Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

Organizacion CSA Ltda
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
INVENTARIO

DVN
NOV

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

21. EXPEDIENTE No. 07-58600

54. TITULO **"ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY"**

51. CLASIFICACION INTERNACIONAL C07K 16/46

71. SOLICITANTE **DOMANTIS LIMITED**

DOMICILIO Middlesex, Inglaterra

74. REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE
T.P. 53.215

22. BOGOTA, D.C. 8 JUN 2007

(FORMA P 10)

PETITORIO

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-058600- -00000-0000
Fecha: 2007-06-08 16:26:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 342

FORMULARIO UNICO DE SOLICITUD DE PATENTE PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

(1) SOLICITUD DE:

☒ Patente de Invención ☐ Patente de Modelo de Utilidad

☐ Capítulo I. ☒ Capítulo II.

(2) SOLICITANTE (71)

Nombre: **DOMANTIS LIMITED**

Dirección: 980 Great West Road Brentford, Middlesex, TW8 9GS, Inglaterra

Nacionalidad o Domicilio: Middlesex, Inglaterra.

Lugar de Constitución:

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701
E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACION

C.C. ☐ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número _____

(3) REPRESENTANTE O APODERADO

Nombre: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**

Dirección: Calle 72 No. 5-83, Piso 5º,
Bogotá- Colombia

Teléfono: 3264270 Fax: 6069701

E-mail: jllcco@lloredacamacho.com

C.C. ☒ NIT ☐
C.E. ☐ Otro ☐

Cual _____

Número 39.690.713 TP 53.215

(4) INVENTOR(ES) (72)

Nombre: HOLMES, Steve; HOLT, Lucy J.; JESPERS, Laurent, S. y TOMLINSON, Ian, M.

Dirección: 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG.

Nacionalidad o Domicilio: Inglaterra.

(5) PCT (86)

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/004599 Fecha: 30/11/05

Publicación Internacional No. WO 2006/059106 A3 Fecha: 08/06/06

(6) Título (54) ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY

(7) Clasificación Internacional (51) C07K 16/46

(8) Prioridad SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen	(32) Fecha	(31) Número de Solicitud
US	02.12.2004	60/632,361
GB	31.05.2005	0511019.2

Comprobante de Pago No. 07-39,413 **Fecha:** 16 de Mayo de 2007

(10) **ANEXOS**

- [x] Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud.
- [ ] Documento que acredita la existencia y representación legal cuando el solicitante sea persona jurídica.
- [ ] Documento de Representación Legal.
- [ ] Documento de cesión del inventor al solicitante o a su causante.
- [ ] Declaraciones.
- [ ] Copia de la solicitud internacional. (resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- [x] Traducción de la solicitud internacional al castellano. (resumen, descripción, reivindicaciones y dibujos)
- [x] Copia del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [x] Traducción del reporte preliminar internacional sobre patentabilidad.
- [ ] De ser el caso, copia del contrato de acceso.
- [ ] De ser el caso, documento que acredite la licencia o autorización de uso de conocimientos tradicionales de las comunidades indígenas.
- [ ] Arte Final 12X12.
- [ ] De ser el caso, información sobre otras solicitudes de patente o títulos obtenidos en el extranjero por el mismo titular o su causante, relacionados parcial o totalmente con la invención de esta solicitud.
- [ ] De ser el caso, modificaciones efectuadas a la solicitud internacional.
- [x] Otros: Reporte de Búsqueda Internacional con su traducción, Publicación con su traducción, Notificación Registro de un cambio con su traducción, Capítulo Reivindicatorio como fue originalmente presentado en Fase Internacional con su traducción, Opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción, Anexo Explicativo de Modificaciones a las Reivindicaciones y listado de secuencias.

(11) **FIGURA CARACTERISTICA:**

(12) Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE: ALICIA LLOREDA RICAURTE

FIRMA:

C.C. 39.690.713 Usaquén T.P. 53.2

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT : 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA : 07 - 39,413
FECHA : MAYO 16 DE 2007

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 07-058600- -00000-0000
Fecha: 2007-06-08 16:26:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 342

***** 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 POPULAR	050-00110-6	55092725	16/05/2007	9,461,800.00

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

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	1 TRAMITES DE SOL. DE PATENTE DE IN	482,000.00
		TOTAL : $	482,000.00

SON: CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE : _____

RECIBO DE CAJA APLICADO AL EXPEDIENTE No. _____

2

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISION DE NUEVAS CREACIONES
EXTRACTO PARA PUBLICACIÓN
SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCIÓN PCT

(21) N° de solicitud:	(51) Int Cl: **C07K 16/46**
22) Fecha de solicitud: **08-06-07**	(71)Solicitante(s) **DOMANTIS LIMITED**
	(72) Inventor(es) HOLMES, Steve; HOLT, Lucy J.; JESPERS, Laurent, S. y TOMLINSON, Ian, M.
(30) Prioridad (31) ***No. Prioridad*** 32) ***Fecha*** (33) ***País***	
60/632,361 02-12-04 US	
0511019.2 31-05-05 GB	(74) Apoderado: **ALICIA LLOREDA RICAURTE**
(85) Fecha limite inicio fase nacional: *02-07-07*	(87) Publicación internacional
(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT	Fecha: ***08-06-06***
Fecha de presentación de la solicitud: ***30-11-05***	N° publicación: ***WO2006/059106 A3***
No. de solicitud ***PCT/GB2005/004599***	

(54) Titulo: **ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY**

Resumen - Reivindicación(es):

Reivindicación número 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.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES
PCT
REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
(PCT Artículo 18 y Reglas 43 y 44)

Registro de referencia del solicitante o agente	**PARA FUTURAS ACCIONES** ver Forma PCT/ISA/220 así como, donde aplique, el ítem 5 a continuación.	
P59452L-WO		
Solicitud internacional No.	Fecha de registro internacional *(día/mes/año)*	Fecha de Prioridad (Primera) *(día/mes/año)*
PCT/GB2005/004599	30/11/2005	02/12/2004
Solicitante		
DOMANTIS LIMITED		

Este Reporte de Búsqueda Internacional ha sido preparado por esta Autoridad de Búsqueda Internacional y es transmitido al solicitante Según el Artículo 18. Una copia será transmitida a la Oficina Internacional.

Este Reporte de Búsqueda Internacional consta de un total de 9 hojas.

☒ También está acompañado de una copia de cada documento técnico anterior citado en este reporte.

1. **Bases del reporte**

a. Respecto al **lenguaje**, la búsqueda internacional se llevó a cabo según:

☒ la solicitud internacional en el lenguaje en el cual se presentó,

☐ la traducción de la solicitud internacional en_____ , el cual es el lenguaje de la traducción proporcionada para el propósito de la búsqueda internacional (Reglas 12.3 (a) y 23.1(b)).

b. ☒ Respecto a una secuencia de **ácido nucleótido y/o amino revelado** en la solicitud internacional, ver casilla I.

2. ☒ **Ciertas reivindicaciones no pudieron localizarse** (Ver Recuadro II).

3. ☐ **Falta unidad de invención** (ver Recuadro III).

4. Respecto al **título,**

☐ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☒ Esta Autoridad ha establecido que el texto se lea así:

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

5. Respecto al **resumen,**

☒ El texto es aprobado según lo presenta el solicitante.

☐ Esta Autoridad ha establecido el texto de acuerdo con la Norma 38.2(b), según aparece en el Recuadro IV. El solicitante puede, un mes después de la fecha de haber enviado por correo este reporte de búsqueda internacional, presentar comentarios a esta Autoridad.

6. Respecto a los **dibujos,**

a. la figura de los **dibujos** que se publicará con el resumen es la Figura No. _____

☐ como lo sugirió el solicitante.

☐ como lo sugirió la Autoridad, porque el solicitante no sugirió una figura.

☐ como lo sugirió la autoridad, porque esta figura caracteriza mejor a la invención-

b. ☒ Ninguna de las figuras se publicara en el resumen.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL Solicitud internacional No.

PCT/GB2005/004599

Casilla No. I Nucleótido y/o secuencia(s) aminoácida(s) (continuación del item 1.b de la primera hoja)

1. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, la búsqueda internacional se ha establecido según:

a. tipo de material:

☒ un listado de secuencia
☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

b. formato de material:

☒ en formato escrito
☒ en formato legible por computador

c. tiempo de presentación/suministro:

☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

2. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

A. CLASIFICACION DE MATERIA
INV. C07K16/46 C07K16/44 A61K47/48 A61P1/00 A61P3/10

Según la Clasificación de Patentes Internacional (CPI) o según la clasificación nacional y la CPI

B. CAMPOS BUSCADOS

Documentación mínima buscada (sistema de clasificación seguido de símbolos de clasificación)
C07K A61K

Documentación buscada fuera de documentación mínima hasta donde dichos documentos se incluyan en los campos buscados

Base de datos electrónica consultada durante la búsqueda internacional (nombre de la base de datos y, donde sea práctico, buscar términos usados)

EPO-Interno, BIOSIS, Dato WPI, PAJ, Secuencia de búsqueda,

C. DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	GREEN B D ET AL: "Los novedosos análogos de la péptido-1 (7-36) amida resistentes a la dipeptidil peptidasa IV tienen actividades biológicas preservadas in vitro lo que le da una acción mejorada de disminución" JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 31, no. 3, Diciembre 2003 (2003-12), páginas 529-540, XP002398089 ISSN: 0952-5041 resumen ----	1-61
Y	WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 de abril de 2003 (2003-04-03) resumen ---- -----	1-61

☒ En el recuadro C se enumeran más documentos.

☒ En el anexo se enumeran miembros de la familia de patentes.

° Categorías especiales de documentos citados:

'A' documento que define el estado general de la técnica el cual no se considera de relevancia

'E' documento anterior pero publicado en o después de la fecha de presentación internacional

'L' documento que puede arrojar dudas sobre reivindicaciones de prioridad o que se cita para establecer la fecha de publicación de otra citación u otra razón especial (según se especifica)

'O' documento que se refiere a una revelación oral, uso, exhibición u otros medios

'P' documento publicado antes de la fecha de presentación internacional pero después de la fecha de prioridad reivindicada

'T' documento posterior publicado después de la fecha de presentación internacional o fecha de prioridad y que no está en conflicto con la solicitud pero citado para entender el principio o teoría que sustenta la invención

'X' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse nueva o no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se toma solo

'Y' documento de relevancia particular; la invención reivindicada no puede considerarse que comprende un paso inventivo cuando el documento se combina con uno o más documentos, siendo dicha combinación obvia para una persona experta en la técnica

'&' documento miembro de la misma familia de patentes

Fecha de la terminación real de la búsqueda internacional	Fecha de envío por correo del reporte de búsqueda internacional
4 de Octubre de 2006	03/11/2006
Nombre y dirección de correo de ISA/ European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL-2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax:(+31-70) 340-3018	Funcionario autorizado Lechner, Oskar

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	WO 03/057235 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 17 de Julio de 2003 (2003-07-17) resumen ----	1-61
Y	WO 02/46227 A (ELI LILLY AND COMPANY; GLAESNER, WOLFGANG; MICANOVIC, RADMILLA; TSCHAN) 13 Junio de 2002 (2002-06-13) documento completo ----	1-61
Y	GREEN BRIAN D ET AL:"Estabilidad metabólica, enlace a receptores, generación de cAMP, secreción de insulina y actividad antihiperglicémica de los novedosos de la peptido-1 tipo glucanón N-termina Glu-9 sustituidos" BIOLOGICAL CHEMESTRY, vol. 384, no. 12, Diciembre 2003 (2003-12), páginas 1543-1551, XP009035148 ISSN: 1431-6730 resumen -----	1-61
Y	GREEN B D ET AL: "La sustitución de LyS9 por Glu 9 en la peptido-1 (7-36) amida tipo glucagón le confiere resistencia a la dipeptidil peptidasa IV, con acciones metabólicas y celulares similares a aquellas de los antagonistas establecidos de la peptido-1 (9-36) amida tipo glucagón y exendina (9-39)" METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL, vol. 53, no. 2, Febrero 2004 (2004-02), páginas 252-259, XP002398090 ISSN: 0026-0495 resumen ------	1-61
Y	GREEN B D ET AL: "La modificación N-terminal con H1s7 de la peptido-1 (7-36) amida tipo glucagón genera análogos estables de la dipeptidil peptidasa IV con actividad antihiperglicémica potente" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 180, no. 3, Marzo 2004 (2004-03), páginas 379-388, XP002398091 ISSN: 0022-0795 resumen	1-61
Y	EP 0 619 322 A (PFIZER INC; SCIOS INC) 12 de Octubre de 1994 (1994-10-12) citado en la solicitud documento completo	1-61

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
Y	SERVIN A L ET AL " EL PEPTIDO YY Y EL NEUROPÉPTIDO-Y INHIBEN LA PRODUCCIÓN DE AMP-ESTIMULADA POR PÉPTIDO INTESTINAL VASO ACTIVO EN INTESTINO DELGADO DE RATA. REQUISITOS ESTRUCTURALES DE LAS PÉPTIDOS PARA INTERACTUAR CON LOS RECEPTORES PREFERENTES DEL PÉPTIDO YY" ENDOCRINOLOGY, vol. 124, no. 2, 1989, páginas 692-700, XP009072022 ISSN: 0013-7227 resumen	1-61 1-61

Y	US 5 120 712 A (HABENER ET AL) 9 de Junio de 1992 (1992-06-09) citado en la solicitud documento completo	1-61

Y	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 de enero de 2004 (2004-01-08) documento completo	1-61

Y	WO 2004/041867 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; VAECK, MARK; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, PAU) 21 de mayo de 2004 (2004-05-21) resumen página 16, líneas 16-31	1-61

Y	WO 2004/041862 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; LAUWEREYS, MARC; DE HAARD, HANS) 21 de mayo de 2004 (2004-05-21) documento completo	1-61

A	MEIER J J ET AL: " PÉPTIDO 1 TIPO GLUCAGÓN COMO REGULADOR DE LA CAPTACIÓN DE LIMENTOS Y PESO CORPORAL: PERSPECTIVAS Y TERAPÉUTICAS" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 de abril de 2002 (2002-04-12), páginas 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999 documento completo	1-61

A	WO 91/01743 A (CEMU BIOTEKNIK AB) 21 de febrero de 1991 (1991-02-21) documento completo	1-61

A	WO 01/45746 A (GENENTECH, INC; DELANO, WARREN, L; DENNIS, MARK, S; LOWMAN, HENRY, B) 28 de junio de 2001 (2001-06-28) documento completo	

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

C. (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES

Categoría °	Citación de documento, con indicación, donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	DENNIS MARK S ET AL: "Unión o albumina como una estrategia general para mejorar la farmacocinética de las proteínas" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 de septiembre de 2002 (2002-09-20), páginas 35035-35043, XP002285300 ISSN: 0021-9258 documento completo ----	1-61
A	WO 03/002609 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL; WINTER, GREG; IGNATOVICH, OLGA; TOMLINSON, I) 9 de enero de 2003 (2003-01-09) documento completo ----	1-61
A	EP 1 378 520 A (INSTITUTE OF GENETICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; BEIJING ABT GENETI) 7 de enero de 2004 (2004-01-07) documento completo -----	1-61
A	HOLT L J ET AL: "Anticuerpos de dominio: proteínas para terapia" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, Noviembre 2003 (2003-11), páginas 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 resumen página 488 ------	1-61
P, A	LEE SANG-HEON ET AL:" Síntesis, caracterización y estudios farmacocinéticos del péptido-1- tipo glucagón, pegilado" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 16, no. 2, 23 de febrero y 2005 (2005-02-23), páginas 377-382, XP002398436 ISSN: 1043-1802 resumen ---	1-61
P, A	SHECHTER ET AL " La pegilación reversible del péptido YY3-36 prolonga su inhibición de la captación de comida en ratones" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 579, no. 11, 25 de abril de 2005 (2005-04-25), páginas 2439-2444, XP005390209 ISSN: 0014-5793	1-61

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud internacional No.
PCT/GB2005/004599

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del Item 2 de la primera hoja)

Este reporte de búsqueda internacional no ha sido establecido respecto a ciertas reivindicaciones bajo el Artículo 17(2)(a) por las siguientes razones:

1. ☒ Reivindicaciones Nos.:
porque se relacionan con un asunto que no es necesario que esta Autoridad busque, a saber:
Aunque las reivindicaciones 54-58 están dirigidas a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido basada y llevada a cabo en los efectos allegados de los efectos del compuesto/composición

2. ☐ Reivindicaciones Nos.:

porque se relacionan con partes de la solicitud internacional que no cumplen con los requisitos prescritos hasta tal grado que no se puede llevar a cabo una búsqueda internacional significativa, específicamente:

3. ☐ Reivindicaciones No.:
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6.4(a).

Casilla No. III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del Item 3 de la primera hoja)

Esta Autoridad de Búsqueda Internacional encontró invenciones múltiples en esta solicitud internacional, así:

1. ☐ Puesto que todos los derechos de búsqueda adicionales requeridos fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre todas las reivindicaciones investigables.

2. ☐ Puesto que todas las reivindicaciones investigables pudieron investigarse sin esfuerzo que justifique derechos adicionales, esta Autoridad no solicitó pago de derechos adicionales.

3. ☐ Puesto que sólo algunos de los derechos de búsqueda adicionales fueron pagados oportunamente por el solicitante, este informe de búsqueda internacional cubre únicamente aquellas reivindicaciones para las cuales se pagaron derechos, específicamente las reivindicaciones Nos.:

4. ☐ El solicitante no pagó oportunamente los derechos de búsqueda adicionales requeridos. Por consiguiente, este informe de búsqueda internacional se restringe a la primera invención mencionada en las reivindicaciones; está cubierto por las reivindicaciones Nos.:

Comentario sobre Protesta ☐ Los derechos de búsqueda adicionales estuvieron acompañados por la protesta del solicitante.
☐ El pago de los derechos de búsqueda adicionales no estuvo acompañado por una protesta.

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

información sobre miembros familias de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 03026591	A	03-04-2003	BR	0212985 A	30-08-2005
			CA	2461345 A1	03-04-2003
			CN	1596119 A	16-03-2005
			EP	1499277 A2	26-01-2005
			JP	2005508324 T	31-03-2005
			MX	PA04002751 A	08-09-2005
WO 03057235	A	17-07-2003	AU	2003201998 A1	24-07-2003
WO 0246227	A	13-06-2002	AU	2689702 A	18-06-2002
			BR	0116024 A	13-12-2005
			CA	2434237 A1	13-06-2002
			CN	1483041 A	17-03-2004
			EA	5584 B1	28-04-2005
			EP	1355942 A2	29-10-2003
			HR	20030455 A2	31-08-2004
			HU	0302529 A2	28-10-2003
			JP	2004528014 T	16-09-2004
			MX	PA03005036 A	05-09-2003
			NO	20032565 A	01-08-2003
			NZ	525577 A	27-05-2005
			PL	366208 A1	24-01-2005
			SK	6702003 A3	03-08-2004
			ZA	200303642 A	12-08-2004
EP 0619322	A	12-10-1994	AT	314393 T	15-01-2006
			AU	682328 B2	02-10-1997
			AU	5501694 A	13-10-1994
			BR	9401185 A	18-10-1994
			CA	2116478 A1	08-10-1994
			CN	1544084 A	10-11-2004
			CN	1106698 A	16-08-1995
			CZ	9400275 A3	17-05-1995
			DE	69434588 T2	07-09-2006
			ES	2255051 T3	16-06-2006
			HU	68525 A2	28-06-1995
			IL	108611 A	20-06-2004
			JP	7002695 A	06-01-1995
			JP	2001158749 A	12-06-2001
			JP	2004099621 A	02-04-2004
			JP	2006213727 A	17-08-2006
			KR	186885 B1	01-05-1999
			NO	940436 A	10-10-1994
			NZ	250844 A	26-03-1996
			PL	180697 B1	30-03-2001
			RU	2126264 C1	20-02-1999
			ZA	9400878 A	10-08-1995
US 5120712	A	09-06-1992	NINGUNA		
WO 2004003019	A	08-01-2004	AT	328906 T	15-06-2006
			CA	2492092 A1	08-01-2004
			CN	1678634 A	05-10-2005
			EP	1517921 A2	30-03-2005
			JP	2006512895 T	20-04-2006
WO 2004041867	A	21-05-2004	AU	2003283137 A1	07-06-2004
			AU	2003286002 A1	07-06-2004

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

información sobre miembros familias de patentes

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda		Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes		Fecha de publicación
WO 2004041867	A		AU	2003286003 A1	07-06-2004
			AU	2003286004 A1	07-06-2004
			BR	0316092 A	27-09-2005
WO 2004041862	A	21-05-2004	WO	2004041865 A2	21-05-2004
			WO	2004041863 A2	21-05-2004
			CA	2505316 A1	21-05-2004
			CA	2505325 A1	21-05-2004
			CA	2505326 A1	21-05-2004
			JP	2006519763 T	31-08-2006
			MX	PA05004955 A	17-11-2005
WO 9101743	A	21-02-1991	AT	107514 T	15-07-1994
			AU	652124 B2	18-08-1994
			AU	6143990 A	11-03-1991
			CA	2064689 A1	02-02-1991
			DE	69010206 D1	28-07-1994
			DE	69010206 T2	13-10-1994
			EP	0486525 A1	27-05-1992
			JP	4507242 T	17-12-1992
			JP	3477196 B2	10-12-2003
			SE	509359 C2	18-01-1999
			SE	8902638 A	02-02-1991
WO 0145746	A	28-06-2001	AT	337403 T	15-09-2006
			AU	784285 B2	02-03-2006
			AU	2458701 A	03-07-2001
			CA	2390691 A1	28-06-2001
			EP	1240337 A2	18-09-2002
			JP	2003518075 T	03-06-2003
WO 03002609	A	09-01-2003	CA	2447851 A1	09-01-2003
			EP	1399484 A2	24-03-2004
			JP	2005504524 T	17-02-2005
			US	2004219643 A1	04-11-2004
EP 1378520	A	07-01-2004	CA	2443705 A1	24-10-2002
			WO	02083738 A1	24-10-2002
			CN	1380341 A	20-11-2002
			JP	2005501517 T	20-01-2005
			US	2005175606 A1	11-08-2005

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

(PCT Article 18 and Rules 43 and 44)

Applicant's or agent's file reference P59452L-WO	FOR FURTHER ACTION	see Form PCT/ISA/220 as well as, where applicable, item 5 below.
International application No. PCT/GB2005/004599	International filing date *(day/month/year)* 30/11/2005	(Earliest) Priority Date *(day/month/year)* 02/12/2004
Applicant DOMANTIS LIMITED		

This international search report has been prepared by this International Searching Authority and is transmitted to the applicant according to Article 18. A copy is being transmitted to the International Bureau.

