-1 difiere de SEQ ID NO: 157 o SEQ ID NO: 159 en no más de 6 aminoácidos.

32. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 12 y 28, que contiene un dominio variable simple específico para albúmina de suero (SA), que tiene una constante de disociación (K_d) desde 1 nM hasta 500 μM para SA, según se determina mediante resonancia de plasmón superficial.

33. El fármaco de la reivindicación 32, caracterizado además porque el dominio específico para SA se enlaza a SA en un análisis de enlace de ligando estándar con una IC50 desde 1 nM hasta 500 μM.

34. El fármaco de la reivindicación 23, que contiene 2, 3 o 4 fracciones de agente insulinotrópico (IA).

35. El fármaco de la reivindicación 34, que contiene IA-IA'-AF o IA-$(AF)_n$-IA', en donde IA y IA' son los mismos o diferentes agentes insulinotrópicos, y AF es un fragmento de anticuerpo como se describe en la reivindicación 23, y n es igual a 1, 2, 3, 4, o 5.

36. El fármaco de la reivindicación 35, que contiene [GLP-1]-[AF]-[GLP-1] o [GLP-1]-[GLP-1]-[AF].

37. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones precedentes, que contiene un agente anti saciedad.

38. El fármaco de la reivindicación 37, en donde el agente anti saciedad se selecciona del grupo que consiste en PYY, un análogo de PYY, PYY (3-36).

39. El fármaco de la reivindicación 37 o 38 que contiene IA-$(AF)_n$-$(IA')_x$-[agente anti saciedad] o, [agente anti saciedad]-$(IA')_x$-$(AF)_n$-IA, en donde n es igual a 1, 2, 3, 4, o 5, y x es igual a cero, 1, 2, 3, 4, o 5.

40. El fármaco de cualquier reivindicación precedente, que tiene un t1/2 alfa de entre 1 y 6 horas.

41. El fármaco de cualquier reivindicación precedente, que tiene un t1/2 beta de entre 12 y 60 horas.

42. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1, 6, 12 y 23, que además contiene un agente seleccionado del grupo que consiste en insulina, exendina 4, exendina 3, PYY (3-36), resistina, leptina, antagonista de MC3R/MC4R, antagonista de AgRP, apolipoproteína A-IV, enterostatina, péptido liberador de gastrina (GRP), IGF1, BMP-9, IL-22, Reg IV, interferón alfa, péptido INGAP, somatostatina, amilina, neurulina, interferón beta, híbridos de interferón, adiponectina, endocanabinoides, péptido C, WNT10b, Orexina-A, adrenocorticotrofina, enterostatina, colecistoquinina, oxintomodulina, hormonas estimuladoras de melanocitos, melanocortina, hormona concentradora de melanina, BB-2, agonistas de NPY Y2, antagonistas de NPY Y5/Y1, OXM, antagonistas de Gal-

1R, antagonistas de MCH-1R, agonistas de MC-3/4, agonistas de BRS-3, polipéptido pancreático, fragmento de anticuerpo anti-Ghrelina, factor neurotrófico de origen cerebral, hormona de crecimiento humana, hormona paratirioidea, hormona estimuladora de folículo, péptido inhibidor gástrico o un análogo de ellos.

43. Un fármaco que contiene GLP-1 o un análogo de él y una fracción de proteína que contiene un sitio de enlace a antígeno, en donde el sitio de enlace a antígeno se une a un antígeno que actúa para aumentar la vida media del conjugado de fármaco *in vivo*, con la condición de que la fracción de proteína no sea un péptido que tenga de 10 a 30 aminoácidos.

44. Una fusión de fármaco que contiene GLP-1 o un análogo de él y una fracción de proteína que contiene un sitio de enlace a antígeno, en donde el sitio de enlace a antígeno se une a un antígeno que actúa para aumentar la vida media del conjugado de fármaco *in vivo*.

45. Un fármaco de la reivindicación 43 o 44, en donde el GLP o análogo es GLP-1(7-37), GLP-1(7-36)amida, [Ser^8]GLP-1(7-36)amida, [Pro^9]GLP-1(7-36), [Pro^9]GLP-1(7-37) o un análogo de él.

46. Un fármaco de la reivindicación 45, caracterizado además porque el análogo de GLP tiene un péptido en el terminal C seleccionado de la lista que consiste en PSS, PSSGAP o PSSGAPPPS.

47. Un fármaco de la reivindicación 43, 44, 45 o 46, caracterizado además porque dicho antígeno es albúmina de suero.

48. Un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 43 hasta 47, que contiene una fracción de proteína simple.

49. Un ácido nucleico recombinante que codifica el fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 43 hasta 48.

50. Una construcción de ácido nucleico que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 49.

51. Una célula hospedera que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 49.

52. Un método para producir una fusión de fármaco, que comprende mantener la célula hospedera de la reivindicación 51 bajo condiciones apropiadas para la expresión de dicho ácido nucleico recombinante, mediante el cual se produce una fusión de fármaco.

53. Una composición farmacéutica que contiene un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 43 hasta 48 y un portador aceptable fisiológicamente.

LISTADO DE SECUENCIAS

GLP-1 (7-37)

Aminoácido

HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGRG - SEQ ID NO:158

Secuancia de Nucleótidos

ca tgctgaaggg acctttacca gtgatgtaag ttcttatttg gaaggccaag ctgccaagga attcattgct tggctggtga aaggccgagg a SEQ ID NO:159

GLP-1 (7-36)

HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGR SEQ ID NO:160

ca tgctgaaggg acctttacca gtgatgtaag ttcttatttg gaaggccaag ctgccaagga attcattgct tggctggtga aaggccga - SEQ ID NO:161

Exedina-4

HGE GTFTSDLSKQ MEEEAVRLFI EWLKNGGPSS GAPPPS - SEQ ID NO:162

catggt gaaggaacat ttaccagtga cttgtcaaaa cagatggaag aggaggcagt gcggttattt attgagtggc ttaagaacgg aggaccaagt agcggggcac ctccgccatc g - SEQ ID NO:163

Oxitomudilina

HSQGTFTS DYSKYLDSRR AQDFVQWLMN TKRNRNNIA - SEQ ID NO: 164

cattcac agggcacatt caccagtgac tacagcaagt atctggactc caggcgtgcc caagattttg tgcagtggtt gatgaatacc aagaggaaca ggaataacat tgcc - SEQ ID NO: 165

Exedina-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS - SEQ ID NO:166

catagtga tggaacattt accagtgact tgtcaaaaca gatggaagag gaggcagtgc ggttatttat tgagtggctt aagaacggag gaccaagtag cggggcacct ccgccatcg - SEQ ID NO:167

PYY (3-36)

IKPEAPGEDA SPEELNRYYA SLRHYLNLVT RQRY - SEQ ID NO:168

Atcaaacccg aggctcccgg cgaagacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at - SEQ ID NO: 169

Peptido inhibidor Gastrico

YAEGTFISD YSIAMDKIHQ QDFVNWLLAQ KGKKNDWKHN ITQ - SEQ ID NO: 170

tacgcggaa gggactttca tcagtgacta cagtattgcc atggacaaga ttcaccaaca agactttgtg aactggctgc tggcccaaaa ggggaagaag aatgactgga aacacaacat cacccag - SEQ ID NO: 171