This international search report consists of a total of 9 sheets.

[X] It is also accompanied by a copy of each prior art document cited in this report.

1. **Basis of the report**
   a. With regard to the **language**, the international search was carried out on the basis of:
      [X] the international application in the language in which it was filed
      [ ] a translation of the international application into _____, which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   b. [X] With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application, see Box No. I.

2. [X] **Certain claims were found unsearchable** (See Box No. II)

3. [ ] **Unity of invention is lacking** (see Box No III)

4. With regard to the **title**,
   [ ] the text is approved as submitted by the applicant
   [X] the text has been established by this Authority to read as follows:

   BISPECIFIC DOMAIN ANTIBODIES TARGETING SERUM ALBUMIN AND GLP-1 OR PYY

5. With regard to the **abstract**,
   [X] the text is approved as submitted by the applicant
   [ ] the text has been established, according to Rule 38.2(b), by this Authority as it appears in Box No. IV. The applicant may, within one month from the date of mailing of this international search report, submit comments to this Authority

6. With regard to the **drawings**,
   a. The figure of the drawings to be published with the abstract is Figure No. _____
      [ ] as suggested by the applicant
      [ ] as selected by this Authority, because the applicant failed to suggest a figure
      [ ] as selected by this Authority, because this figure better characterizes the invention
   b. [X] none of the figures is to be published with the abstract

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

   a. type of material

   [X] a sequence listing

   [ ] table(s) related to the sequence listing

   b. format of material

   [X] on paper

   [X] in electronic form

   c. time of filing/furnishing

   [ ] contained in the international application as filed

   [ ] filed together with the international application in electronic form

   [X] furnished subsequently to this Authority for the purpose of search

2. [X] In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/GB2005/004599

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
INV. C07K16/46 C07K16/44 A61K47/48 A61P1/00 A61P3/10

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
C07K A61K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)
EPO-Internal, BIOSIS, WPI Data, PAJ, Sequence Search

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	GREEN B D ET AL: "Novel dipeptidyl peptidase IV resistant analogues of glucagon-like peptide-1(7-36)amide have preserved biological activities in vitro conferring improved glucose-lowering action in vivo." JOURNAL OF MOLECULAR ENDOCRINOLOGY, vol. 31, no. 3, December 2003 (2003-12), pages 529-540, XP002398089 ISSN: 0952-5041 abstract	1-61
Y	WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 April 2003 (2003-04-03) abstract	1-61

-/--

[X] Further documents are listed in the continuation of Box C. [X] See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier document but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
4 October 2006	03/11/2006

Name and mailing address of the ISA/	Authorized officer
European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax: (+31-70) 340-3018	Lechner, Oskar

9

Form PCT/ISA/210 (second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	WO 03/057235 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 17 July 2003 (2003-07-17) abstract	1-61
Y	WO 02/46227 A (ELI LILLY AND COMPANY; GLAESNER, WOLFGANG; MICANOVIC, RADMILLA; TSCHAN) 13 June 2002 (2002-06-13) the whole document	1-61
Y	GREEN BRIAN D ET AL: "Metabolic stability, receptor binding, cAMP generation, insulin secretion and antihyperglycaemic activity of novel N-terminal Glu9-substituted analogues of glucagon-like peptide-1." BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 384, no. 12, December 2003 (2003-12), pages 1543-1551, XP009035148 ISSN: 1431-6730 abstract	1-61
Y	GREEN B D ET AL: "Lys9 for Glu9 substitution in glucagon-like peptide-1(7-36)amide confers dipeptidylpeptidase IV resistance with cellular and metabolic actions similar to those of established antagonists glucagon-like peptide-1(9-36)amide and exendin (9-39)." METABOLISM CLINICAL AND EXPERIMENTAL, vol. 53, no. 2, February 2004 (2004-02), pages 252-259, XP002398090 ISSN: 0026-0495 abstract	1-61
Y	GREEN B D ET AL: "N-terminal His7-modification of glucagon-like peptide-1(7-36) amide generates dipeptidyl peptidase IV-stable analogues with potent antihyperglycaemic activity" JOURNAL OF ENDOCRINOLOGY, vol. 180, no. 3, March 2004 (2004-03), pages 379-388, XP002398091 ISSN: 0022-0795 abstract	1-61
Y	EP 0 619 322 A (PFIZER INC; SCIOS INC) 12 October 1994 (1994-10-12) cited in the application the whole document	1-61

-/--

9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	SERVIN A L ET AL: "PEPTIDE YY AND NEUROPEPTIDE-Y INHIBIT VASOACTIVE INTESTINAL PEPTIDE-STIMULATED AMP PRODUCTION IN RAT SMALL INTESTINE STRUCTURAL REQUIREMENTS OF PEPTIDES FOR INTERACTING WITH PEPTIDE YY-PREFERRING RECEPTORS" ENDOCRINOLOGY, vol. 124, no. 2, 1989, pages 692-700, XP009072022 ISSN: 0013-7227 abstract	1-61
Y	US 5 120 712 A (HABENER ET AL) 9 June 1992 (1992-06-09) cited in the application the whole document	1-61
Y	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) the whole document	1-61
Y	WO 2004/041867 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; VAECK, MARK; VAN BERGEN EN HENEGOUWEN, PAU) 21 May 2004 (2004-05-21) abstract page 16, lines 16-31	1-61
Y	WO 2004/041862 A (ABLYNX N.V; SILENCE, KAREN; LAUWEREYS, MARC; DE HAARD, HANS) 21 May 2004 (2004-05-21) the whole document	1-61
A	MEIER J J ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 AS A REGULATOR OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT: THERAPEUTIC PERSPECTIVES" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 April 2002 (2002-04-12), pages 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999 the whole document	1-61
A	WO 91/01743 A (CEMU BIOTEKNIK AB) 21 February 1991 (1991-02-21) the whole document	1-61
A	WO 01/45746 A (GENENTECH, INC; DELANO, WARREN, L; DENNIS, MARK, S; LOWMAN, HENRY, B) 28 June 2001 (2001-06-28) the whole document	1-61

-/--

9

Form PCT/ISA/210 (continuation of second sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No
PCT/GB2005/004599

C(Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	DENNIS MARK S ET AL: "Albumin binding as a general strategy for improving the pharmacokinetics of proteins" JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, vol. 277, no. 38, 20 September 2002 (2002-09-20), pages 35035-35043, XP002285300 ISSN: 0021-9258 the whole document	1-61
A	WO 03/002609 A (MEDICAL RESEARCH COUNCIL; WINTER, GREG; IGNATOVICH, OLGA; TOMLINSON, I) 9 January 2003 (2003-01-09) the whole document	1-61
A	EP 1 378 520 A (INSTITUTE OF GENETICS, CHINESE ACADEMY OF SCIENCES; BEIJING ABT GENETI) 7 January 2004 (2004-01-07) the whole document	1-61
A	HOLT L J ET AL: "Domain antibodies: proteins for therapy" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, ELSEVIER PUBLICATIONS, CAMBRIDGE, GB, vol. 21, no. 11, November 2003 (2003-11), pages 484-490, XP004467495 ISSN: 0167-7799 abstract page 488	1-61
P,A	LEE SANG-HEON ET AL: "Synthesis, characterization, and pharmacokinetic studies of PEGylated glucagon-like peptide-1" BIOCONJUGATE CHEMISTRY, vol. 16, no. 2, 23 February 2005 (2005-02-23), pages 377-382, XP002398436 ISSN: 1043-1802 abstract	1-61
P,A	SHECHTER ET AL: "Reversible PEGylation of peptide YY3-36 prolongs its inhibition of food intake in mice" FEBS LETTERS, ELSEVIER, AMSTERDAM, NL, vol. 579, no. 11, 25 April 2005 (2005-04-25), pages 2439-2444, XP005390209 ISSN: 0014-5793	1-61

9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Search Report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. [X] Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

Although claims 54-58 are directed to a method of treatment of the human/animal body, the search has been carried out and based on the alleged effects of the compound/composition.

2. [ ] Claims Nos.:
because they relate to parts of the International Application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful International Search can be carried out, specifically:

3. [ ] Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. [ ] As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers all searchable claims.

2. [ ] As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. [ ] As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this International Search Report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. [ ] No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this International Search Report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

[ ] The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.

[ ] No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.
PCT/GB2005/004599

Patent document cited in search report		Publication date		Patent family member(s)		Publication date
WO 03026591	A	03-04-2003	BR	0212985	A	30-08-2005
			CA	2461345	A1	03-04-2003
			CN	1596119	A	16-03-2005
			EP	1499277	A2	26-01-2005
			JP	2005508324	T	31-03-2005
			MX	PA04002751	A	08-09-2005
WO 03057235	A	17-07-2003	AU	2003201998	A1	24-07-2003
WO 0246227	A	13-06-2002	AU	2689702	A	18-06-2002
			BR	0116024	A	13-12-2005
			CA	2434237	A1	13-06-2002
			CN	1483041	A	17-03-2004
			EA	5584	B1	28-04-2005
			EP	1355942	A2	29-10-2003
			HR	20030455	A2	31-08-2004
			HU	0302529	A2	28-10-2003
			JP	2004528014	T	16-09-2004
			MX	PA03005036	A	05-09-2003
			NO	20032565	A	01-08-2003
			NZ	525577	A	27-05-2005
			PL	366208	A1	24-01-2005
			SK	6702003	A3	03-08-2004
			ZA	200303642	A	12-08-2004
EP 0619322	A	12-10-1994	AT	314393	T	15-01-2006
			AU	682328	B2	02-10-1997
			AU	5501694	A	13-10-1994
			BR	9401185	A	18-10-1994
			CA	2116478	A1	08-10-1994
			CN	1544084	A	10-11-2004
			CN	1106698	A	16-08-1995
			CZ	9400275	A3	17-05-1995
			DE	69434588	T2	07-09-2006
			ES	2255051	T3	16-06-2006
			HU	68525	A2	28-06-1995
			IL	108611	A	20-06-2004
			JP	7002695	A	06-01-1995
			JP	2001158749	A	12-06-2001
			JP	2004099621	A	02-04-2004
			JP	2006213727	A	17-08-2006
			KR	186885	B1	01-05-1999
			NO	940436	A	10-10-1994
			NZ	250844	A	26-03-1996
			PL	180697	B1	30-03-2001
			RU	2126264	C1	20-02-1999
			ZA	9400878	A	10-08-1995
US 5120712	A	09-06-1992	NONE			
WO 2004003019	A	08-01-2004	AT	328906	T	15-06-2006
			CA	2492092	A1	08-01-2004
			CN	1678634	A	05-10-2005
			EP	1517921	A2	30-03-2005
			JP	2006512895	T	20-04-2006
WO 2004041867	A	21-05-2004	AU	2003283137	A1	07-06-2004
			AU	2003286002	A1	07-06-2004

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No
PCT/GB2005/004599

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2004041867 A		AU 2003286003 A1	07-06-2004
		AU 2003286004 A1	07-06-2004
		BR 0316092 A	27-09-2005
WO 2004041862 A	21-05-2004	WO 2004041865 A2	21-05-2004
		WO 2004041863 A2	21-05-2004
		CA 2505316 A1	21-05-2004
		CA 2505325 A1	21-05-2004
		CA 2505326 A1	21-05-2004
		JP 2006519763 T	31-08-2006
		MX PA05004955 A	17-11-2005
WO 9101743 A	21-02-1991	AT 107514 T	15-07-1994
		AU 652124 B2	18-08-1994
		AU 6143990 A	11-03-1991
		CA 2064689 A1	02-02-1991
		DE 69010206 D1	28-07-1994
		DE 69010206 T2	13-10-1994
		EP 0486525 A1	27-05-1992
		JP 4507242 T	17-12-1992
		JP 3477196 B2	10-12-2003
		SE 509359 C2	18-01-1999
		SE 8902638 A	02-02-1991
WO 0145746 A	28-06-2001	AT 337403 T	15-09-2006
		AU 784285 B2	02-03-2006
		AU 2458701 A	03-07-2001
		CA 2390691 A1	28-06-2001
		EP 1240337 A2	18-09-2002
		JP 2003518075 T	03-06-2003
WO 03002609 A	09-01-2003	CA 2447851 A1	09-01-2003
		EP 1399484 A2	24-03-2004
		JP 2005504524 T	17-02-2005
		US 2004219643 A1	04-11-2004
EP 1378520 A	07-01-2004	CA 2443705 A1	24-10-2002
		WO 02083738 A1	24-10-2002
		CN 1380341 A	20-11-2002
		JP 2005501517 T	20-01-2005
		US 2005175606 A1	11-08-2005

(12) SOLICITUD INTERNACIONAL PUBLICADA SEGÚN EL TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES (PCT)

(19) **Organización Mundial de Propiedad Intelectual**
Oficina Internacional

(43) **Fecha de Publicación**
8 de Junio de 2006 (08.06.2006)

PCT

(10) **Número de Publicación Internacional**
WO2006/059106 A3

(51) **Clasificación Internacional de Patentes**[7]:
C07K 16/46 (2006.01) **A61P 1/00** (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01) **A61P 3/10** (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) **Número de Solicitud Internacional:** PCT/GB2005/004599

(22) **Fecha de Registro Internacional:**
30 de Noviembre de 2005 (30.11.2005)

(25) **Idioma de registro:** Inglés

(26) **Idioma de Publicación:** Inglés

(30) **Información de Prioridad:**
60/632,361 2 de Diciembre de 2004 (02.12.2004) US
0511019.2 31 de Mayo de 2005 (31.05.2005) GB

(71) **Solicitante:** (para todos los estados designados excepto Estados Unidos): **DOMANTIS LIMITED** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(72) **Inventores: e**

(75)**Inventores/solicitantes** (para Estados Unidos únicamente): **HOLMES, Steve** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **HOLT, Lucy, J.** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **JESPERS, Laurent, S.** [BE/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **TOMLINSON, Ian, M.** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(74) **Agente**: **LOCK, Graham, James** et al; Fry Heath & Spence LLP, The Gables, Massetts Road, Horley, Surrey RH6 7DQ (GB).

(81) **Estados Designados** (a menos que sea indicado de otra forma, para toda clase de protección nacional requerida): AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) **Estados Designados** (a menos que sea indicado dc otra forma, para toda clase de protección regional requerida): patente ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW); patente eurásica (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM); patente europea: (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR); patente OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Publicado:

-- *Con reporte de búsqueda internacional*
-- *antes de la expiración del límite de tiempo para modificar las reivindicaciones y ser publicada de nuevo en el caso de recibo de modificaciones.*

(88) **Fecha de la publicación del Reporte de Búsqueda Internacional**
4 de enero de 2007

Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada emisión regular de la Gaceta PCT.

(54) Título: ANTICUERPOS DE DOMINIO BIESPECÍFICO DIRIGIDOS A ALBÚMINA DE SUERO Y GLP-1 O PYY

(57) Resumen: 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.

(12) INTERNATIONAL APPLICATION PUBLISHED UNDER THE PATENT COOPERATION TREATY (PCT)

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau

PCT

(43) International Publication Date
8 June 2006 (08.06.2006)

(10) International Publication Number
WO 2006/059106 A3

(51) International Patent Classification:
C07K 16/46 (2006.01) *A61P 1/00* (2006.01)
C07K 16/44 (2006.01) *A61P 3/10* (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/004599

(22) International Filing Date:
30 November 2005 (30.11.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
60/632,361 2 December 2004 (02.12.2004) US
0511019.2 31 May 2005 (31.05.2005) GB

(71) Applicant *(for all designated States except US)*: **DOMANTIS LIMITED** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(72) Inventors; and

(75) Inventors/Applicants *(for US only)*: **HOLMES, Steve** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **HOLT, Lucy, J.** [GB/GB]; 315 Cambridge Sience Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **JESPERS, Laurent, S.** [BE/GB]; 315 Cambridge Sience Park, Cambridge CB4 0WG (GB). **TOMLINSON, Ian, M.** [GB/GB]; 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB).

(74) Agents: **LOCK, Graham, James** et al.; Fry Heath & Spence LLP, The Gables, Massetts Road, Horley, Surrey RH6 7DQ (GB).

(81) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of national protection available)*: AE, AG, AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, LY, MA, MD, MG, MK, MN, MW, MX, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PG, PH, PL, PT, RO, RU, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, SY, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, YU, ZA, ZM, ZW.

(84) Designated States *(unless otherwise indicated, for every kind of regional protection available)*: ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Eurasian (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), European (AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, NL, PL, PT, RO, SE, SI, SK, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).

Published:
— *with international search report*
— *before the expiration of the time limit for amending the claims and to be republished in the event of receipt of amendments*

(88) Date of publication of the international search report:
4 January 2007

For two-letter codes and other abbreviations, refer to the "Guidance Notes on Codes and Abbreviations" appearing at the beginning of each regular issue of the PCT Gazette.

WO 2006/059106 A3

(54) Title: BISPECIFIC DOMAIN ANTIBODIES TARGETING SERUM ALBUMIN AND GLP-1 OR PYY

(57) Abstract: Drug fusions and conjugates that contain an incretin therapeutic or diagnostic agent that is fused or conjugated to an antigen-binding fragment of an antibody that binds serum albumin. The conjugates and fusion have a longer in vivo half life in comparison with the unconjugated or unfused therapeutic or diagnostic agent.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la OFICINA INTERNACIONAL

PCT

NOTIFICACION DE REGISTRO DE UN CAMBIO

(Regla 92 bis. 1 del PCT e Instrucciones Administrativas, Sección 422)

Para:
LOCK, Graham, James
Fry Heath & Spence LLP
The Gables, Massetts Road
Horley
Surrey RH6 7DQ
ROYAUME-UNI

Fecha de envío por correo (día/mes/año)
08 de Mayo de 2007 (08.05.2007)

Archivo de referencia del solicitante o agente
P59452L-WO

NOTIFICACION IMPORTANTE

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

Fecha de registro internacional *(día/mes/año)*
30 de Noviembre de 2005 (30.11.2005)

1. Las siguientes indicaciones aparecieron en el registro en relación con:

☒ el solicitante ☐ el inventor ☐ el agente ☐ el representante común

Nombre y Dirección

DOMANTIS LIMITED
315 Cambridge Science Park
Cambridge CB4 0WG
Reino Unido

País de Nacionalidad: GB
País de Residencia: GB

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

2. La Oficina Internacional por el presente notifica al solicitante que el siguiente cambio se ha registrado en relación con:

☐ la persona ☐ el nombre ☒ la dirección ☐ la nacionalidad ☐ la residencia

Nombre y Dirección

DOMANTIS LIMITED
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
Reino Unido

País de Nacionalidad: GB
País de Residencia: GB

No. Teléfono

No. Facsímile

No. Teleimpresora

3. Otras observaciones, si fuese necesario:

4. Se ha enviado una copia de esta notificación a:

☐ la Oficina que recibe
☐ la Autoridad de Búsqueda Internacional
☒ la Autoridad de Examen Preliminar Internacional
☐ las Oficinas designadas relacionadas
☒ las Oficinas seleccionadas relacionadas
☐ otros:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsímile No. +41 22 338 82 70

Funcionario autorizado

Qiu Anman
Facsimile No. +41 22 338 89 65
Teléfono No. +41 22 338 74 02

PATENT COOPERATION TREATY PCT/GB2005/004599

From the INTERNATIONAL BUREAU

PCT

NOTIFICATION OF THE RECORDING OF A CHANGE

(PCT Rule 92*bis*.1 and Administrative Instructions, Section 422)

To:

LOCK, Graham, James
Fry Heath & Spence LLP
The Gables, Massetts Road
Horley
Surrey RH6 7DQ
ROYAUME-UNI

Date of mailing *(day/month/year)*
08 May 2007 (08.05.2007)

Applicant's or agent's file reference
P59452L-WO

IMPORTANT NOTIFICATION

International application No.
PCT/GB2005/004599

International filing date *(day/month/year)*
30 November 2005 (30.11.2005)

1. The following indications appeared on record concerning:

☒ the applicant ☐ the inventor ☐ the agent ☐ the common representative

Name and Address
DOMANTIS LIMITED
315 Cambridge Science Park
Cambridge CB4 0WG
United Kingdom

State of Nationality: GB
State of Residence: GB
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

2. The International Bureau hereby notifies the applicant that the following change has been recorded concerning:

☐ the person ☐ the name ☒ the address ☐ the nationality ☐ the residence

Name and Address
DOMANTIS LIMITED
980 Great West Road
Brentford
Middlesex TW8 9GS
United Kingdom

State of Nationality: GB
State of Residence: GB
Telephone No.:
Facsimile No.:
Teleprinter No.:

3. Further observations, if necessary:

4. A copy of this notification has been sent to:

☐ the receiving Office
☐ the International Searching Authority
☒ the International Preliminary Examining Authority
☐ the designated Offices concerned
☒ the elected Offices concerned
☐ other:

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No. +41 22 338 82 70

Authorized officer
Qiu Anman
Facsimile No. +41 22 338 89 65
Telephone No. +41 22 338 74 02

Form PCT/IB/306 (October 2005) 1/C8TZXB6N0

CAPITULO REIVINDICATORIO COMO FUE ORIGINALMENTE PRESENTADO EN FASE INTERNACIONAL JUNTO CON SU TRADUCCION

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 fijación para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de fijación para albúmina de suero;

Z es un fármaco de polipéptido que tiene especificidad de fijación 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 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 fijación para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de fijación 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' e está ubicado amino terminalmente con relación a X'.

9. La fusión de fármaco de la reivindicación 6, 7 o 8, caracterizada además porque dichos V_H y V_L tienen especificidad de fijación 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 fijación para albúmina de suero, o un dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de fijación 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 fijación para albúmina de suero, o dicho dominio variable de cadena ligera de inmunoglobulina (V_L) que tiene especificidad de fijación 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 huésped que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 18.

21. Un método para producir una fusión de fármaco que comprende mantener la célula huésped 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 una fusión de proteínas de fármaco 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 solo dominio variable 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 plasma en superficie.

33. El fármaco de la reivindicación 32, caracterizado además porque el dominio específico para SA se fija a SA en un análisis de fijación 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), IGFI, BMP-9, IL-22, RegW, 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-IR, antagonistas de MCH-IR, 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 fijación a antígeno, en donde el sitio de fijación 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 fijación a antígeno, en donde el sitio de fijación 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 sola fracción de proteína.

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 huésped que contiene el ácido nucleico recombinante de la reivindicación 49.

52. Un método para producir una fusión de fármaco, que comprende mantener la célula huésped 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.

54. Un método para tratar y/o prevenir una condición en un paciente, que comprende administrar al paciente un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48, en donde la condición se selecciona del grupo que consiste en hiperglicemia, diabetes de tipo 2, tolerancia alterada a la glucosa, diabetes de tipo 1, obesidad, hipertensión, síndrome X, dislipidemia, trastornos cognitivos, ateroesclerosis, infarto al miocardio, enfermedad cardiaca coronaria y otros trastornos cardiovasculares, accidente cerebro vascular, síndrome inflamatorio intestinal, dispepsia y úlceras gástricas.

55. Un método para retrasar o evitar el avance de la

enfermedad en diabetes de tipo 2 en un paciente, el método comprende administrar al paciente un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48.

56. Un método para disminuir la absorción de alimentos por un paciente, disminuir la apoptosis de células β, aumentar la función de las células β y la masa de células β, y/o restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β en un paciente, el método comprende administrar al paciente un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48.

57. Un método para disminuir la absorción de alimentos por un paciente, disminuir la apoptosis de células β, aumentar la función de las células β y la masa de células β, y/o restaurar la sensibilidad a la glucosa de las células β, el método comprende administrar al paciente un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48.

58. Un método para tratar y/o prevenir en un paciente, la hiperglicemia, la diabetes de tipo 1, la diabetes de tipo 2 o la deficiencia de células β, el método comprende administrar al paciente un fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48.

59. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48 para el tratamiento y/o prevención de diabetes.

60. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta 17 y 23 hasta 48 para el tratamiento y/o prevención de obesidad.

61. El fármaco de cualquiera de las reivindicaciones 1 hasta

17 y 23 hasta 48 para reducir la absorción de alimentos por un paciente.

CLAIMS

What is claimed is:

1. A drug fusion having the formula:
$a\text{-}(X)_{n1}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(Z)_{n3}\text{-}d$ or $a\text{-}(Z)_{n3}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(X)_{n1}\text{-}d$,
wherein

X is an insulintropic agent or an analogue thereof;

Y is an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) that has binding specificity for serum albumin, or an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) that has binding specificity for serum albumin;

Z is a polypeptide drug that has binding specificity for a target;

a, b, c and d are independently a polypeptide comprising one to about 100 amino acid residues or absent;

n1 is one to about 10;

n2 is one to about 10; and

n3 is zero to about 10.

2. The fusion of claim 1, wherein the or each X is GLP-1(7-37), GLP-1(7-36) amide, [Ser^8]GLP-1(7-36)amide [Pro^9]GLP(7-37) or an analogue thereof.
3. The fusion of any preceding claim, wherein n1 and n3 are both one, and n2 is two to about 10.
4. The fusion of any preceding claim, wherein the or each Y comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of 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 and SEQ ID NO:26.
5. The fusion of any one of claims 1 to 4, wherein the or each Y comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of 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 and SEQ ID NO:23.
6. A drug fusion comprising moieties X' and Y', wherein X' is GLP-1 or an analogue thereof; and

Y' is an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) that has binding specificity for serum albumin, or an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) that has binding specificity for serum albumin.

7. The drug fusion of claim 6, wherein X' is located amino terminally to Y'.
8. The drug fusion of claim 6, wherein Y' is located amino terminally to X'.
9. The drug fusion of claim 6, 7 or 8, wherein said V_H and V_L have binding specificity for human serum albumin.
10. The drug fusion of claim 6, wherein Y' comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of 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 and SEQ ID NO:26.
11. The drug fusion of claim 6, wherein Y' comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of 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 and SEQ ID NO:23.
12. A drug conjugate comprising an immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) that has binding specificity for serum albumin, or an immunoglobulin light chain variable domain (V_L) that has binding specificity for serum albumin; and GLP-1 or an analogue thereof that is covalently bonded to said V_H or V_L.
13. The drug conjugate of claim 12, wherein the drug conjugate comprises a single V_H.
14. The drug conjugate of claim 12, wherein the drug conjugate comprises a single V_L.
15. The drug conjugate of claim 12, 13 or 14, wherein said GLP-1 or analogue is covalently bonded to said V_H or V_L through a linker moiety.
16. The drug conjugate of any one of claims 12 to 15 comprising one or more different drugs covalently bonded to said V_H or V_L.
17. The drug conjugate of any one of claims 12 to 16, wherein said immunoglobulin heavy chain variable domain (V_H) that has binding specificity for serum albumin, or said immunoglobulin light chain variable domain (V_L) that has binding specificity for serum albumin comprises an amino acid sequence selected from the group consisting of 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 and SEQ ID NO:23.

18. A recombinant nucleic acid encoding the drug fusion of claim 1 or claim 6.

19. A nucleic acid construct comprising the recombinant nucleic acid of claim 18.

20. A host cell comprising the recombinant nucleic acid of claim 18.

21. A method for producing a drug fusion comprising maintaining the host cell of claim 20 under conditions suitable for expression of said recombinant nucleic acid, whereby a drug fusion is produced.

22. A pharmaceutical composition comprising a drug fusion of claim 1 or claim 6, or the drug conjugate of claim 12 and a physiologically acceptable carrier.

23. A drug conjugate or fusion comprising an insulinotropic agent and an antibody fragment that binds an antigen, wherein the antigen acts to increase the half-life of the drug conjugate or fusion *in vivo*.

24. The drug conjugate or fusion of claim 23, wherein the drug is a drug fusion protein comprising the insulinotropic agent peptide bonded to the antibody fragment.

25. The drug of claim 24, wherein the insulinotropic agent is fused to the antibody fragment via peptide linker moiety.

26. The drug of any one of claims 23 to 25, wherein the antigen is serum albumin.

27. The drug of any one of claims 23 to 26, wherein the insulinotropic agent is a glucagon-like peptide.

28. The drug of any one of claims 23 to 27, wherein the insulinotropic agent is selected from the group consisting of GLP-1, GLP-1 analogue, Exendin-3, an Exendin-3 analogue, Exendin-4 and an Exendin-4 analogue.

29. The drug of any one of claims 1, 6, 12 and 28, wherein the GLP-1 or analogue comprises an amino acid sequence that is at least 80% homologous to a sequence selected from the group consisting of SEQ ID NO:s 157 or 159.

30. The drug of any one of claims 1, 6, 12 and 28, wherein the GLP-1 analogue comprises Gly^{10}, Thr^{12}, Asp^{14}, Phe^{27} and Ile^{29}.

31. The drug of any one of claims 29 and 30, wherein the GLP-1 analogue differs from SEQ ID NO: 157 or SEQ ID NO: 159 by no more than 6 amino acids.
32. The drug of any one of claims 1, 6, 12 and 28 comprising a single variable domain specific for serum albumin (SA) which has a dissociation constant (K_d) of 1nM to 500μM for SA, as determined by surface plasmon resonance.
33. The drug of claim 32, wherein the SA-specific domain binds SA in a standard ligand binding assay with an IC50 of 1nM to 500μM.
34. The drug of claim 23, comprising 2, 3 or 4 insulinotropic agent (IA) moieties.
35. The drug of claim 34, comprising IA-IA'-AF or IA-$(AF)_n$-IA', wherein IA and IA' are the same or different insulinotropic agents and AF is an antibody fragment as recited in claim 23, and n equals 1, 2, 3, 4, or 5.
36. The drug of claim 35, comprising [GLP-1]-[AF]-[GLP-1] or [GLP-1]-[GLP-1]-[AF].
37. The drug of any one of the preceding claim, comprising an anti-satiety agent.
38. The drug of claim 37, wherein the anti-satiety agent is selected from the group consisting of PYY, a PYY analogue, PYY (3-36).
39. The drug of claim 37 or 38 comprising IA-$(AF)_n$-$(IA')_x$ -[anti-satiety agent] or [anti-satiety agent]- $(IA')_x$ -$(AF)_n$ - IA, wherein n equals 1, 2, 3, 4, or 5. and x equals zero, 1, 2, 3, 4, or 5.
40. The drug of any preceding claim having a t ½ alpha of between 1 and 6 hours.
41. The drug of any preceding claim having a t ½ beta of between 12 and 60 hours.
42. The drug of any one of claims 1, 6, 12 and 23, further comprising an agent selected from the group consisting of insulin, Exendin-4, Exendin-3, PYY (3-36), Resistin, Leptin, MC3R/MC4R antagonist, AgRP antagonist, Apolipoprotein A-IV, Enterostatin, Gastrin-Releasing Peptide (GRP), IGF1, BMP-9, IL-22, RegIV, interferon alfa, INGAP peptide, somatostatin, amylin, neurulin, interferon beta, interferon hybrids, adiponectin, endocannabinoids, C peptide, WNT10b, Orexin-A, adrenocorticotrophin, Enterostatin, Cholecystokinin, oxyntomodulin, Melanocyte Stimulating Hormones, melanocortin, Melanin concentrating hormone, BB-2, NPY Y2 agonists, NPY Y5/Y1 antagonists, OXM, Gal-1R antagonists, MCH-1R antagonists, MC-3/4 agonists, BRS-3 agonists, pancreatic polypeptide, anti-Ghrelin antibody

fragment, brain-derived neurotrophic factor, human growth hormone, parathyroid hormone, follicle stimulating hormone, Gastric inhibitory peptide or an analogue thereof.

43. A drug comprising GLP-1 or an analogue thereof and a protein moiety comprising an antigen binding site, wherein the antigen binding site binds an antigen which acts to increase the half-life of the drug conjugate *in vivo*, with the proviso that the protein moiety is not a peptide having 10-30 amino acids.

44. A drug fusion comprising GLP-1 or an analogue thereof and a protein moiety comprising an antigen binding site, wherein the antigen binding site binds an antigen which acts to increase the half-life of the drug conjugate *in vivo*.

45. A drug of claim 43 or 44, wherein the GLP or analogue is GLP-1(7-37), GLP-1(7-36) amide, [Ser^{8}]GLP-1(7-36)amide, [Pro^{9}]GLP-1(7-36), [Pro^{9}]GLP-1(7-37) or an analogue thereof.

46. A drug of claim 45, wherein the GLP analogue has a C terminal peptide selected from the list consisting of PSS, PSSGAP or PSSGAPPPS.

47. A drug of claim 43, 44, 45 or 46, wherein said antigen is serum albumin.

48. A drug of any one of claims 43 to 47, comprising a single protein moiety.

49. A recombinant nucleic acid encoding the drug of any one of claims 43 to 48.

50. A nucleic acid construct comprising the recombinant nucleic acid of claim 49.

51. A host cell comprising the recombinant nucleic acid of claim 49.

52. A method for producing a drug fusion comprising maintaining the host cell of claim 51 under conditions suitable for expression of said recombinant nucleic acid, whereby a drug fusion is produced.

53. A pharmaceutical composition comprising a drug of any one of claims 43 to 48 and a physiologically acceptable carrier.

54. A method of treating and/or preventing a condition in a patient, comprising administering to the patient a drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48, wherein the condition is selected from the group consisting of hyperglycemia, type 2 diabetes, impaired glucose tolerance, type 1 diabetes, obesity, hypertension, syndrome X, dyslipidemia, cognitive disorders, atheroschlerosis, myocardial infarction, coronary heart disease and other cardiovascular disorders, stroke, inflammatory bowel syndrome, dyspepsia and gastric ulcers.

55. A method of delaying or preventing disease progression in type 2 diabetes in a patient, the method comprising administering to the patient a drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48.

56. A method of decreasing food intake by a patient, decreasing β-cell apoptosis, increasing β-cell function and β-cell mass and/or restoring glucose sensitivity of β-cells in a patient, the method comprising administering to the patient a drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48.

57. A method of decreasing food intake by a patient, decreasing β-cell apoptosis, increasing β-cell function and β-cell mass and/or restoring glucose sensitivity of β-cells, the method comprising administering to the patient a drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48.

58. A method of treating and/or preventing in a patient hyperglycemia, type 1 diabetes, type 2 diabetes or β-cell deficiency, the method comprising administering to the patient a drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48.

59. The drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48 for treatment and/or prevention of diabetes.

60. The drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48 for treatment and/or prevention of obesity.

61. The drug of any one of claims 1 to 17 and 23 to 48 for reducing food intake by a patient.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

PCT

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

(Capítulo II del Tratado de Cooperación de Patentes)
(PCT Artículo 36 y Regla 70)

Registro de referencia del solicitante o agente P59452L-WO	**PARA FUTURAS ACCIONES** Ver Forma PCT/IPEA/416	
Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/004599	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 30.11.2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 02.12.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV. C07K16/46

Solicitante
Domantis Limited

1. Este reporte es el reporte de examen preliminar internacional, establecido por esta Autoridad Examinadora Preliminar Internacional bajo el Artículo 35 y trasmitido al solicitante de conformidad con el Artículo 36.

2. Este REPORTE consta de un total de 10 hojas, incluyendo esta carátula.

3. Este reporte también es acompañado por ANEXOS, que comprenden:

   a. ☐ *(enviado al solicitante y a la Oficina Internacional)* un total de _____ hojas, como sigue:

      ☐ hojas de la descripción, reivindicaciones y/o dibujos los cuales han sido modificados y son la base de este reporte y/o hojas que contienen rectificaciones autorizadas por esta Autoridad (ver Regla 70.16 y Sección 607 de las Instrucciones Administrativas).

      ☐ hojas que reemplazan hojas anteriores, pero las cuales esta Autoridad considera que contienen una modificación que va más allá de la revelación en la solicitud internacional como se presentó, como se indicó en el ítem 4 de la Casilla No. I y la Casilla Suplementaria.

   b. ☐ *(enviado únicamente a la Oficina Internacional)* un total de (indicar tipo y número de medio(s) electrónico(s)) __ , que contienen un listado de secuencias y/o tablas con ello, únicamente en una forma legible en computador, como se indicó en la Casilla Suplementaria Relacionada con el Listado de Secuencias (ver Sección 802 de las Instrucciones Administrativas).

4. Este reporte contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

☒	Casilla No. I	Bases del Reporte
☐	Casilla No. II	Prioridad
☒	Casilla No. III	No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial.
☐	Casilla No. IV	Falta de unidad de invención
☒	Casilla No. V	Afirmación razonada de conformidad con el Artículo 35(2) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación .
☐	Casilla No. VI	Ciertos documentos citados
☐	Casilla No. VII	Ciertos defectos en la solicitud internacional
☒	Casilla No. VIII	Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Fecha de presentación de la demanda	Fecha de terminación de este reporte
2007-02-01	10.05.2007

Nombre y dirección de correo de la IPEA
European Patent Office
D-80298 Munich
Tel. +49 892399-0 Tx: 523656 epmu d
Fax. +49 892399-4465

Funcionario autorizado
Lechner, Oskar
Teléfono No. +49 89 2399-8687

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No. PCT/GB2005/004599

Casilla No. I Bases del reporte

1. Respecto al **idioma**, este reporte se basó en la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada, a menos que se indique lo contrario según este item.

☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual fue presentada

☐ Una traducción de la solicitud internacional en, el cual es el idioma de una traducción suministrada para los propositos de:

☐ búsqueda internacional (según la Regla 12.3 (a) y 23.1 (b)).

☐ publicación de la solicitud internacional (según la Regla 12.4(a))

☐ examen preliminar internacional (según las Reglas 55.2 (a) y/o 55.3 (a)).

2. Respecto a los **elementos** de la solicitud internacional este Reporte se basó en (hojas reemplazadas que has sido suministradas a la oficina receptora en respuesta a una invitación según Artículo 14, son referidas en este reporte como "originalmente presentadas" y no son anexadas a este reporte):

Descripción, páginas

1-116 como se presentaron originalmente

Listado de secuencias parte de la descripción, páginas

1, 2 como se presentaron originalmente

Reivindicaciones, números

1-61 como se presentaron originalmente

Dibujos, Hojas

1/42-42/42 como se presentaron originalmente

☒ la secuencia numerada y/o alguna tabla(s)-ver Casilla Suplementaria a la Secuencia Numerada

3. ☐ Las modificaciones resultaron en la cancelación de:

☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ listado de secuencia (especificar)
☐ cualquier tabla(s) relacionadas con la serie de listados (especificar)

4. ☐ Este reporte ha sido establecido como si (alguno de) los anexos corregidos a este reporte y numerado antes no ha sido hecho, desde que ellos han sido considerados a través de la presentación original, como esta indicado en la casilla suplementaria (regla 70.2©)..

☐ la descripción, páginas
☐ las reivindicaciones, Nos.
☐ los dibujos, hojas/figuras
☐ secuencia que enumera (especificar)
☐ algunas tabla(s) relatando secuencia numerada (especificar)

*si el Item 4 aplica, algunas o todas aquellas hojas pueden ser marcadas "reemplazadas"

AX

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud Internacional No.
PCT/GB2005/004599

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-61 (todas en parte)
porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 54-58 se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para la solicitud completa o para dichas reivindicaciones Nos. 1-61 (todas en parte)

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b) y 13ter.2.

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver hoja suplementaria para más detalles

REPORTE PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD

Solicitud internacional No. PCT/GB2005/004599

Casilla No. V Afirmación razonada bajo el Articulo 35(2) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afir)ación

Novedad (N)	Si:	Reivindicaciones 1-61
	No:	Reivindicaciones
Nivel inventivo (IS)	Si:	Reivindicaciones
	No:	Reivindicaciones 1-61
Aplicabilidad industrial (IA)	Si:	Reivindicaciones 1-53, 59-61
	No:	Reivindicaciones

2. Citaciones y explicaciones (Norma 70.7):

ver hoja separada

CASILLA No.VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta si las reivindicaciones están soportadas completamente por la descripción, fueron formuladas:

ver hoja separada

REPORTE DE EXAMEN PRELIMINAR INTERNACIONAL SOBRE PATENTABILIDAD
(HOJA SEPARADA)

Solicitud internacional No.
PCT/GB2005/004599

Casilla suplementaria relacionada con el listado de secuencia

Continuación de la casilla I Item 2:

1. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, este reporte fue establecido según:

   a. tipo de material:

   ☒ un listado de secuencia
   ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

   b. formato de material:

   ☒ en formato escrito
   ☒ en formato legible por computador

   c. tiempo de presentación/suministro:

   ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
   ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
   ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para el propósito de la búsqueda y/o examinación.
   ☐ recibida por esta Autoridad como una enmienda* en

2. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

3. Comentarios adicionales:

*si el Item 4 en la casilla No. I aplica, el listado y/o tabla(s) relacionados con ello, el cual forma parte de las bases del reporte, pueden ser marcadas "reemplazadas"

Re Item III

1 No establecimiento de opinión respecto a novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial (Regla 67.1 PCT)

Las reivindicaciones 54-58 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por la disposición de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

2 Principales Problemas Claridad (Artículo 6 PCT)

2.1 Las reivindicaciones 1-61 no son claras en el sentido del Artículo 6 PCT puesto que comprenden compuestos definidos únicamente por su función deseada, es decir, agente insulinotrópico y agente anti-saciedad, respectivamente. Dicho tipo de definición del resultado que pretende ser obtenido no permite que el alcance de la reivindicación sea determinado. El hecho de que cualquier compuesto pueda ser examinado no elimina esta objeción, puesto que la persona versada no hubiese tenido conocimiento de antemano en cuanto a si caería dentro del alcance reivindicado, excepto por los compuestos revelados en la descripción. Se requería experimentación excesiva para examinar compuestos al azar.

Las reivindicaciones 1-61 tampoco son claras (Artículo 6 PCT) en cuanto se relacionan con análogos, agonistas y antagonistas, respectivamente, no especificados adicionalmente.

En relación con los análogos, la solicitud proporciona diferentes referencias (c.f. p 2, §2) y las definiciones (c.f. v.g. p 13, I 31 – p 14, I 11) que no son por su parte claras (Artículo 6 PCT). Por consiguiente, la búsqueda y también el examen ha estado limitado a las moléculas de GLP-1 específicamente mencionadas en la solicitud, es decir las moléculas de GLP-1 según se definen en la p 53-58, PYY(1-36), (3-36) y (22-36) así como las moléculas específicas enumeradas en la reivindicación 42 con excepción de aquellas que se refieren a agonistas o antagonistas únicamente, GIP, Exendin, OXM y Pyy, PYY (3-36), respectivamente (c.f. p 14, I 19).

2.2 Las reivindicaciones 23-61 no son claras en el sentido del Artículo 6 PCT puesto que comprenden compuestos definidos únicamente por su función deseada, es decir, un antígeno que actúa para aumentar la vida media del conjugado de fármaco o fusión en vivo, respectivamente. Dicho tipo de definición del resultado que pretende ser obtenido no permite que el alcance de la reivindicación sea determinado. El hecho de que cualquier compuesto pueda ser examinado no supera esta objeción, puesto que la persona versada no hubiese tenido conocimiento de antemano en cuanto a si cae dentro del alcance reivindicado, excepto por los compuestos revelados en la descripción. Se requiere experimentación excesiva para examinar compuestos al azar.

Por consiguiente, se ha llevado a cabo la búsqueda y examen para aquellas partes de las reivindicaciones que aparecen ser claras en vista de la descripción, a saber aquellas partes relacionadas con

las moléculas específicas, bien definidas enumeradas en la página 18.

Item V

3 Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 de abril de 2003 (2003-04-03)

D2: MEIER J ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 AS A REGULATOR OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT: THERAPEUTIC PERSPECTIVES" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 de abril de 2002 (2002-04-12), páginas 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999

D3: WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLLT) 8 de enero de 2004 (2004-01-08)
Según el solicitante se dio cuenta, WO 03/057235 fue designado erróneamente D3 en lugar de WO 2004/003019

4. Novedad (Artículo 33(2) PCT)

4.1 Ninguno de los documentos de la técnica anterior a la mano explícitamente revela 1) una fusión de fármaco que tenga la fórmula: a-(X)nl-b-(Y)n2-c-(Z)n3-d o a-(Z)n3-b-(Y)n2-c-(X)nl-d, donde X es un agente insulinotrópico o un análogo del mismo; Y es un dominio variable de cadena fuerte de inmunoglobulina (VH) que tiene especificidad ligante para la albúmina del suero, o un dominio variable de cadena suave de inmunoglobulina (VL) que tiene especificidad ligante para la albúmina del suero; Z es un fármaco polipéptido que tienen especificidad ligante para un objetivo; a, b, c y d son independientemente un polipéptido que comprende de uno hasta cerca de 100 residuos de amino ácido o ausente; nl es uno hasta cerca de 10; n2 es uno hasta cerca de 10; y n3 es cero hasta cerca de 10, 2) o uno de los constructos específicos reivindicados en las otras reivindicaciones.
Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto se ha examinado (ver arriba), tiene que ser considerada novedosa (Art. 33(2), PCT).

5. Paso Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

La materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto se ha examinado, no parece comprender un paso inventivo en el sentido del Art. 33(3), PCT por las siguientes razones:

D1 es considerado la técnica anterior más cercana y reivindica un método para disminuir el consumo de calorías/disminuir el apetito/consumo de alimentos/control de peso/reducción o prevención de la obesidad,

que comprende administrar periféricamente una cantidad efectiva terapéuticamente de PYY o un agonista del mismo y una cantidad efectiva terapéuticamente de GLP-1 o un agonista del mismo para el sujeto (c.f. reivindicación 1).

La materia objeto difiere de D1 en que reivindica un constructo que comprende un agente insulinotrópico/saciedad tal como GLP-1, un dAb albúmina del anti-suero y un tercer agente tal como PYY.
El efecto técnico es una vida media mejorada del suero.
Por lo tanto, el problema técnico es proporcionar agentes insulinotrópicos/anti-saciedad con una vida media mejorada del suero.
La solución reivindicada son constructos según se reivindicaron.
Comenzando de las enseñanzas de D1 (ver arriba) y el conocimiento común en el campo tal como D2 (revela que GLP-1 tiene una vida media corta del suero), una persona versada consultaría la literatura para estrategias apropiadas para mejorar la vida media de dicho agente y recuperar v.g. D3.

D3 reivindica un ligando di- o trimérico específico doble específico para v.g. TNFR1 (p 55) (antagoniza el TNFR1) y específico para albúmina del suero (Kd 1 nM – 500 μM, efecto de aumentar la vida media del suero) (c.f. reivindicaciones 26, 27, 41, 44). Uso de ligantes, covalentes, ligantes no covalentes (v.g. avidin-estreptavidin) (c.f. p 5, I 29 – p 6, I 26; p 8, I 9-21; p 9, I 21- p 10, I 6; p 11, I 11-19; p 26; p 27, 3; p 31, I 10-26 II; reivindicaciones 115-117). Para tratar inflamación, infecciones, cáncer, alergias (p 77, I 10-15). D3 explícitamente menciona que además de la proteína que mejora la vida media los constructos pueden comprender cualquier antígeno, una persona versada en la técnica apreciará que la escogencia sea larga y variada (c.f. § página de unión 13-14).

El solicitante sostiene en su carta del 01.02.2007, que la solicitud actual prevé un enlace o espaciador funcional entre el agente insulinotrópico y una proteína con un suero de vida media en vivo prolongado. El espaciador de la presente invención siendo una mitad ligante polipéptida, v.g. un fragmento ligante Ag de un Ab que tiene especificidad ligante para un polipéptido que aumenta la vida media del suero en vivo. El espaciador tiene la ventaja de que tiene una tasa de prendido/apagado que permite interacciones del receptor GLP-1 sin la albúmina que interfiere.
La diferencia entre la presente solicitud y D3 es que el fármaco es conjugado u fusionado a un dominio Ab simple anti-SA, mientras que D3 describe un ligando específico doble que comprende dos dominios Ab cada uno con especificidad Ag diferente, y ambos unen

a sus Ag respectivos y por lo tanto con un efecto. En la solicitud actual, el dominio Ab anti-SA simplemente actúa como un espaciador entre el fármaco GLP-1 y la albúmina.

La IPEA todavía considera que una persona versada actualizada consideraría, sin ninguna retrospectiva, el uso de las nuevas tecnologías disponibles en la química de proteínas. D3 es sólo un ejemplo de un documento que describe el aumento de la vida media del suero de un constructo dado conjugando un agente objetivo/terapéutico a una molécula cuyo objetivo es una proteína que mejora la vida media del suero. Una persona versada estaría consciente por supuesto de las ventajas de usar v.g. el dominio Ab anti-SA más pequeño en comparación con la unión SA directa del agente objetivo/terapéutico.

Por lo tanto, todavía se considera que los constructos reivindicados no requieren habilidades inventivas en vista de la técnica anterior existente.
Por consiguiente, no puede reconocerse paso inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 1-61, según se han examinado (Artículo 33(3) PCT).
Por lo tanto, parecería que los constructos reivindicados no requerirían habilidades inventivas en vista de la técnica anterior existente.
Por consiguiente, no puede reconocerse ningún paso inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto han sido examinadas (Artículo 33(3) PCT).

6 comentarios adicionales

6.1 Las reivindicaciones 21, 52, 54 no excluyen un método en vivo humano posible y, por lo tanto, podrían estar en conflicto con los criterios de algunos Estados Contratantes del PCT. La EPC, por ejemplo, excluye el derecho a patentar dichas reivindicaciones por ser contrarias al "orden público" o a la moralidad.

6.2 En una fase regional europea posterior pueden elevarse objeciones contra cualquier expresión dentro de la descripción tal como "...incorporado por referencia..." como la ley de patente regional requiere que la solicitud esté contenida en sí misma.

6.3 El uso repetido del término/frase no restringido "cerca", "...cerca...hasta cerca de..." o términos semejantes introduce ambigüedad en las reivindicaciones 1-5 (c.f. Lineamientos del PCT, 5.38).

6.4 Las abreviaturas usadas dentro de las reivindicaciones (v.g. PYY, GLP, AgRP, etc.) debe deletrearse en la primera ocurrencia, y luego introducirse colocando la abreviatura en paréntesis después del término que se abrevia (Art. 6 PCT, Lineamientos del PCT, 5.31).

6.5 El uso de "**un** péptido semejante al glucagón" no es considerado claro ya que no es evidente si la referencia se relaciona con el bien caracterizado "péptido semejante al glucagón" o a cualquier péptido semejante al glucagón (Art. 6 PCT).

6.6 Los números de la solicitud de patente deben remplazarse por los números de la publicación correspondiente.

Item VIII

1. Observaciones adicionales

1.1 De los datos experimentales proporcionados en la solicitud, es evidente que la afinidad de un dAb por SA no se correlaciona obligatoriamente con su potencial de prolongación t1/2 (c.f. v.g. Tabla 4, p 79; Dom7r-3 t1/2 13.7 h, afinidad 12 nM, Vk frente a Dom7r-16 t1/2 34.4 h, afinidad 1 μM, Vk).

1.2 Los resultados en la p 78, Tabla 3 muestran que el IL-1ra t1/2 se prolonga al unirse a un anti-SA dAb. Sin embargo, la misma tabla aparentemente también demuestra que t1/2 está drásticamente influenciado por la molécula unida al anti-SA dAb (c.f. Dom7m-16/IL-ra, t1/2 4.3 h frente a Dom7m-16 HA tag, t1/2 29 h). Esto podría indicar que el efecto prolongado t1/2 de un dAb dado tiene que ser examinado para cada combinación específica individualmente.

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

(Chapter II of the Patent Cooperation Treaty)

(PCT Article 36 and Rule 70)

Applicant's or agent's file reference P59452L-WO	**FOR FURTHER ACTION**	See Form PCT/IPEA/416
International application No. PCT/GB2005/004599	International filing date *(day/month/year)* 30.11.2005	Priority date *(day/month/year)* 02.12.2004
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC INV. C07K16/46		
Applicant Domantis Limited		

1. This report is the international preliminary examination report, established by this International Preliminary Examining Authority under Article 35 and transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of 10 sheets, including this cover sheet.
3. This report is also accompanied by ANNEXES, comprising:
   a. ☐ *sent to the applicant and to the International Bureau)* a total of sheets, as follows:
      ☐ sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis of this report and/or sheets containing rectifications authorized by this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions).
      ☐ sheets which supersede earlier sheets, but which this Authority considers contain an amendment that goes beyond the disclosure in the international application as filed, as indicated in item 4 of Box No. I and the Supplemental Box.
   b. ☐ *(sent to the International Bureau only)* a total of (indicate type and number of electronic carrier(s)) , containing a sequence listing and/or tables related thereto, in electronic form only, as indicated in the Supplemental Box Relating to Sequence Listing (see Section 802 of the Administrative Instructions).

4. This report contains indications relating to the following items:

☒	Box No. I	Basis of the report
☐	Box No. II	Priority
☒	Box No. III	Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
☐	Box No. IV	Lack of unity of invention
☒	Box No. V	Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
☐	Box No. VI	Certain documents cited
☐	Box No. VII	Certain defects in the international application
☒	Box No. VIII	Certain observations on the international application

Date of submission of the demand	Date of completion of this report
2007-02-01	10.05.2007
Name and mailing address of the international preliminary examining authority: European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Authorized officer Lechner, Oskar Telephone No. +49 89 2399-8687

Form PCT/IPEA/409 (Cover Sheet) (April 2005)

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. I Basis of the report

1. With regard to the **language**, this report is based on

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of:
   - ☐ international search (under Rules 12.3(a) and 23.1(b))
   - ☐ publication of the international application (under Rule 12.4(a))
   - ☐ international preliminary examination (under Rules 55.2(a) and/or 55.3(a))

2. With regard to the **elements*** of the international application, this report is based on *(replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to this report)*:

Description, Pages

1-116 as originally filed

Sequence listings part of the description, Pages

1, 2 as originally filed

Claims, Numbers

1-61 as originally filed

Drawings, Sheets

1/42-42/42 as originally filed

☒ a sequence listing and/or any related table(s) - see Supplemental Box Relating to Sequence Listing

3. ☐ The amendments have resulted in the cancellation of:
   - ☐ the description, pages
   - ☐ the claims, Nos.
   - ☐ the drawings, sheets/figs
   - ☐ the sequence listing *(specify)*:
   - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

4. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments annexed to this report and listed below had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).
   - ☐ the description, pages
   - ☐ the claims, Nos.
   - ☐ the drawings, sheets/figs
   - ☐ the sequence listing *(specify)*:
   - ☐ any table(s) related to sequence listing *(specify)*:

* *If item 4 applies, some or all of these sheets may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

1. The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non-obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of:

☐ the entire international application,

☒ claims Nos. 1-61 (all in part)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 54-58 relate to the following subject matter which does not require an international preliminary examination *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*.

☒ no International search report has been established for the said claims Nos. 1-61 (all in part)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b) and 13*ter*.2.

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Preliminary Examining Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See separate sheet for further details

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. V Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-61
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-61
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-53, 59-61
	No:	Claims	

2. Citations and explanations (Rule 70.7):

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Supplemental Box relating to Sequence Listing

Continuation of Box I, item 2:

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this report was established on the basis of:

   a. type of material:

   ☒ a sequence listing

   ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

   ☒ on paper

   ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

   ☐ contained in the international application as filed

   ☐ filed together with the international application in electronic form

   ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search and/or examination

   ☐ received by this Authority as an amendment* on

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table(s) relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

* *If item 4 in Box No. I applies, the listing and/or table(s) related thereto, which form part of the basis of the report, may be marked "superseded."*

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/GB2005/004599

Item III

1 Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability (Rule 67.1 PCT)

Claims 54-58 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 67.1(iv) PCT**. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims **(Art. 34(4)(a)(I) PCT)**.

2 Clarity (Art. 6 PCT)

2.1 **Claims 1-61** are unclear (**Art. 6 PCT**) as they encompass compounds defined only by their desired function, i.e. insulinotropic agent and anti satiety agent, respectively. Such a result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.
Claims 1-61 are also unclear (**Art. 6 PCT**) as far as relating to not further specified analogues, agonists and antagonists, respectively.
Concerning analogs the application provides different references (c.f. p 2, §2) and definitions (c.f. e.g. p 13, l 31 - p 14, l 11) which are on their part unclear (**Art. 6 PCT**).
Consequently, the search and also examination has been limited to the GLP-1 molecules specifically mentioned in the application, i.e. the GLP-1 molecules as defined on p 53-58, PYY(1-36), (3-36) and (22-36) as well as the specific molecules listed in **claim 42** with the exception of those referring to agonists or antagonists only, GIP, Exendin, OXM and Pyy, PYY (3-36), respectively (c.f. p 14, l 19).

2.2 **Claims 23-61** are unclear in the sense of **Art. 6 PCT** as they encompass compounds defined only by their desired function, i.e. antigen acting to increase the half-life of the drug conjugate or fusion in vivo, respectively. Such a result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.
Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to

the specific, well defined molecules listed on page 18.

Item V

3 Reference is made to the following documents:

D1 WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 April 2003 (2003-04-03)

D2 MEIER J J ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 AS A REGULATOR OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT: THERAPEUTIC PERSPECTIVES" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 April 2002 (2002-04-12), pages 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999

D3 WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED; WINTER, GREG; TOMLINSON, IAN; IGNATOVICH, OLGA; HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08)
As realized by the applicant, WO 03/057235 was erroneously designated D3 instead of WO 2004/003019

4 Novelty (Art. 33(2) PCT)

4.1 None of the prior art documents at hand explicitly disclose 1) a drug fusion having the formula: a-(X)nl-b-(Y)n2-c-(Z)n3-d or a-(Z)n3-b-(Y)n2-c-(X)nl-d, wherein X is an insulinotropic agent or an analogue thereof; Y is an immunoglobulin heavy chain variable domain (VH) that has binding specificity for serum albumin, or an immunoglobulin light chain variable domain (VL) that has binding specificity for serum albumin; Z is a polypeptide drug that has binding specificity for a target; a, b, c and d are independently a polypeptide comprising one to about 100 amino acid residues or absent; nl is one to about 10; n2 is one to about 10; and n3 is zero to about 10, 2) or one of the specific constructs claimed in the other claims.
Therefore, the subject matter of **claims 1-61**, as far as examined (see above), has to be considered novel **(Art. 33(2) PCT)**.

5 Inventive step (Art. 33(3) PCT)

The subject matter of **claims 1-61**, as far as examined, would not appear to involve an inventive step in the sense of **Art. 33(3) PCT** for the following reasons:

D1 is considered to be the closest prior art and claims a method for decreasing calorie intake/decreasing appetite/food intake/weight control/reduction or prevention of obesity,

which comprises peripherally administering a therapeutically effective amount of PYY or an agonist thereof and a therapeutically effective amount of GLP-1 or an agonist thereof to the subject (c.f. **claim 1**).

The claimed subject matter differs from **D1** in that it claims a construct comprising an insulinotropic/satiety agent such as GLP-1, an anti-serum albumin dAb and optionally a third agent such as PYY.
The technical effect is an enhanced serum half-life.
Therefore, the technical problem is to provide alternative insulinotropic/anti-satiety agents with enhanced serum half life.
The claimed solution are constructs as claimed.

Starting from the teachings of **D1** (see above) and the common knowledge in the field such as **D2** (discloses that GLP-1 has a short serum half-life), a skilled person would consult the literature for suitable strategies to enhance the half-life of such an agent and retrieve e.g. **D3**.

D3claims a dual specific di- or trimeric ligand specific for e.g. TNFR1 (p55) (antagonises TNFR1) and specific for serum albumin (Kd 1 nM - 500 µM, effect of increasing serum half-life) (c.f. claims 26, 27, 41, 44). Use of linkers, covalent, non-covalent linking (e.g. avidin-streptavidin) (c.f. p 5, l 29 - p 6, l 26; p 8, l 9-21; p 9, l 21- p 10, l 6; p 11, l 11-19; p 26; p 27, 3; p 31, l 10-26 !!; claims 115-117). Intended for treating inflammation, infections, cancer, allergies (p 77, l 10-15). **D3** explicitly mentions that in addition to the half-life enhancing protein the constructs may comprise any antigen, one skilled in the art will appreciate that the choice is large and varied (c.f. § bridging page 13-14).

The applicant argued in his letter of 01.02.2007, that the current application provides for a functional link or spacer between the insulinotropic agent and a protein with a prolonged serum half-life in vivo. The spacer of the present invention being a polypeptide binding moiety, e.g. a Ag-binding fragment of an Ab that has binding specificity for a polypeptide that enhances serum half-life in vivo. The spacer having the advantage that it has an on/off rate allowing GLP-1 - receptor interactions without the interfering albumin.
The difference between the present application and **D3** being that the drug is conjugated or fused to a anti-SA single domain Ab, while **D3** describes a dual specific ligand comprising two domain Ab each having different Ag specificity, both of them binding their respective Ag

and thus having an effect. In the current application, the anti-SA domain Ab merely acts as a spacer between te GLP-1 drug and albumin.

The IPEA still considers that an updated skilled person would, without any hindsight, consider to use the new technologies available in protein chemistry. **D3** is just one example of a document describing the increase of serum-half-life of a given construct by conjugating a targeting/therapeutic agent to a molecule targeting a serum-half-life enhancing protein. A skilled person would of course be aware of the advantages of using e.g. the smaller anti-SA-domain Ab compared to direct SA coupling of the targeting/therapeutic agent.

Thus, it is still considered that the claimed constructs do not require inventive skills in view of the existing prior art.
Consequently, no inventive step can be acknowledged for the subject matter of **claims 1-61**, as far as examined (**Art. 33(3) PCT**).

6 further remarks

6.1 **Claims 21, 52, 54** do not exclude a possible human in vivo method and, thus, might be in conflict with criteria of some PCT Contracting States. The EPC, for example excludes the right to patent such claims as being contrary to the "ordre public" or morality.

6.2 In a later European regional phase objections might be raised against any expression within the description such as "...incorporated by reference..." as the regional patent law requires that the application is self-contained.

6.3 The repeated use of the non restrictive term/phrase "about", "...about...to about..." or similar terms introduces ambiguity into **claims 1-5** (c.f. **PCT Guidelines, 5.38**).

6.4 Abbreviations used within the claims (e.g. PYY, GLP, AgRP etc) should be spelled out at first occurrence, and then introduced by placing the abbreviation in parentheses after the term being abbreviated (**Art. 6 PCT**, **Guidelines 5.31**).

6.5 The use of "**a** glucagon-like peptide" is considered to be unclear as it is not evident whether the reference relates to well characterized "glucagon-like peptide" or to any peptide similar to glucagon (**Art. 6 PCT**).

6.6 Patent application numbers should be replaced by the corresponding publication numbers.

item VIII

INTERNATIONAL PRELIMINARY REPORT ON PATENTABILITY (SEPARATE SHEET)

International application No.
PCT/GB2005/004599

1 additional observations

1.1 From the experimental data provided in the application, it becomes evident that the affinity of a dAb for SA does not mandatorily correlate with its t1/2 prolonging potential (c.f. e.g. Table 4, p 79; Dom7r-3 t1/2 13.7 h, affinity 12 nM, Vk versus Dom7r-16 t1/2 34.4 h, affinity 1 µM, Vk).

1.2 The results in p 78, Table 3 show that the IL-1ra t1/2 is prolonged when attaching it to an anti-SA dAb.

However, the same table apparently also demonstrates that the t1/2 is drastically influenced by the molecule attached to the anti-SA dAb (c.f. Dom7m-16/IL-ra, t1/2 4.3 h versus Dom7m-16 HA tag, t1/2 29 h). This could indicate that the t1/2 prolonging effect of a given dAb has to be tested for each specific combination individually.

TRATADO DE COOPERACION DE PATENTES

De la
AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Para: ver forma PCT/ISA/220	**PCT** **OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL** (PCT Regla 43*bis*.1)

	Fecha de correo (*día/mes/año*) ver forma PCT/ISA/210 (segunda hoja)
Registro de referencia del solicitante o agente ver forma PCT/ISA/220	**PARA FUTURAS ACCIONES** Ver párrafo 2 a continuación

Solicitud Internacional No.	Fecha de registro internacional (*día/mes/año*)	Fecha de prioridad (*día/mes/año*)
PCT/GB2005/004599	30.11.2005	02.12.2004

Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC
INV. C07K16/46 C07K16/44 A61K47/48 A61P 1/00 A61P3/10

Solicitante
DOMANTIS LIMITED

1. Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems:

- ☒ Casilla No. I Bases de la opinión
- ☐ Casilla No. II Prioridad
- ☒ Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial
- ☐ Casilla No. IV Falta de unidad de invención
- ☒ Casilla No. V Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43*bis*.1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación
- ☐ Casilla No. VI Ciertos documentos citados
- ☐ Casilla No. VII Ciertos defectos en la solicitud internacional
- ☒ Casilla No. VIII Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional

2. **ACCIONES FUTURAS**

Si se hace una demanda para examen preliminar internacional, esta opinión generalmente será considerada como una opinión escrita de la Autoridad Examinadora Preliminar ("IPEA"). Sin embargo, esto no aplica cuando el solicitante escoge una Autoridad diferente a ésta para que sea la IPEA y la IPEA escogida le ha notificado a la Oficina Internacional de conformidad con la Regla 66.1*bis*(b) que no se considerarán las opiniones escritas de esta Autoridad de Búsqueda Internacional.

Si esta opinión es, según se estipula anteriormente, considerada una opinión escrita de la IPEA, se invita al solicitante a presentar ante la IPEA una respuesta escrita junto, cuando sea apropiado, con modificaciones, antes de la fecha de expiración de tres meses desde la fecha de envío por correo de la Forma PCT/ISA/220 o antes de la fecha de expiración de 22 meses desde la fecha de prioridad, la que expire más tarde.

Para opciones futuras, ver la Forma PCT/ISA/220.

3. Para detalles adicionales, ver las notas a la Forma PCT/ISA/220.

Nombre y dirección de correo de la ISA	Fecha de finalización de esta opinión	Funcionario Autorizado
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399-0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399-4465	ver forma PCT/ISA/210	Lechner, Oskar Teléfono No. +49 89 2399-8687

1. Observaciones adicionales

1.1 De los datos experimentales proporcionados en la solicitud, es evidente que la afinidad de un dAb por SA no se correlaciona obligatoriamente con su potencial de prolongación t1/2 (c.f. v.g. Tabla 4, p 79; Dom7r-3 t1/2 13.7 h, afinidad 12 nM, Vk frente a Dom7r-16 t1/2 34.4 h, afinidad 1 μM, Vk).

1.2 Los resultados en la p 78, Tabla 3 muestran que el IL-1ra t1/2 se prolonga al unirse a un anti-SA dAb. Sin embargo, la misma tabla aparentemente también demuestra que t1/2 está drásticamente influenciado por la molécula unida al anti-SA dAb (c.f. Dom7m-16/IL-ra, t1/2 4.3 h frente a Dom7m-16 HA tag, t1/2 29 h). Esto podría indicar que el efecto prolongado t1/2 de un dAb dado tiene que ser examinado para cada combinación específica individualmente.

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/004599

Casilla No. I Bases de esta opinión

1. Respecto al **idioma,** esta opinión se ha establecido con base en:
   ☒ La solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó

   ☐ Una traducción de la solicitud internacional al _____, que es el lenguaje de una traducción entregada para propósitos de la búsqueda internacional (Reglas 12.3(a) y 23.1(b)).

2. Respecto a cualquier **nucleótido y/o secuencia aminoácida** revelada en la solicitud internacional y necesaria para la invención reivindicada, esta opinión se ha establecido según:

   a. tipo de material:

   ☒ un listado de secuencia
   ☐ tabla(s) relacionada con el listado de secuencia

   b. formato de material:

   ☒ en formato escrito
   ☒ en formato legible por computador

   c. tiempo de presentación/suministro:

   ☐ contenido en la solicitud internacional según se registró.
   ☐ registrada junto con la solicitud internacional en formato legible por computador.
   ☒ proporcionada subsiguientemente a esta Autoridad para la búsqueda..

3. ☒ Además, en el caso en que más de una versión o copia de un listado de secuencia y/o tabla relacionada con ello se haya registrado o proporcionado, las declaraciones requeridas de que la información en las copias subsiguientes o adicionales es idéntica a aquella en la solicitud según se presentó o no va más allá de la solicitud según se registró, según lo apropiado, fueron suministradas.

4. Comentarios adicionales:

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/004599

Casilla No. III No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial

Las preguntas de si la invención reivindicada parece ser novedosa, comprender un paso inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a:

☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos. 1-61 (todas en parte)
porque:

☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos. 54-58 se relacionan con la siguiente materia objeto que no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*):

ver hoja separada

☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique elementos particulares a continuación*) o dichas reivindicaciones Nos. son tan imprecisas que no pudo formarse una opinión significativa (*especifique*):

☐ las reivindicaciones o dichas reivindicaciones Nos. están sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no pudo formarse una opinión significativa (*especificar*).

☒ no se ha establecido un reporte de búsqueda internacional para la solicitud completa o para dichas reivindicaciones Nos. 1-61

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no:

☐ presentó una lista de secuencias en papel cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ presentó una lista de secuencias en formato electrónico cumpliendo con el estándar presentado en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicha lista no estaba disponible a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ pagó los derechos de presentación tardía requeridos para la presentación de una lista de secuencias en respuesta a una invitación bajo las Reglas 13ter.1(a) o (b).

☐ no fue posible formarse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con la lista de secuencias; el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no presentó dichas tablas en formato electrónico cumpliendo con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas, y dichas tablas no estaban disponibles a la Autoridad de Búsqueda Internacional en un formato y manera aceptable a ella.

☐ las tablas relacionadas con la lista de secuencias nucleótidas y/o amino ácidas, si están en formato electrónico únicamente, no cumplen con los requerimientos técnicos presentados en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas.

☐ Ver la Casilla Suplemantaria para más detalles

OPINION ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BUSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No. PCT/GB2005/004599

Casilla No. V Afirmación razonada bajo la Regla 43 bis. 1 (a)(i) respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial; citaciones y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1. Afirmación

Novedad (N)	Si: Reivindicaciones	1-61
	No: Reivindicaciones	
Nivel inventivo (IS)	Si: Reivindicaciones	
	No: Reivindicaciones	1-61
Aplicabilidad industrial (IA)	Si: Reivindicaciones	1-53, 59-61
	No: Reivindicaciones	

2. Citaciones y explicaciones

ver hoja separada

CASILLA No. VIII Ciertas observaciones en la solicitud internacional

Las siguientes observaciones sobre la claridad de las reivindicaciones, descripción, y dibujos o sobre la pregunta si las reivindicaciones están soportadas completamente por la descripción, fueron formuladas:

ver hoja separada

Re Item III

1 No establecimiento de opinión respecto a novedad, paso inventivo y aplicabilidad industrial (Regla 67.1 PCT)

Las reivindicaciones 54-58 se relacionan con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por la disposición de la Regla 67.1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de estas reivindicaciones (Artículo 34(4)(a)(I) PCT).

2 Principales Problemas Claridad (Artículo 6 PCT)

2.1 Las reivindicaciones 1-61 no son claras en el sentido del Artículo 6 PCT puesto que comprenden compuestos definidos únicamente por su función deseada, es decir, agente insulinotrópico y agente anti-saciedad, respectivamente. Dicho tipo de definición del resultado que pretende ser obtenido no permite que el alcance de la reivindicación sea determinado. El hecho de que cualquier compuesto pueda ser examinado no elimina esta objeción, puesto que la persona versada no hubiese tenido conocimiento de antemano en cuanto a si caería dentro del alcance reivindicado, excepto por los compuestos revelados en la descripción. Se requería experimentación excesiva para examinar compuestos al azar.

Las reivindicaciones 1-61 tampoco son claras (Artículo 6 PCT) en cuanto se relacionan con análogos, agonistas y antagonistas, respectivamente, no especificados adicionalmente.

En relación con los análogos, la solicitud proporciona diferentes referencias (c.f. p 2, §2) y las definiciones (c.f. v.g. p 13, I 31 – p 14, I 11) que no son por su parte claras (Artículo 6 PCT). Por consiguiente, la búsqueda y también el examen ha estado limitado a las moléculas de GLP-1 específicamente mencionadas en la solicitud, es decir las moléculas de GLP-1 según se definen en la p 53-58, PYY(1-36), (3-36) y (22-36) así como las moléculas específicas enumeradas en la reivindicación 42 con excepción de aquellas que se refieren a agonistas o antagonistas únicamente, GIP, Exendin, OXM y Pyy, PYY (3-36), respectivamente (c.f. p 14, I 19).

2.2 Las reivindicaciones 23-61 no son claras en el sentido del Artículo 6 PCT puesto que comprenden compuestos definidos únicamente por su función deseada, es decir, un antígeno que actúa para aumentar la vida media del conjugado de fármaco o fusión en vivo, respectivamente. Dicho tipo de definición del resultado que pretende ser obtenido no permite que el alcance de la reivindicación sea determinado. El hecho de que cualquier compuesto pueda ser examinado no supera esta objeción, puesto que la persona versada no hubiese tenido conocimiento de antemano en cuanto a si cae dentro del alcance reivindicado, excepto por los compuestos revelados en la descripción. Se requiere experimentación excesiva para examinar compuestos al azar.

Por consiguiente, se ha llevado a cabo la búsqueda y examen para aquellas partes de las reivindicaciones que aparecen ser claras en vista de la descripción, a saber aquellas partes

relacionadas con las moléculas específicas, bien definidas enumeradas en la página 18.

Item V

3 Se hace referencia a los siguientes documentos:

D1: WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 de abril de 2003 (2003-04-03)

D2: MEIER J ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 AS A REGULATOR OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT: THERAPEUTIC PERSPECTIVES" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 de abril de 2002 (2002-04-12), páginas 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999

D3: WO 03/057235 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 17 de julio de 2003 (2003-07-17)

4. Novedad (Artículo 33(2) PCT)

4.1 Ninguno de los documentos de la técnica anterior a la mano explícitamente revela 1) una fusión de fármaco que tenga la fórmula: a-(X)nl-b-(Y)n2-c-(Z)n3-d o a-(Z)n3-b-(Y)n2-c-(X)nl-d, donde X es un agente insulinotrópico o un análogo del mismo; Y es un dominio variable de cadena fuerte de inmunoglobulina (VH) que tiene especificidad ligante para la albúmina del suero, o un dominio variable de cadena suave de inmunoglobulina (VL) que tiene especificidad ligante para la albúmina del suero; Z es un fármaco polipéptido que tienen especificidad ligante para un objetivo; a, b, c y d son independientemente un polipéptido que comprende de uno hasta cerca de 100 residuos de amino ácido o ausente; nl es uno hasta cerca de 10; n2 es uno hasta cerca de 10; y n3 es cero hasta cerca de 10, 2) o uno de los constructos específicos reivindicados en las otras reivindicaciones.

Por lo tanto, la materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto se ha examinado (ver arriba), tiene que ser considerada novedosa (Art. 33(2), PCT).

5. Paso Inventivo (Artículo 33(3) PCT)

La materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto se ha examinado, no parece comprender un paso inventivo en el sentido del Art. 33(3), PCT por las siguientes razones:

D1 es considerado la técnica anterior más cercana y reivindica un método para disminuir el consumo de calorías/disminuir el apetito/consumo de alimentos/control de peso/reducción o prevención de la obesidad, que comprende administrar periféricamente una cantidad efectiva

terapéuticamente de PYY o un agonista del mismo y una cantidad efectiva terapéuticamente de GLP-1 o un agonista del mismo para el sujeto (c.f. reivindicación 1).

La materia objeto difiere de D1 en que reivindica un constructo que comprende un agente insulinotrópico/saciedad tal como GLP-1, un dAb albúmina del anti-suero y un tercer agente tal como PYY.
El efecto técnico es una vida media mejorada del suero.
Por lo tanto, el problema técnico es proporcionar agentes insulinotrópicos/anti-saciedad con una vida media mejorada del suero.
La solución reivindicada son constructos según se reivindicaron.

Comenzando de las enseñanzas de D1 (ver arriba) y el conocimiento común en el campo tal como D2 (revela que GLP-1 tiene una vida media corta del suero), una persona versada consultaría la literatura para estrategias apropiadas para mejorar la vida media de dicho agente y recuperar v.g. D3.

D3 reivindica un ligando di- o trimérico específico doble específico para v.g. TNFR1 (p 55) (antagoniza el TNFR1) y específico para albúmina del suero (Kd 1 nM – 500 μM, efecto de aumentar la vida media del suero) (c.f. reivindicaciones 26, 27, 41, 44). Uso de ligantes, covalentes, ligantes no covalentes (v.g. avidin-estreptavidin) (c.f. p 5, I 29 – p 6, I 26; p 8, I 9-21; p 9, I 21- p 10, I 6; p 11, I 11-19; p 26; p 27, 3; p 31, I 10-26 II; reivindicaciones 115-117). Para tratar inflamación, infecciones, cáncer, alergias (p 77, I 10-15). D3 explícitamente menciona que además de la proteína que mejora la vida media los constructos pueden comprender cualquier antígeno, una persona versada en la técnica apreciará que la escogencia sea larga y variada (c.f. § página de unión 13-14).

Por lo tanto, parecería que los constructos reivindicados no requerirían habilidades inventivas en vista de la técnica anterior existente.
Por consiguiente, no puede reconocerse ningún paso inventivo para la materia objeto de las reivindicaciones 1-61, en cuanto han sido examinadas (Artículo 33(3) PCT).

6 comentarios adicionales

6.1 Las reivindicaciones 21, 52, 54 no excluyen un método en vivo humano posible y, por lo tanto, podrían estar en conflicto con los criterios de algunos Estados Contratantes del PCT. La EPC, por ejemplo, excluye el derecho a patentar dichas reivindicaciones por ser contrarias al "orden público" o a la moralidad.

6.2 En una fase regional europea posterior pueden elevarse objeciones contra cualquier expresión

dentro de la descripción tal como "...incorporado por referencia..." como la ley de patente regional requiere que la solicitud esté contenida en sí misma.

6.3 El uso repetido del término/frase no restringido "cerca", "...cerca...hasta cerca de..." o términos semejantes introduce ambigüedad en las reivindicaciones 1-5 (c.f. Lineamientos del PCT, 5.38).

6.4 Las abreviaturas usadas dentro de las reivindicaciones (v.g. PYY, GLP, AgRP, etc.) debe deletrearse en la primera ocurrencia, y luego introducirse colocando la abreviatura en paréntesis después del término que se abrevia (Art. 6 PCT, Lineamientos del PCT, 5.31).

6.5 El uso de "**un** péptido semejante al glucagón" no es considerado claro ya que no es evidente si la referencia se relaciona con el bien caracterizado "péptido semejante al glucagón" o a cualquier péptido semejante al glucagón (Art. 6 PCT).

6.6 Los números de la solicitud de patente deben remplazarse por los números de la publicación correspondiente.

Item VIII

1. Observaciones adicionales

1.1 De los datos experimentales proporcionados en la solicitud, es evidente que la afinidad de un dAb por SA no se correlaciona obligatoriamente con su potencial de prolongación t1/2 (c.f. v.g. Tabla 4, p 79; Dom7r-3 t1/2 13.7 h, afinidad 12 nM, Vk frente a Dom7r-16 t1/2 34.4 h, afinidad 1 μM, Vk).

1.2 Los resultados en la p 78, Tabla 3 muestran que el IL-1ra t1/2 se prolonga al unirse a un anti-SA dAb.

Sin embargo, la misma tabla aparentemente también demuestra que t1/2 está drásticamente influenciado por la molécula unida al anti-SA dAb (c.f. Dom7m-16/IL-ra, t1/2 4.3 h frente a Dom7m-16 HA tag, t1/2 29 h). Esto podría indicar que el efecto prolongado t1/2 de un dAb dado tiene que ser examinado para cada combinación específica individualmente.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To:

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

(PCT Rule 43*bis*.1)

Date of mailing *(day/month/year)* see form PCT/ISA/210 (second sheet)	
Applicant's or agent's file reference see form PCT/ISA/220	**FOR FURTHER ACTION** See paragraph 2 below
International application No. PCT/GB2005/004599	International filing date *(day/month/year)* 30.11.2005
Priority date *(day/month/year)* 02.12.2004	
International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC INV. C07K16/46 C07K16/44 A61K47/48 A61P1/00 A61P3/10	
Applicant DOMANTIS LIMITED	

1. This opinion contains indications relating to the following items:

- ☒ Box No. I Basis of the opinion
- ☐ Box No. II Priority
- ☒ Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability
- ☐ Box No. IV Lack of unity of invention
- ☒ Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement
- ☐ Box No. VI Certain documents cited
- ☐ Box No. VII Certain defects in the international application
- ☒ Box No. VIII Certain observations on the international application

2. **FURTHER ACTION**

If a demand for international preliminary examination is made, this opinion will usually be considered to be a written opinion of the International Preliminary Examining Authority ("IPEA") except that this does not apply where the applicant chooses an Authority other than this one to be the IPEA and the chosen IPEA has notifed the International Bureau under Rule 66.1*bis*(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If this opinion is, as provided above, considered to be a written opinion of the IPEA, the applicant is invited to submit to the IPEA a written reply together, where appropriate, with amendments, before the expiration of 3 months from the date of mailing of Form PCT/ISA/220 or before the expiration of 22 months from the priority date, whichever expires later.

For further options, see Form PCT/ISA/220.

3. For further details, see notes to Form PCT/ISA/220.

Name and mailing address of the ISA:	Date of completion of this opinion	Authorized Officer
European Patent Office D-80298 Munich Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	see form PCT/ISA/210	Lechner, Oskar Telephone No. +49 89 2399-8687

Form (PCT/ISA/237) (Cover Sheet) (April 2005)

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. I Basis of the opinion

1. With regard to the **language**, this opinion has been established on the basis of:

   ☒ the international application in the language in which it was filed

   ☐ a translation of the international application into , which is the language of a translation furnished for the purposes of international search (Rules 12.3(a) and 23.1 (b)).

2. With regard to any **nucleotide and/or amino acid sequence** disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, this opinion has been established on the basis of:

   a. type of material:

      ☒ a sequence listing

      ☐ table(s) related to the sequence listing

   b. format of material:

      ☒ on paper

      ☒ in electronic form

   c. time of filing/furnishing:

      ☐ contained in the international application as filed.

      ☐ filed together with the international application in electronic form.

      ☒ furnished subsequently to this Authority for the purposes of search.

3. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

4. Additional comments:

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. III Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

The questions whether the claimed invention appears to be novel, to involve an inventive step (to be non obvious), or to be industrially applicable have not been examined in respect of

☐ the entire international application

☒ claims Nos. 1-61 (all in part)

because:

☒ the said international application, or the said claims Nos. 54-58 relate to the following subject matter which does not require an international search *(specify)*:

see separate sheet

☐ the description, claims or drawings *(indicate particular elements below)* or said claims Nos. are so unclear that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☐ the claims, or said claims Nos. are so inadequately supported by the description that no meaningful opinion could be formed *(specify)*:

☒ no international search report has been established for the whole application or for said claims Nos. 1-61 (all in part)

☐ a meaningful opinion could not be formed without the sequence listing; the applicant did not, within the prescribed time limit:

- ☐ furnish a sequence listing on paper complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ furnish a sequence listing in electronic form complying with the standard provided for in Annex C of the Administrative Instructions, and such listing was not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.
- ☐ pay the required late furnishing fee for the furnishing of a sequence listing in response to an invitation under Rules 13*ter*.1(a) or (b).

☐ a meaningful opinion could not be formed without the tables related to the sequence listings; the applicant did not, within the prescribed time limit, furnish such tables in electronic form complying with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions, and such tables were not available to the International Searching Authority in a form and manner acceptable to it.

☐ the tables related to the nucleotide and/or amino acid sequence listing, if in electronic form only, do not comply with the technical requirements provided for in Annex C-*bis* of the Administrative Instructions.

☐ See Supplemental Box for further details

WRITTEN OPINION OF THE INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

International application No.
PCT/GB2005/004599

Box No. V Reasoned statement under Rule 43*bis*.1(a)(i) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement

1. Statement

Novelty (N)	Yes:	Claims	1-61
	No:	Claims	
Inventive step (IS)	Yes:	Claims	
	No:	Claims	1-61
Industrial applicability (IA)	Yes:	Claims	1-53, 59-61
	No:	Claims	

2. Citations and explanations

see separate sheet

Box No. VIII Certain observations on the international application

The following observations on the clarity of the claims, description, and drawings or on the question whether the claims are fully supported by the description, are made:

see separate sheet

Item III

1 **Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability (Rule 67.1, PCT)**

Claims 54-58 relate to subject matter considered by this Authority to be covered by the provisions of **Rule 67.1(iv), PCT**. Consequently, no opinion will be formulated with respect to the industrial applicability of the subject matter of these claims **(Article 34(4)(a)(I), PCT)**.

2 **Major Clarity problems (Article 6, PCT)**

2.1 **Claims 1-61** are unclear in the sense of **Art. 6, PCT** as they encompass compounds defined only by their desired function, i.e. insulinotropic agent and anti satiety agent, respectively. Such a result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.

Claims 1-61 are also unclear (**Art. 6, PCT**) as far as relating to not further specified analogues, agonists and antagonists, respectively.

Concerning analogs the application provides different references (c.f. p 2, §2) and definitions (c.f. e.g. p 13, l 31 - p 14, l 11) which are on their part unclear (**Art. 6, PCT**). Consequently, the search and also examination has been limited to the GLP-1 molecules specifically mentioned in the application, i.e. the GLP-1 molecules as defined on p 53-58, PYY(1-36), (3-36) and (22-36) as well as the specific molecules listed in **claim 42** with the exception of those referring to agonists or antagonists only, GIP, Exendin, OXM and Pyy, PYY (3-36), respectively (c.f. p 14, l 19).

2.2 **Claims 23-61** are unclear in the sense of **Art. 6, PCT** as they encompass compounds defined only by their desired function, i.e. antigen acting to increase the half-life of the drug conjugate or fusion in vivo, respectively. Such a result-to-be-achieved type of definition does not allow the scope of the claim to be ascertained. The fact that any compound could be screened does not overcome this objection, as the skilled person would not have knowledge beforehand as to whether it would fall within the scope claimed, except for the compounds disclosed in the description. Undue experimentation would be required to screen compounds randomly.

Consequently, the search and examination has been carried out for those parts of the

claims which appear to be clear in view of the description, namely those parts relating to the specific, well defined molecules listed on page 18.

Item V

3 Reference is made to the following documents:

D1: WO 03/026591 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 3 April 2003 (2003-04-03)

D2: MEIER J J ET AL: "GLUCAGON-LIKE PEPTIDE 1 AS A REGULATOR OF FOOD INTAKE AND BODY WEIGHT: THERAPEUTIC PERSPECTIVES" EUROPEAN JOURNAL OF PHARMACOLOGY, AMSTERDAM, NL, vol. 440, no. 2/3, 12 April 2002 (2002-04-12), pages 269-279, XP001113094 ISSN: 0014-2999

D3: WO 03/057235 A (IMPERIAL COLLEGE INNOVATIONS LTD; OREGON HEALTH AND SCIENCE UNIVERSITY) 17 July 2003 (2003-07-17)

4 Novelty (Art. 33(2), PCT)

4.1 None of the prior art documents at hand explicitly disclose 1) a drug fusion having the formula: a-(X)nl-b-(Y)n2-c-(Z)n3-d or a-(Z)n3-b-(Y)n2-c-(X)nl-d, wherein X is an insulinotropic agent or an analogue thereof; Y is an immunoglobulin heavy chain variable domain (VH) that has binding specificity for serum albumin, or an immunoglobulin light chain variable domain (VL) that has binding specificity for serum albumin; Z is a polypeptide drug that has binding specificity for a target; a, b, c and d are independently a polypeptide comprising one to about 100 amino acid residues or absent; nl is one to about 10; n2 is one to about 10; and n3 is zero to about 10, 2) or one of the specific constructs claimed in the other claims.

Therefore, the subject matter of **claims 1-61**, as far as examined (see above), has to be considered to be novel **(Art. 33(2), PCT)**.

5 Inventive step (Art. 33(3), PCT)

The subject matter of **claims 1-61**, as far as examined, would not appear to involve an inventive step in the sense of **Art. 33(3), PCT** for the following reasons:

D1 is considered to be the closest prior art and claims a method for decreasing calorie intake/decreasing appetite/food intake/weight control/reduction or prevention of obesity, which comprises peripherally administering a therapeutically effective amount of PYY or an

agonist thereof and a therapeutically effective amount of GLP-1 or an agonist thereof to the subject (c.f. **claim 1**).

The claimed subject matter differs from **D1** in that it claims a construct comprising an insulinotropic/satiety agent such as GLP-1, an anti-serum albumin dAb and a third agent such as PYY.
The technical effect is an enhanced serum half-life.
Therefore, the technical problem is to provide insulinotropic/anti-satiety agents with enhanced serum half life.
The claimed solution are constructs as claimed.

Starting from the teachings of **D1** (see above) and the common knowledge in the field such as **D2** (discloses that GLP-1 has a short serum half-life), a skilled person would consult the literature for suitable strategies to enhance the half-life of such an agent and retrieve e.g. **D3**.

D3claims a dual specific di- or trimeric ligand specific for e.g. TNFR1 (p55) (antagonises TNFR1) and specific for serum albumin (Kd 1 nM - 500 µM, effect of increasing serum half-life) (c.f. claims 26, 27, 41, 44). Use of linkers, covalent, non-covalent linking (e.g. avidin-streptavidin) (c.f. p 5, l 29 - p 6, l 26; p 8, l 9-21; p 9, l 21- p 10, l 6; p 11, l 11-19; p 26; p 27, 3; p 31, l 10-26 !!; claims 115-117). Intended for treating inflammation, infections, cancer, allergies (p 77, l 10-15). **D3** explicitly mentions that in addition to the half-life enhancing protein the constructs may comprise any antigen, one skilled in the art will appreciate that the choice is large and varied (c.f. § bridging page 13-14).

Thus, it would appear that the claimed constructs would not require inventive skills in view of the existing prior art.
Consequently, no inventive step can be acknowledged for the subject matter of **claims 1-61**, as far as examined (**Art. 33(3), PCT**).

6 further remarks

6.1 **Claims 21, 52, 54** do not exclude a possible human in vivo method and, thus, might be in conflict with criteria of some PCT Contracting States. The EPC, for example excludes the right to patent such claims as being contrary to the "ordre public" or morality.

6.2 In a later European regional phase objections might be raised against any expression

within the description such as "...incorporated by reference..." as the regional patent law requires that the application is self-contained.

6.3 The repeated use of the non restrictive term/phrase "about", "...about...to about..." or similar terms introduces ambiguity into **claims 1-5** (c.f. **PCT Guidelines, 5.38**).

6.4 Abbreviations used within the claims (e.g. PYY, GLP, AgRP etc) should be spelled out at first occurrence, and then introduced by placing the abbreviation in parentheses after the term being abbreviated (**Art. 6, PCT, Guidelines 5.31**).

6.5 The use of "a glucagon-like peptide" is considered to be unclear as it is not evident whether the reference relates to well characterized "glucagon-like peptide" or to any peptide similar to glucagon (**Art. 6, PCT**).

6.6 Patent application numbers should be replaced by the corresponding publication numbers.

item VIII

1 additional observations

1.1 From the experimental data provided in the application, it becomes evident that the affinity of a dAb for SA does not mandatorily correlate with its t1/2 prolonging potential (c.f. e.g. Table 4, p 79; Dom7r-3 t1/2 13.7 h, affinity 12 nM, Vk versus Dom7r-16 t1/2 34.4 h, affinity 1 µM, Vk).

1.2 The results in p 78, Table 3 show that the IL-1ra t1/2 is prolonged when attaching it to an anti-SA dAb.

However, the same table apparently also demonstrates that the t1/2 is drastically influenced by the molecule attached to the anti-SA dAb (c.f. Dom7m-16/IL-ra, t1/2 4.3 h versus Dom7m-16 HA tag, t1/2 29 h). This could indicate that the t1/2 prolonging effect of a given dAb has to be tested for each specific combination individually.

ANEXO EXPLICATIVO DE MODIFICACIONES A LAS REIVINDICACIONES

En ejercicio del derecho conferido por el Articulo 28 numeral 1 del Tratado de Cooperación en materia de Patentes PCT, atentamente me permito informar a ese Despacho que el capitulo reivindicatorio tal como fue presentado originalmente en Fase Internacional ha sido modificado.

Las modificaciones realizadas se encuentran plenamente sustentadas en la descripción de la presente invención y en este sentido, no configuran una ampliación del invento o de la divulgación contenida en la solicitud presentada.

FANTICUERPOS 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.

FANTICUERPOS 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,

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

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

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).

La figura 16A es una ilustración de la secuencia de nucleótidos que codifica la fusión de [Pro^9] GLP-1-Dom7h8 (SEQ ID NO: 175) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO:176).

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: 177) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO: 178).

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: 179) y de la secuencia de aminoácidos de la fusión (SEQ ID NO: 180).

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:181), PYY (3-36) DOM7h-8 (SEQ ID NO:182) y [Pro^9] GLP-1(3-37)-DOM 7h-8 PYY (3-36) (SEQ ID NO: 183) 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

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

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):

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, γ1, γ2, γ3, γ4), μ, α (por ejemplo, α1, α2), 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 γ1, región constante γ2) 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

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.

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

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

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_K, 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_K que

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(*I*):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

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:

$$a\text{-}(X)_{n1}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(Z)_{n3}\text{-}d \quad \text{o} \quad a\text{-}(Z)_{n3}\text{-}b\text{-}(Y)_{n2}\text{-}c\text{-}(X)_{n1}\text{-}d;$$

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

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_K 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^{8}GLP-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^{9}GLP-1 (7-36) o Pro^{9}GLP-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:171

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;

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: 172

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: 173

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

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGPSSGAPPSKKKKKK -amida - SEQ ID NO: 174.

En otra modalidad el péptido GLP-1 es

HGEGTFTSDLSKQMEEEAVRLFIEWLKNGGX - SEQ ID NO: 175

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 Vκ 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.

<u>Conjugado de fármaco no covalentes</u>

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

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 (Vκ):

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 Vκ 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 Vκ) 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

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).

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)

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 IL1l-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

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

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

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).

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	

	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-Trp-Tyr-Thr-NH2	Antagonista de uPA/uPAR

	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 Trp-Val-Arg-Trp-His	

	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 pPICzα 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 dèl 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.

Fig. 1A

VK seleccionados contra MSA

Numeración Kabat	5	10	15	20	25	30	35
MSA16	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I					I K H L K W	
MSA 12	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I					F R H L K W	
MSA 26	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I					Y Y H L K W	

Numeración Kabat	40	45	50	55	60	65	70
MSA16	Y Q Q K P G K A P K L L I Y G A S R L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
MSA 12	Y Q Q K P G K A P K L L I Y A A S R L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
MSA 26	Y Q Q K P G K A P K L L I Y K A S T L Q S G V P S R F S G S G S G T D						

Numeración Kabat	75	80	85	90	95	100	105
MSA16	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q G A R W P Q T F G Q G T K V E						
MSA 12	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V A L Y P K T F G Q G T K V E						
MSA 26	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V R K V P R T F G Q G T K V E						

Numeración Kabat	
MSA16	I K R
MSA 12	I K R
MSA 26	I K R

Fig. 1B

VK seleccionados contra MSA

Numeración Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-1	D I Q T T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-3	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-4	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I G R Y L R W						
DOM7r-5	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I S R Q L R W						
DOM7r-7	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q Y I G R Y L R W						
DOM7r-8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I H R Q L K W						

Numeración Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7r-1	Y Q Q K P G K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-3	Y Q Q K P G K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-4	Y Q Q K P G K A P K L L I Y N G S Q L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-5	Y Q Q K P G K A P R L L I Y G A S V L Q S G I P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-7	Y Q Q K P G K A P K L L I Y D S S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-8	Y Q Q K P G K A P K L L I Y Y A S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D						

Numeración Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7r-1	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y R M P Y T F G Q G T R V E						
DOM7r-3	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y M Q P F T F G Q G T K V E						
DOM7r-4	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y L Q P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-5	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y I T P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-7	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y S S P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-8	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T F S K P S T F G Q G T K V E						

Numeración Kabat	
DOM7r-1	I K R
DOM7r-3	I K R
DOM7r-4	I K R
DOM7r-5	V K R
DOM7r-7	I K R
DOM7r-8	I K R

Fig. 1C

VK seleccionados contra MSA

Numeración Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-2	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I A T Y L N W						
DOM7h-3	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I D T G L A W						
DOM7h-4	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q E I Y S W L A W						
DOM7h-6	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-1	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						
DOM7h-7	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I S S Y L N W						

Numeración Kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7h-2	Y Q Q K P G K A P K L L I Y R S S S L Q S A V P S R F S G S G S G T V						
DOM7h-3	Y Q Q K P G K A P R L L I Y N V S R L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-4	Y Q Q R P G K A P K L L I Y N A S H L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-6	Y Q Q K P G K A P T L L I Y R L S V L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-1	Y Q Q K P G K A P K L L I Y R N S F L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7h-7	Y Q Q K P G K A P K L L I Y R N S Q L Q S G V P S R F S G S G S G T D						

Numeración Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7h-2	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y A V P P T F G Q G T K V E						
DOM7h-3	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y W G S P T T F G Q G T K V E						
DOM7h-4	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q V I G D P V T F G Q G T K V E						
DOM7h-6	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y N V P P T F G Q G T K V E						
DOM7h-1	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y T V P P T F G Q G T K V E						
DOM7h-7	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T F A V P P T F G Q G T K V E						

Numeración Kabat	
DOM7h-2	I K R
DOM7h-3	I K R
DOM7h-4	I K R
DOM7h-6	I K R
DOM7h-1	I K Q
DOM7h-7	I K R

Fig. 1D

VK seleccionados contra MSA

Numeración Kabat	5				10				15				20				25				30				35
DOM7h-22	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	K	Y	W	M	S
DOM7h-23	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	Y	D	Y	N	M	S
DOM7h-24	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	H	R	Y	S	M	S
DOM7h-25	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	W	K	Y	N	M	A
DOM7h-26	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	T	A	S	G	F	T	F	D	E	Y	N	M	S
DOM7h-21	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	D	L	Y	D	M	S
DOM7h-27	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S	D	Y	R	M	S
	E	V	Q	L	L	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	R	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	X	X	Y	N	M	S

Numeración Kabat	40				45				50				54				59				64				69
DOM7h-22	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	D	F	M	G	P	H	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-23	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	T	I	T	H	T	G	G	V	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-24	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	T	I	L	P	G	G	D	V	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-25	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	T	I	L	G	E	G	N	N	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-26	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	T	I	L	P	H	G	D	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-21	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	S	I	V	N	S	G	V	R	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I
DOM7h-27	W	V	R	Q	A	P	G	K	G	L	E	W	V	S	T	I	I	S	N	G	K	F	T	Y	Y	A	D	S	V	K	G	R	F	T	I

Numeración Kabat	74				79				82b				86				91				96				100a
DOM7h-22	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	G	R	T	S	M	L	P
DOM7h-23	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Q	N	P	S	Y	Q	-
DOM7h-24	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Q	T	P	D	Y	M	-
DOM7h-25	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	T	M	D	Y	K	-	-
DOM7h-26	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Q	D	P	L	Y	R	-
DOM7h-21	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	L	N	Q	S	Y	H	W
DOM7h-27	S	R	D	N	S	K	N	T	L	Y	L	Q	M	N	S	L	R	A	E	D	T	A	V	Y	Y	C	A	K	Q	D	W	M	Y	M	-

Numeración Kabat	100o				105				110			
DOM7h-22	M	K	G	K	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-23	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-24	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-25	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-26	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-21	D	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7h-27	-	-	-	-	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Fig. 1E

VK seleccionados contra MSA

Numeración Kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7h-8	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I					S Y L N W	
DOM7r-13	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I					H R E L R W	
DOM7r-14	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q H I					H R E L R W	

	40	45	50	55	60	65	70
DOM7h-8	Y Q Q K P G K A P K L L I Y R N S P L Q S G V P S R F S G					S G S G T D	
DOM7r-13	Y Q Q K P G K A P K L L I Y Q A S R L Q S G V P S R F S G					S G S G T D	
DOM7r-14	Y Q Q K P G K A P K L L I Y Q A S R L Q S G V P S R F S G					S G S G T D	

Numeración Kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7h-8	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T Y R V P P T F G					Q G T K V E	
DOM7r-13	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q K Y L P Y T F G					Q G T K V E	
DOM7r-14	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y R V P Y T F G					Q G T K V E	

Numeración Kabat	
DOM7h-8	I K R
DOM7r-13	I K R
DOM7r-14	I K R

Fig. 2A

(i) diagramas de vector

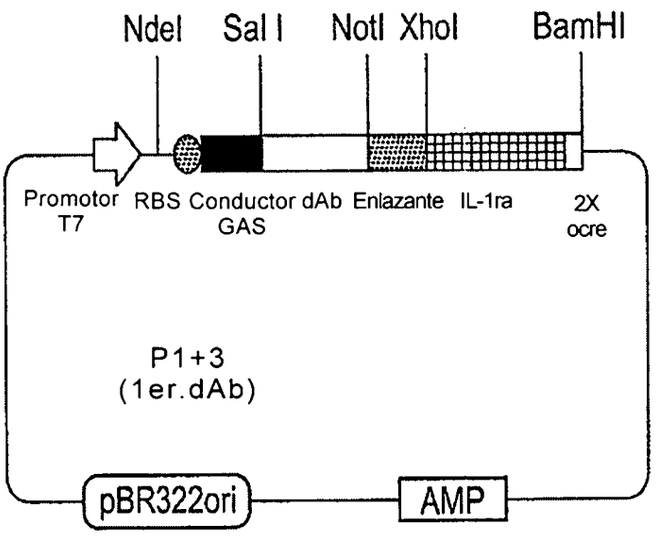


Fig. 2B

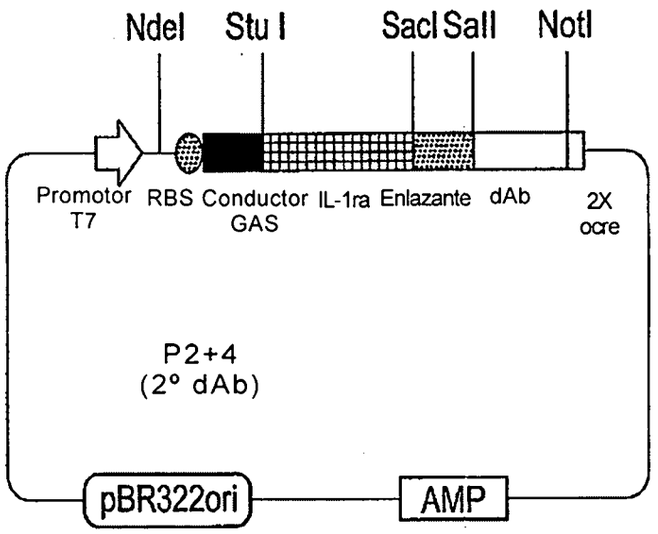


Fig. 2C

(ii) secuencia de aminoácidos y de ácido nucleico de IL-1ra, fusiones dAb, IL-1ra MSA16

```
  1  R  P  S  G  R  K  S  S  K  M  Q  A  F  R  I  W  D  V  N  Q
  1  AGGCCTTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAG

 21  K  T  F  Y  L  R  N  N  Q  L  V  A  G  Y  L  Q  G  P  N  V
 61  AAGACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTC

 41  N  L  E  E  K  I  D  V  V  P  I  E  P  H  A  L  F  L  G  I
121  AATTTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATC

 61  H  G  G  K  M  C  L  S  C  V  K  S  G  D  E  T  R  L  Q  L
181  CATGGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTG

 81  E  A  V  N  I  T  D  L  S  E  N  R  K  Q  D  K  R  F  A  F
241  GAGGCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTTC

101  I  R  S  D  S  G  P  T  T  S  F  E  S  A  A  C  P  G  W  F
301  ATCCGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGGTTC

121  L  C  T  A  M  E  A  D  Q  P  V  S  L  T  N  M  P  D  E  G
361  CTCTGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGC

141  V  M  V  T  K  F  Y  F  Q  E  D  E  S  S  G  G  G  G  S  G
421  GTCATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGAGCTCAGGTGGAGGCGGTTCAGGC

161  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  T
481  GGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCAGGTGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGGTCGACG

181  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R  V  T
541  GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGTGTCACC

201  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  I  K  H  L  K  W  Y  Q  Q  K  P
601  ATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTTAAAGTGGTACCAGCAGAAACCA

221  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  G  A  S  R  L  Q  S  G  V  P  S
661  GGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCA

241  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L  Q  P
721  CGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCT
```

Fig. 2D

```
261   E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  G  A  R  W  P  Q  T  F  G  Q
781   GAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTCGGCCAA

281   G  T  K  V  E  I  K  R  A  A  A  -  -
841   GGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCATAATAA
```

Fig. 2E

IL-1ra MSA16

```
  1  S  T  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
  1 TCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGT

 21  V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  I  K  H  L  K  W  Y  Q  Q
 61 GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTATTAAGCATTTAAAGTGGTACCAGCAG

 41  K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  G  A  S  R  L  Q  S  G  V
121 AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGGTGCATCCCGGTTGCAAAGTGGGGTC

 61  P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L
181 CCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG

 81  Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  G  A  R  W  P  Q  T  F
241 CAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGGGGGCTCGGTGGCCTCAGACGTTC

101  G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R  A  A  A  S  G  G  G  G  S  G
301 GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCAAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGC

121  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  R
361 GGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCAGGTGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCTCGAGG

141  P  S  G  R  K  S  S  K  M  Q  A  F  R  I  W  D  V  N  Q  K
421 CCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAG

161  T  F  Y  L  R  N  N  Q  L  V  A  G  Y  L  Q  G  P  N  V  N
481 ACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT

181  L  E  E  K  I  D  V  V  P  I  E  P  H  A  L  F  L  G  I  H
541 TTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCAT

201  G  G  K  M  C  L  S  C  V  K  S  G  D  E  T  R  L  Q  L  E
601 GGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAG

221  A  V  N  I  T  D  L  S  E  N  R  K  Q  D  K  R  F  A  F  I
661 GCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTTCATC

241  R  S  D  S  G  P  T  T  S  F  E  S  A  A  C  P  G  W  F  L
721 CGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTC
```

Fig. 2F

```
261   C  T  A  M  E  A  D  Q  P  V  S  L  T  N  M  P  D  E  G  V
781   TGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGCGTC

281   M  V  T  K  F  Y  F  Q  E  D  E  -  -
841   ATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGTAATAA
```

Fig. 2G

IL-1ra ficticia

```
  1   S  T  D  I  Q  M  T  Q  S  P  S  S  L  S  A  S  V  G  D  R
  1   TCGACGGACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACCGT

 21   V  T  I  T  C  R  A  S  Q  S  I  S  S  Y  L  N  W  Y  Q  Q
 61   GTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGAGCATTAGCAGCTATTTAAATTGGTACCAGCAG

 41   K  P  G  K  A  P  K  L  L  I  Y  A  A  S  S  L  Q  S  G  V
121   AAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCTATGCTGCATCCAGTTTGCAAAGTGGGGTC

 61   P  S  R  F  S  G  S  G  S  G  T  D  F  T  L  T  I  S  S  L
181   CCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTG

 81   Q  P  E  D  F  A  T  Y  Y  C  Q  Q  S  Y  S  T  P  N  T  F
241   CAACCTGAAGATTTTGCTACGTACTACTGTCAACAGAGTTACAGTACCCCTAATACGTTC

101   G  Q  G  T  K  V  E  I  K  R  A  A  A  S  G  G  G  G  S  G
301   GGCCAAGGGACCAAGGTGGAAATCAAACGGGCGGCCGCAAGCGGTGGAGGCGGTTCAGGC

121   G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  G  G  G  G  S  R
361   GGAGGTGGCAGCGGCGGTGGCGGGTCAGGTGGTGGCGGAAGCGGCGGTGGCGGCTCGAGG

141   P  S  G  R  K  S  S  K  M  Q  A  F  R  I  W  D  V  N  Q  K
421   CCCTCTGGGAGAAAATCCAGCAAGATGCAAGCCTTCAGAATCTGGGATGTTAACCAGAAG

161   T  F  Y  L  R  N  N  Q  L  V  A  G  Y  L  Q  G  P  N  V  N
481   ACCTTCTATCTGAGGAACAACCAACTAGTTGCCGGATACTTGCAAGGACCAAATGTCAAT

181   L  E  E  K  I  D  V  V  P  I  E  P  H  A  L  F  L  G  I  H
541   TTAGAAGAAAAGATAGATGTGGTACCCATTGAGCCTCATGCTCTGTTCTTGGGAATCCAT

201   G  G  K  M  C  L  S  C  V  K  S  G  D  E  T  R  L  Q  L  E
601   GGAGGGAAGATGTGCCTGTCCTGTGTCAAGTCTGGTGATGAGACCAGACTCCAGCTGGAG

221   A  V  N  I  T  D  L  S  E  N  R  K  Q  D  K  R  F  A  F  I
661   GCAGTTAACATCACTGACCTGAGCGAGAACAGAAAGCAGGACAAGCGCTTCGCCTTCATC

241   R  S  D  S  G  P  T  T  S  F  E  S  A  A  C  P  G  W  F  L
721   CGCTCAGACAGTGGCCCCACCACCAGTTTTGAGTCTGCCGCCTGCCCCGGTTGGTTCCTC
```

Fig. 2H

```
261   C  T  A  M  E  A  D  Q  P  V  S  L  T  N  M  P  D  E  G  V
781   TGCACAGCGATGGAAGCTGACCAGCCCGTCAGCCTCACCAATATGCCTGACGAAGGCGTC

281   M  V  T  K  F  Y  F  Q  E  D  E  -  -
841   ATGGTCACCAAATTCTACTTCCAGGAGGACGAGTAATAA
```

Fig. 3A

(i) análisis de IL-8 en HeLa

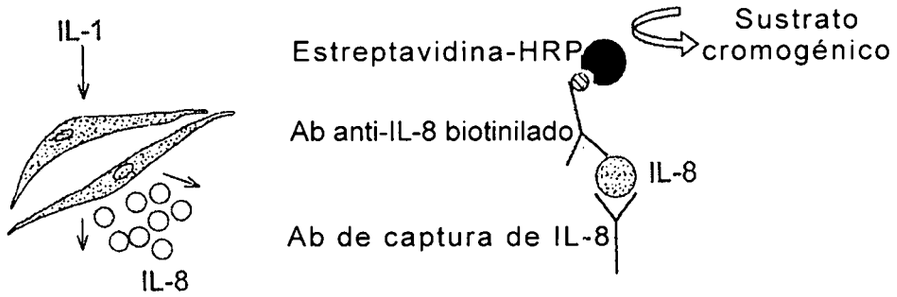


Fig. 3B

(ii) Resultados del bioanálisis de IL-8 en HeLa para orientaciones MSA IL-1ra

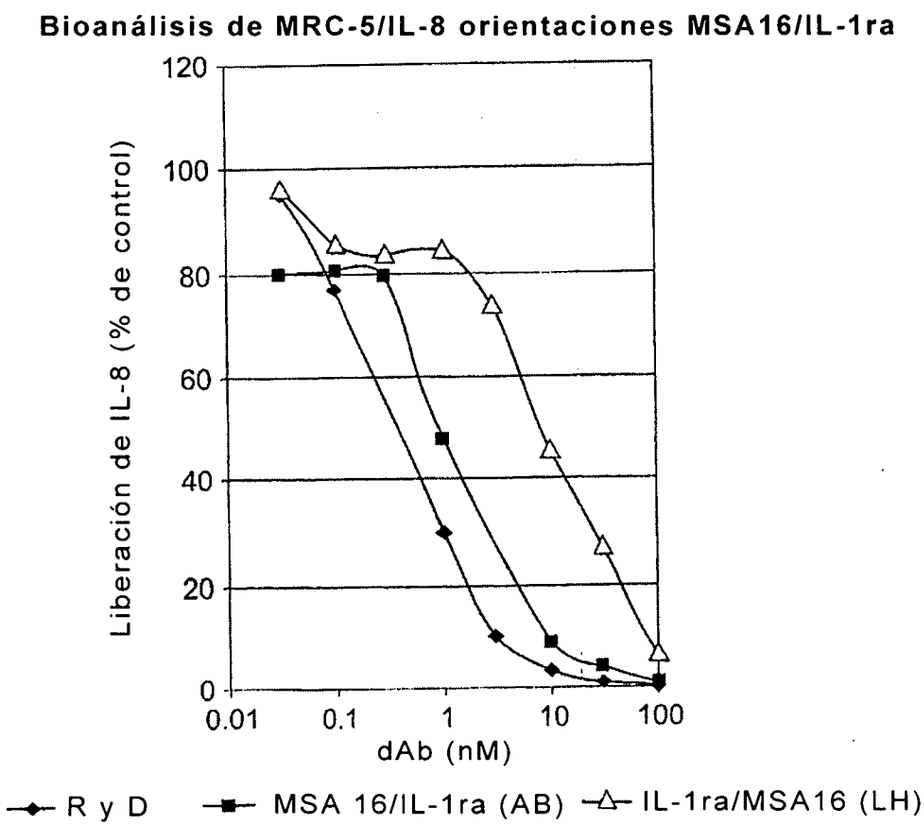


Fig. 4A

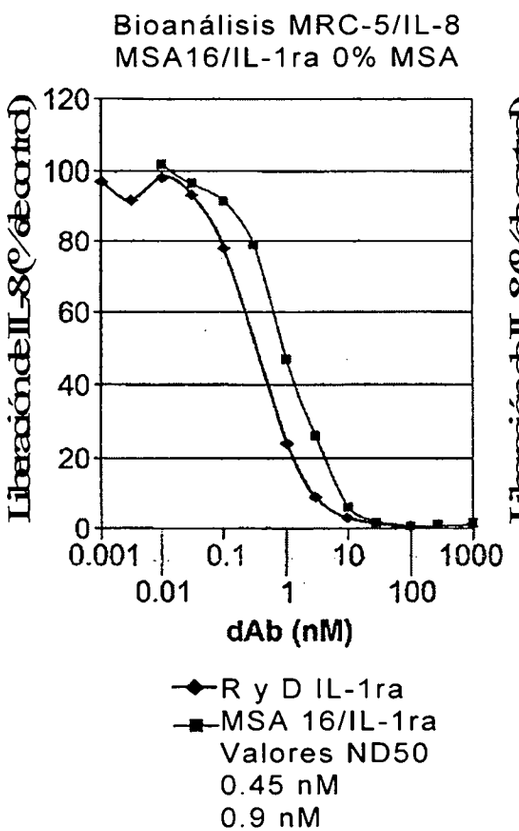


Fig. 4B

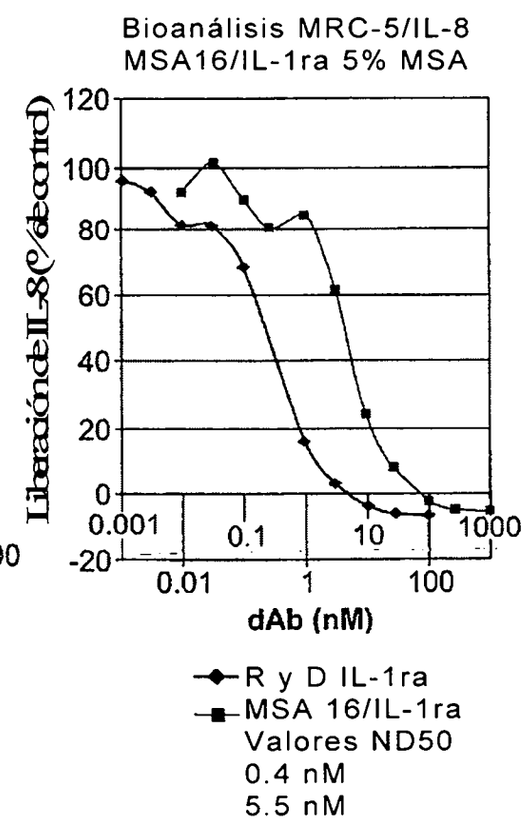


Fig. 4C

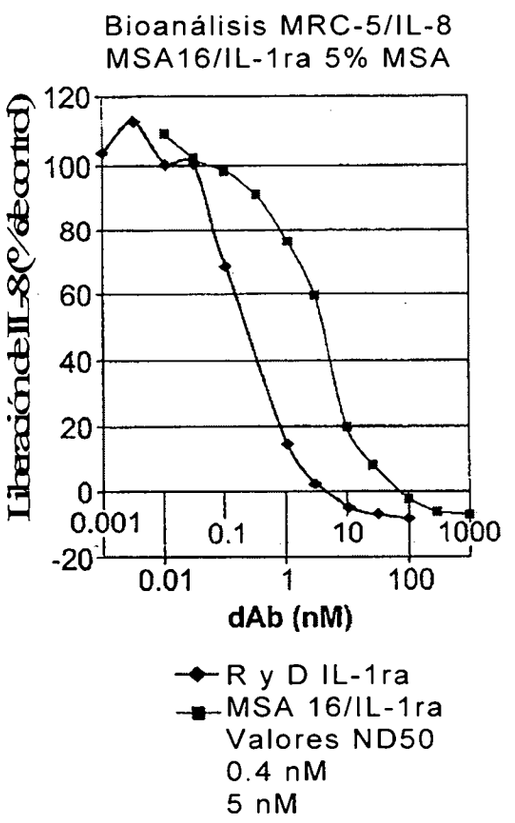


Fig. 5

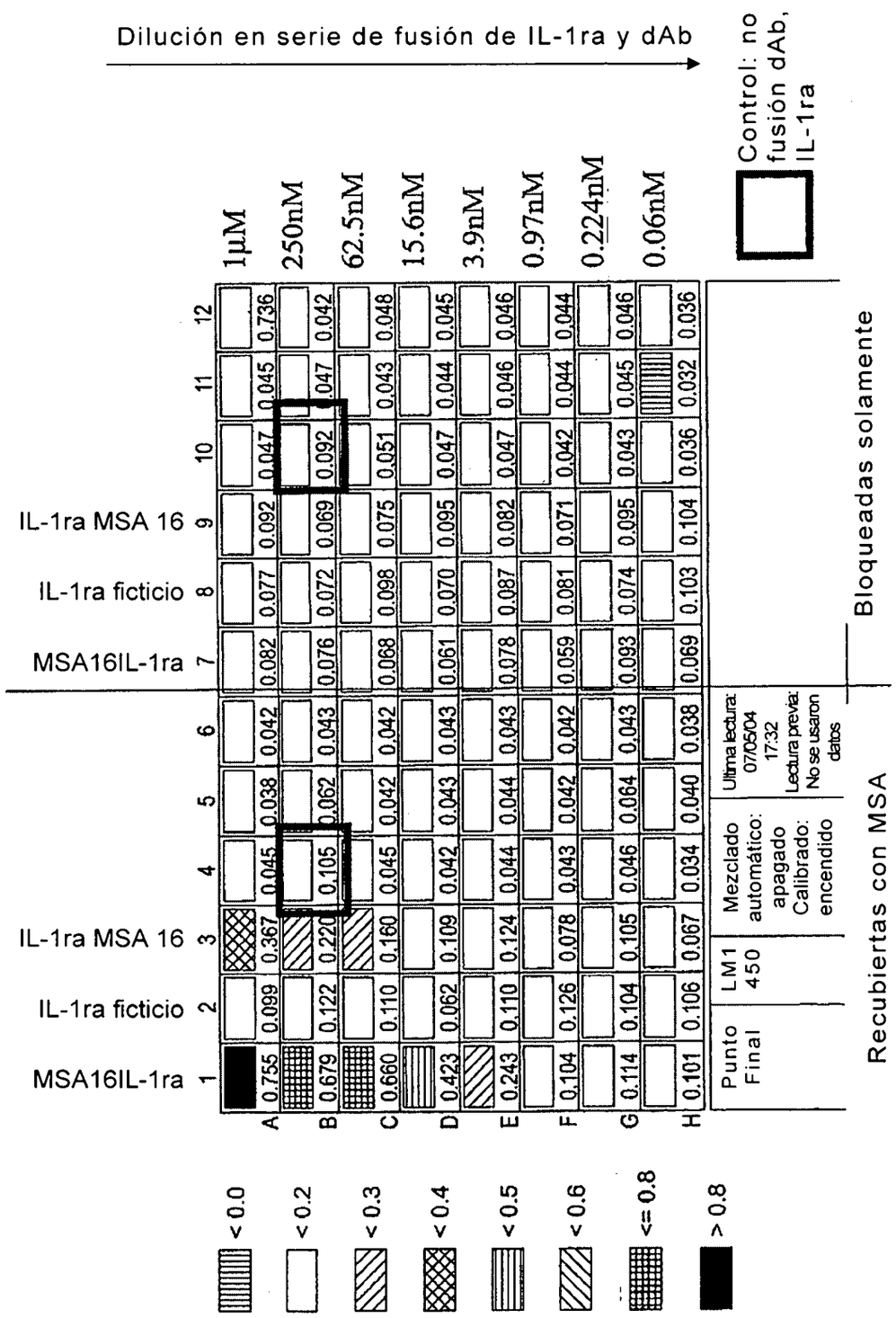

Dilución en serie de fusión de IL-1ra y dAb
1µM
250nM
62.5nM
15.6nM
3.9nM
0.97nM
0.224nM
0.06nM
Control: no fusión dAb, IL-1ra
IL-1ra MSA 16
IL-1ra ficticio
MSA16IL-1ra
Bloqueadas solamente
Recubiertas con MSA
Punto Final
LM1 450
Mezclado automático: apagado
Calibrado: encendido
Ultima lectura: 07/05/04 17:32
Lectura previa: No se usaron datos
< 0.0
< 0.2
< 0.3
< 0.4
< 0.5
< 0.6
<= 0.8
> 0.8

Fig. 6A

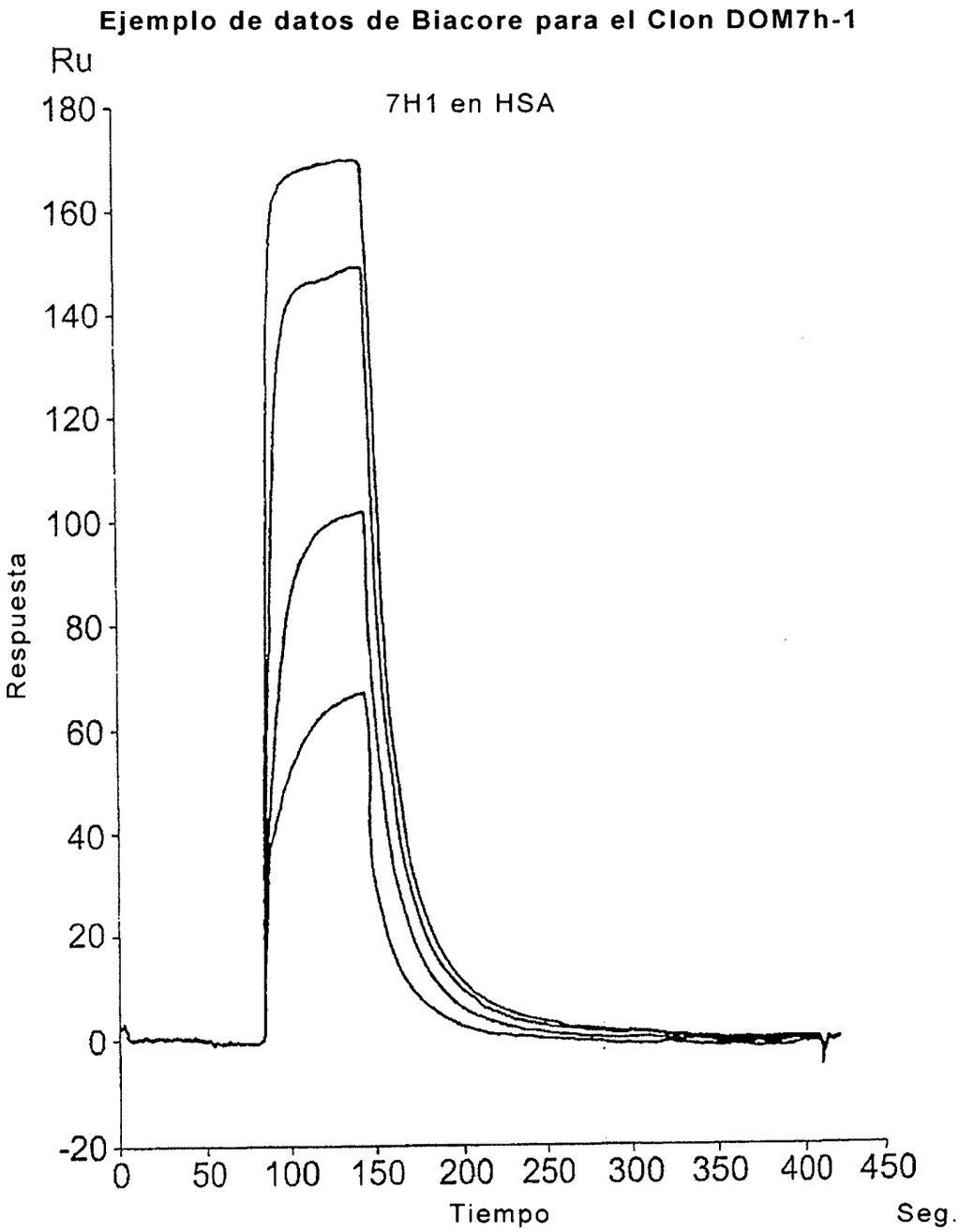

Ejemplo de datos de Biacore para el Clon DOM7h-1
Ru
7H1 en HSA
180
160
140
120
100
80
60
40
20
0
-20
Respuesta
0
50
100
150
200
250
300
350
400
450
Tiempo
Seg.

Fig. 6A (cont.)

Informe

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc. Del analito
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-3	5.63e4	0.0539	12.7	160	2000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-4	1.49e5	0.0523	39.3	117	1000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-5	1.12e5	0.0481l	80.1	58	500n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-6	5.01e4	0.0486	136	40.6	250n

	Ka (1/M)	Kd (M)	Req (RU)	Kobs (1/s)	Chi2
					0.12
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-3	1.05e6	9.57e-7	8.59	0.167	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-4	2.85e6	3.51e-7	29.1	0.201	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-5	2.33e6	4.29e-7	43.1	0.104	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-6	1.03e6	9.7e-7	2.8	0.0611	

Parámetros

	ka	T (ka)	Rmax	T(Rmax)	Conc	t0	kd
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-3	5.63E+04	10.7	12.7	28.9	2000n	91.5	0.0539
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-4	1.49E+05	40.3	39.3	114	1000n	91.5	0.0523
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-5	1.12E+05	35.1	80.1	68.1	500n	91.5	0.0481
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-6	5.01E+04	5.32	136	6.21	250n	91.5	0.0486

	RI	T(RI)
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-3	160	632
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-4	117	442
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-5	58	257
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-6	40.6	198

Fig. 6B

Ejemplo de datos de Biacore para el Clon DOM7h-7

7H1 en HSA

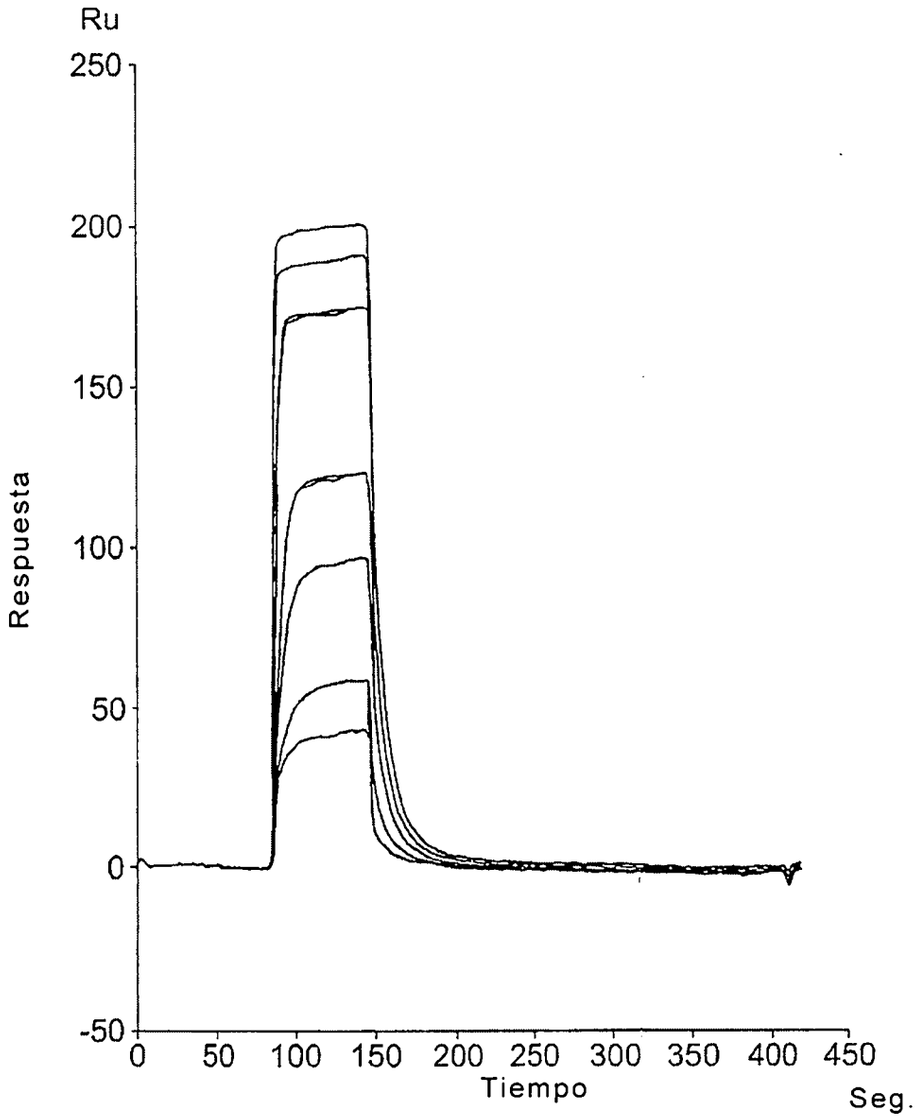


Fig. 6B (cont)

Informe

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc del analito
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-41	11	0.107	6.32e3	196	5000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-42	2.35e3	0.106	60.9	185	3000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-43	2.51e5	0.108	39	140	2000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-44	6.23e5	0.105	46.2	132	1000n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-45	3.02e5	0.103	106	57.8	500n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-46	2.83e5	0.0998	122	44	250n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-47	1.43e5	0.0946	181	29	125n
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-48	5.01e5	0.1	62.8	26	62.5n

	Ka (1/M)	KD (M)	Req (RU)	Kobs (1/s)	Chi2
					0.542
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-41	103	9.71e-3	3.25	0.107	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-42	2.21e4	4.51e-5	3.79	0.113	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-43	2.33e6	4.3e-7	32.1	0.61	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-44	5.93e6	1.69e-7	39.6	0.728	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-45	2.93e6	3.41e-7	63	0.254	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-46	2.83e6	3.53e-7	50.7	0.171	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-47	1.51e6	6.62e-7	28.8	0.112	
12.05.04 tasa de desactivación, tasa de activación Fc=2-48	5.01e6	2e-7	15	0.131	

Fig. 6C

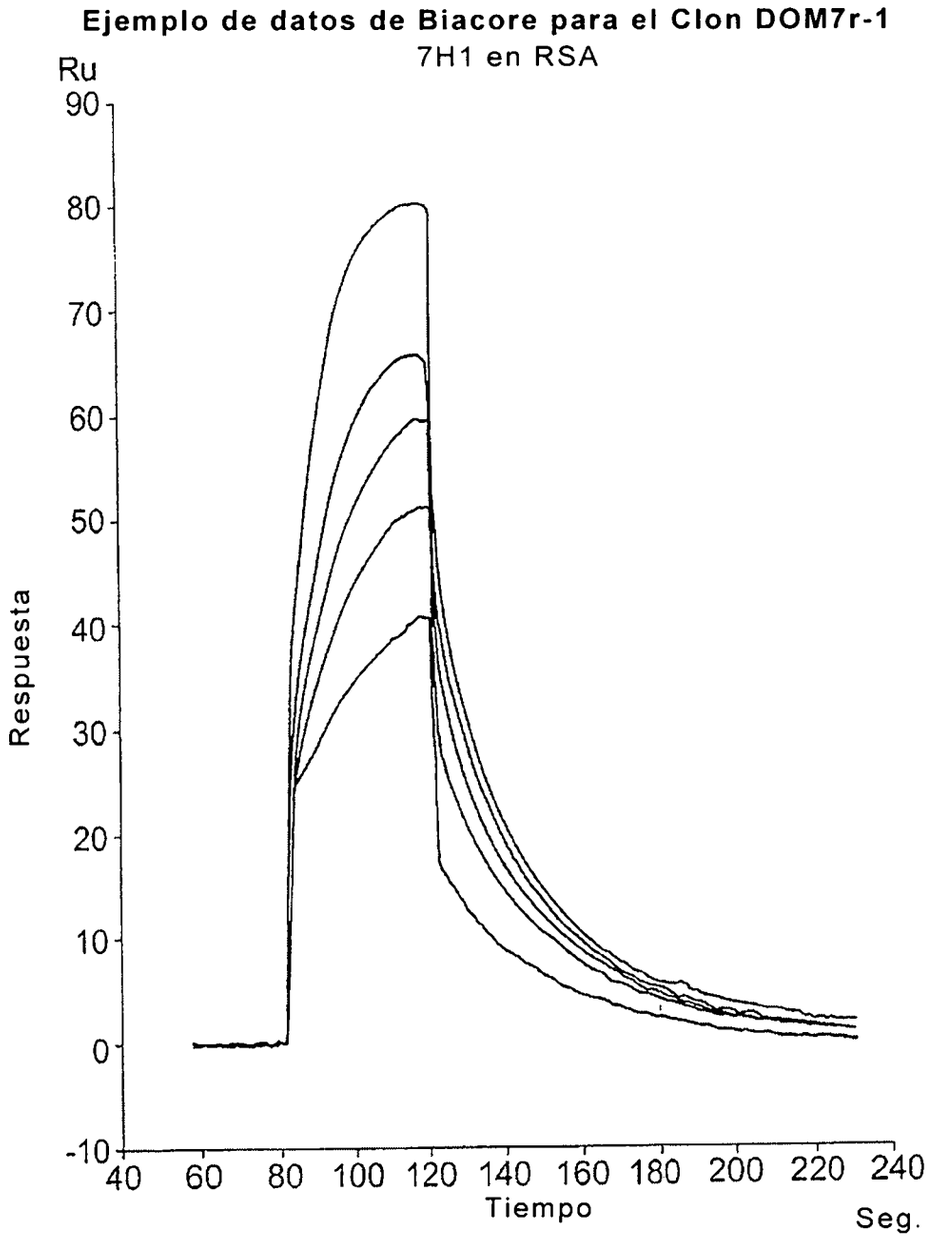

Ejemplo de datos de Biacore para el Clon DOM7r-1
7H1 en RSA
Ru
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
-10
Respuesta
40
60
80
100
120
140
160
180
200
220
240
Tiempo
Seg.

Fig. 6C (cont.)

Informe

	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	Rmax (RU)	RI (RU)	Conc. del analito
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -1	3.23e6	0.0345	40.8	53	25n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -2	2.89e6	0.0344	45.1	39.9	20n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -3	2.52e6	0.0331	52.8	34.8	15n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -4	2.87e6	0.0316	53.5	30.5	10n
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -5	1.93e6	0.0316	79.8	27.1	5n

	Ka (1/M)	Kd (M)	Req (RU)	Kobs (1/s)	Chi2
					0.0252
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -1	9.35e7	1.07e-8	28.5	0.115	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -2	8.41e7	1.19e-8	28.3	0.0923	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -3	7.62e7	1.31e-8	28.2	0.071	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -4	9.07e7	1.1e-8	25.5	0.0603	
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -5	6.12e7	1.63e-8	18.7	0.0413	

Parámetros

	ka	T (ka)	Rmax	T(Rmax)	Conc	t0	kd
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -1	3.23E+06	58.2	40.8	138	25n	87.5	0.0345
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -2	2.89E+06	42.9	45.1	82.9	20n	87.5	0.0344
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -3	2.52E+06	27.6	52.8	43	15n	87.5	0.0331
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -4	2.87E+06	18.3	53.5	25.6	10n	87.5	0.0316
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -5	1.93E+06	3.91	79.8	4.38	5n	87.5	0.0316

	RI	T(RI)
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -1	53	488
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -2	39.9	373
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -3	34.8	348
7r1, 7r3, 7r8, 7r13, 7 Fc3 -4	30.5	312

Fig. 6C (cont.)

Afinidades de dAb anti-SA

dAB	Armazón proteínico	Afinidad (KD)		
		Albúmina de suero de ratón	Albúmina de suero de rata	Albúmina de suero de humana
DOM7h-1	Vk	+	+	800nM
DOM7h-2	Vk	+	+	70nM
DOM7h-7	Vk	+	+	400nM
DOM7r-3	Vk	+	12nM	-
DOM7h-8	Vk	200nM	120nM	70nM
DOM7r-16	Vk	1µM	1µM	-
DOM7m-16	Vk	50nM	ND	+
DOM7m-26	Vk	60nM	ND	+
DOM7r-1	Vk	-	15nM	-
DOM7r-8	Vk	40nM	20nM	-
DOM7r-13	Vk	-	80NM	-
DOM7r-14	Vk	-	50nM	-
DOM7r-27	Vh	250nM	250nM	-
DOM7r-31	Vh	1µM	5µM	+ (estimado de 10µM)
DOM7h-22	Vh	-	-	60nM
DOM7h-23	Vh	-	-	900nM
DOM7h-26	Vh	-	-	300nM

- Sin enlace detectable
+ Enlace detectable pero débil (KD estimada > 5µ)
ND No determinada

Fig. 8A

```
   1 atttctttat aaaccacaac tctgggcccg caatggcagt ccactgcctt gctgcagtca
  61 cagaatggaa atctgcagag gcctccgcag tcacctaatc actctcctcc tcttcctgtt
 121 ccattcagag acgatctgcc gaccctctgg gagaaaatcc agcaagatgc aagccttcag
 181 aatctgggat gttaaccaga agaccttcta tctgaggaac aaccaactag ttgctggata
 241 cttgcaagga ccaaatgtca atttagaaga aaagatagat gtggtaccca ttgagcctca
 301 tgctctgttc ttgggaatcc atggagggaa gatgtgcctg tcctgtgtca agtctggtga
 361 tgagaccaga ctccagctgg aggcagttaa catcactgac ctgagcgaga acagaaagca
 421 ggacaagcgc ttcgccttca tccgctcaga cagcggcccc accaccagtt ttgagtctgc
 481 cgcctgcccc ggttggttcc tctgcacagc gatggaagct gaccagcccg tcagcctcac
 541 caatatgcct gacgaaggcg tcatggtcac caaattctac ttccaggagg acgagtagta
 601 ctgcccaggc ctgcctgttc ccattcttgc atggcaagga ctgcagggac tgccagtccc
 661 cctgccccag ggctcccggc tatgggggca ctgaggacca gccattgagg ggtggaccct
 721 cagaaggcgt cacaagaacc tggtcacagg actctgcctc ctcttcaact gaccagcctc
 781 catgctgcct ccagaatggt ctttctaatg tgtgaatcag agcacagcag cccctgcaca
 841 aagcccttcc atgtcgcctc tgcattcagg atcaaacccc gaccacctgc ccaacctgct
 901 ctcctcttgc cactgcctct tcctccctca ttccaccttc ccatgccctg gatccatcag
 961 gccacttgat gaccccaac caagtggctc ccacaccctg ttttacaaaa aagaaaagac
1021 cagtccatga gggaggtttt taagggtttg tggaaaatga aaattaggat ttcatgattt
1081 tttttttca gtccccgtga aggagagccc ttcatttgga gattatgttc tttcggggag
1141 aggctgagga cttaaaatat tcctgcattt gtgaaatgat ggtgaaagta agtggtagct
1201 tttcccttct ttttcttctt tttttgtgat gtcccaactt gtaaaaatta aaagttatgg
1261 tactatgtta gccccataat tttttttttc cttttaaaac acttccataa tctggactcc
1321 tctgtccagg cactgctgcc cagcctccaa gctccatctc cactccagat tttttacagc
1381 tgcctgcagt actttacctc ctatcagaag tttctcagct cccaaggctc tgagcaaatg
1441 tggctcctgg gggttctttc ttcctctgct gaaggaataa attgctcctt gacattgtag
1501 agcttctggc acttggagac ttgtatgaaa gatggctgtg cctctgcctg tctccccac
1561 cgggctggga gctctgcaga gcaggaaaca tgactcgtat atgtctcagg tccctgcagg
1621 gccaagcacc tagcctcgct cttggcaggt actcagcgaa tgaatgctgt atatgttggg
1681 tgcaaagttc cctacttcct gtgacttcag ctctgtttta caataaaatc ttgaaaatgc
1741 ctaaaaaaaa aaaaaaaaaa
```

Fig. 8B

MEICRGLRSH LITLLLFLFH SETICRPSGR KSSKMQAFRI WDVNQKTFYL
RNNQLVAGYL QGPNVNLEEK IDVVPIEPHA LFLGIHGGKM CLSCVKSGDE
TRLQLEAVNI TDLSENRKQD KRFAFIRSDS GPTTSFESAA CPGWFLCTAM
EADQPVSLTN MPDEGVMVTK FYFQEDE

Fig. 9

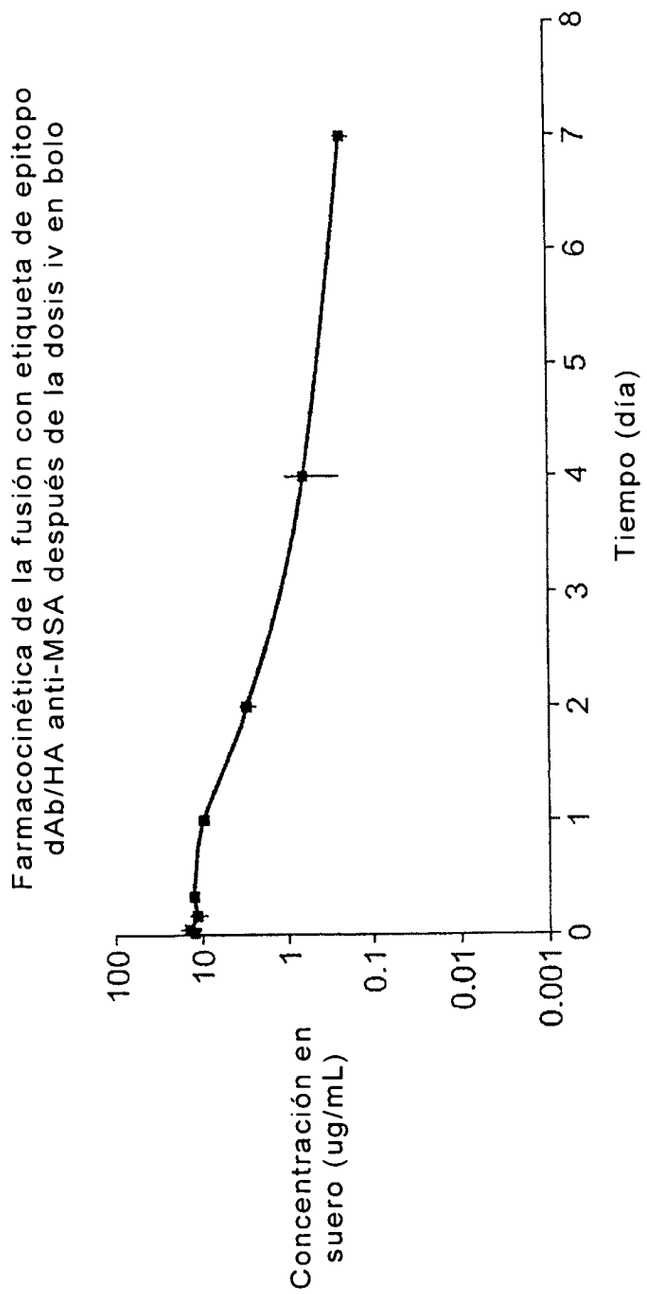

Farmacocinética de la fusión con etiqueta de epitopo
dAb/HA anti-MSA después de la dosis iv en bolo
Concentración en suero (ug/mL)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0
1
2
3
4
5
6
7
8
Tiempo (día)

Fig. 10

Numeración kabat	5	10	15	20	25	30	35
DOM7r-15	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q S I G R R L K W						
DOM7r-16	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I Y K N L R W						
DOM7r-17	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q K I Y N N L R W						
DOM7r-18	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I Y K S L G W						
DOM7r-19	D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C R A S Q W I Y R H L R W						

Numeración kabat	40	45	50	55	60	65	70
DOM7r-15	Y Q Q K P G A A P R L L I Y R T S W L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-16	Y Q Q K P G K A P K L L I Y N S S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-17	Y Q Q K P G K A P K L L I Y N T S I L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-18	Y Q Q K P G K A P K L L I Y Q S S L L Q S G V P S R F S G S G S G T D						
DOM7r-19	Y Q Q K P G K A P K L L I Y D A S R L Q S G V P T R F S G S G S G T D						

Numeración kabat	75	80	85	90	95	100	105
DOM7r-15	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T S Q W P H T F G Q G T K V E						
DOM7r-16	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R Y L S P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-17	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q R W R A P Y T F G Q G T K V E						
DOM7r-18	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q Y H Q M P R T F G Q G T K V E						
DOM7r-19	F T L T I S S L Q P E D F A T Y Y C Q Q T H N P P K T F G Q G T K V E						

Numeración kabat	
DOM7r-15	I K R
DOM7r-16	I K R
DOM7r-17	I K R
DOM7r-18	I K R
DOM7r-19	I K R

Fig. 11A

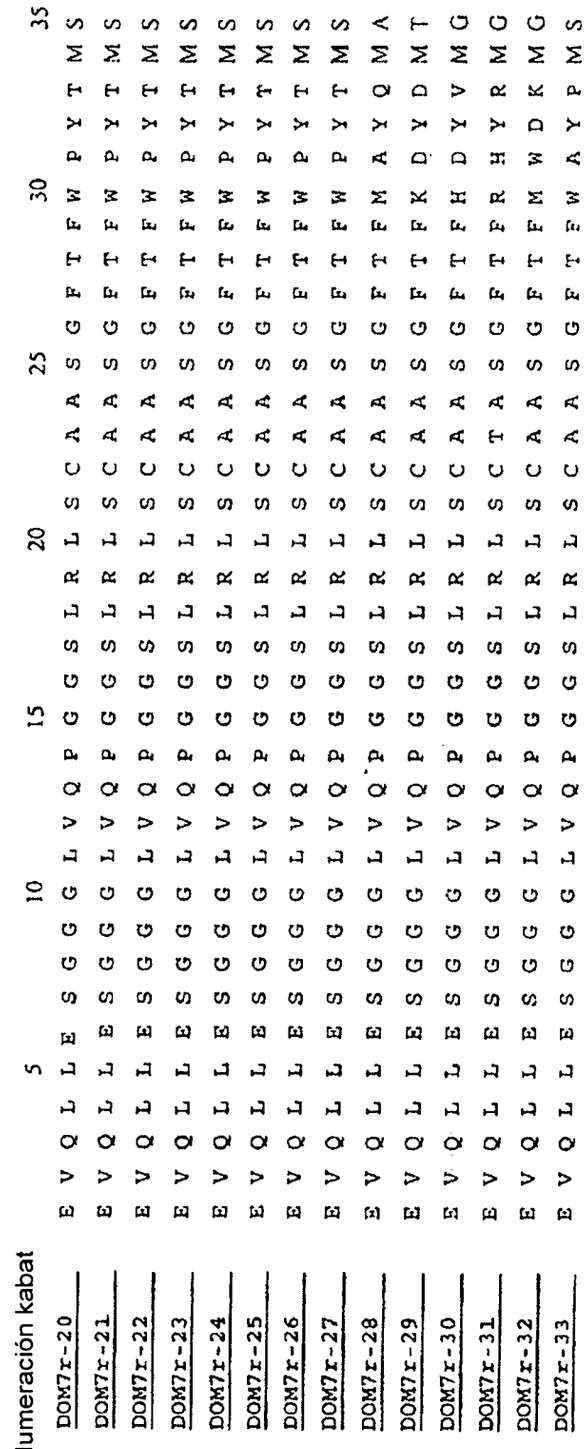

Numeración kabat
5
10
15
20
25
30
35
DOM7r-20 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-21 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-22 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-23 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-24 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-25 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-26 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-27 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W P Y T M S
DOM7r-28 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F M A Y Q M A
DOM7r-29 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F K D Y D M T
DOM7r-30 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F H D Y V M G
DOM7r-31 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C T A S G F T F R H Y R M G
DOM7r-32 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F M W D K M G
DOM7r-33 E V Q L L E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S G F T F W A Y P M S

Fig. 11A (cont.)

Numeración kabat	40	45	50	54	59	64	69
DOM7r-20	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-21	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-22	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-23	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-24	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-25	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-26	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-27	W V R Q A P G K G L E W V S T I S P F G S T T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-28	W V R Q A P G K G L E W V S T I H Q T G F S T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-29	W V R Q A P G K G L E W V S M I S S S G L W T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-30	W A R Q A P G K G L E W V S L I K P N G S P T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-31	W V R Q A P G K G L E W V S W I R P D G T F T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-32	W V R Q A P G K G L E W V S F I G R E G Y G T Y Y A D S V K G R F T I						
DOM7r-33	W V R Q A P G K G L E W V S S I S S W G T G T Y Y A D S V K G R F T I						

Fig. 11A (cont.)

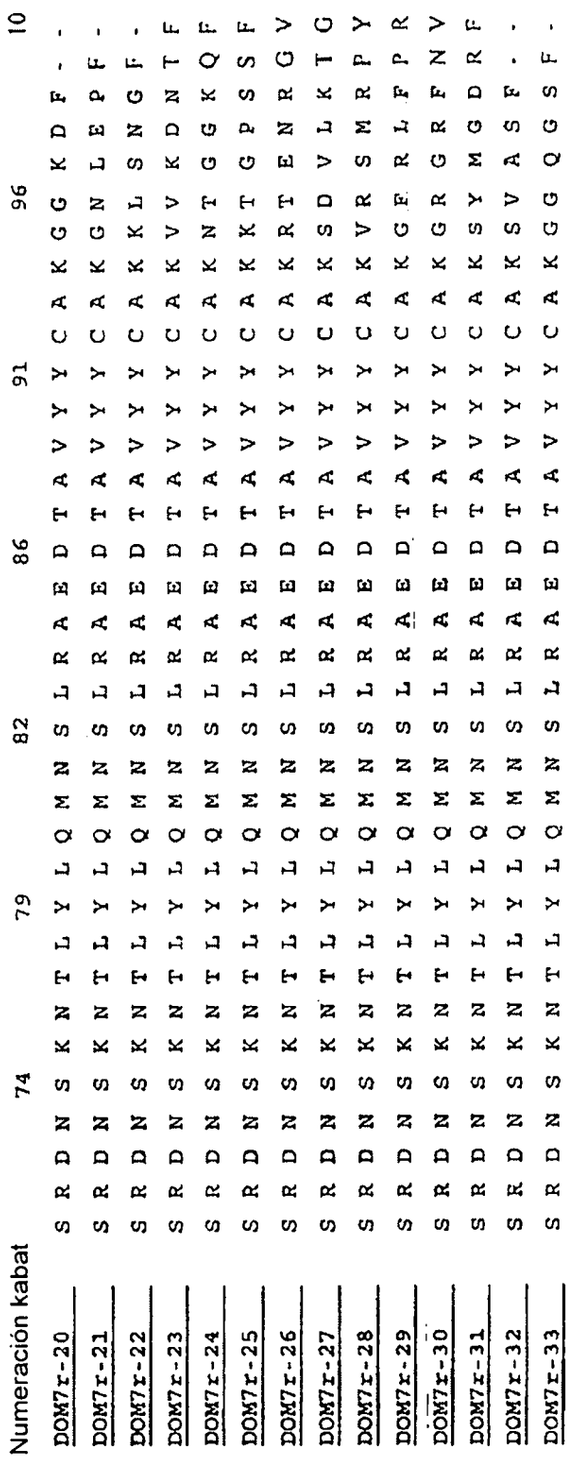

Numeración kabat
74
79
82
86
91
96
10
DOM7r-20 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G G K D F - -
DOM7r-21 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G N L E P F -
DOM7r-22 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K K L S N G F -
DOM7r-23 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V V K D N T F
DOM7r-24 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K N T G G K Q F
DOM7r-25 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K K T G P S S F
DOM7r-26 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K R T E N R G V
DOM7r-27 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S D V L K T G
DOM7r-28 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K V R S M R P Y
DOM7r-29 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G F R L F P R
DOM7r-30 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G R G R F N V
DOM7r-31 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S Y M G D R F
DOM7r-32 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K S V A S F - -
DOM7r-33 S R D N S K N T L Y L Q M N S L R A E D T A V Y Y C A K G G Q G S F -

Fig. 11B

Numeración kabat					10						10				11		
DOM7r-20	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-21	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-22	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-23	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-24	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-25	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-26	S	F	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-27	L	D	G	F	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-28	K	F	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-29	T	F	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-30	L	Q	F	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-31	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-32	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S
DOM7r-33	-	-	-	-	D	Y	W	G	Q	G	T	L	V	T	V	S	S

Fig. 12

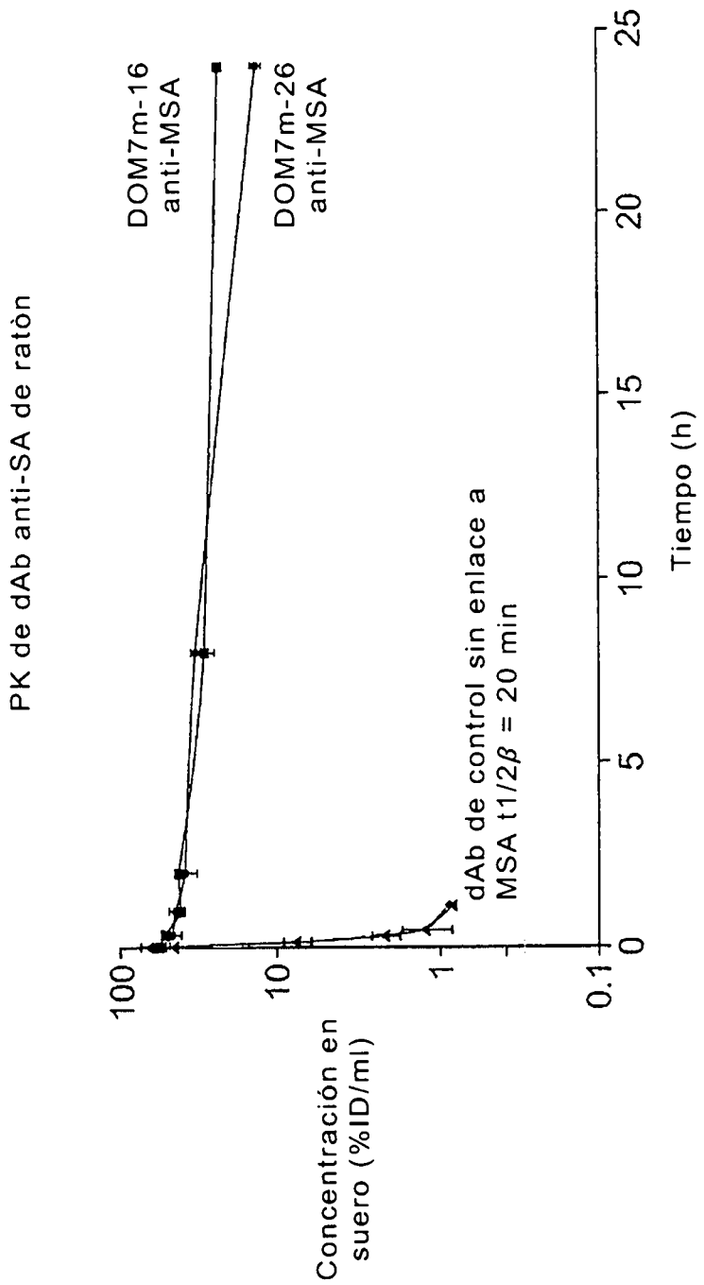

PK de dAb anti-SA de ratòn
DOM7m-16 anti-MSA
DOM7m-26 anti-MSA
dAb de control sin enlace a MSA t1/2β = 20 min
Concentración en suero (%ID/ml)
100
10
1
0.1
0
5
10
15
20
25
Tiempo (h)

Fig. 13

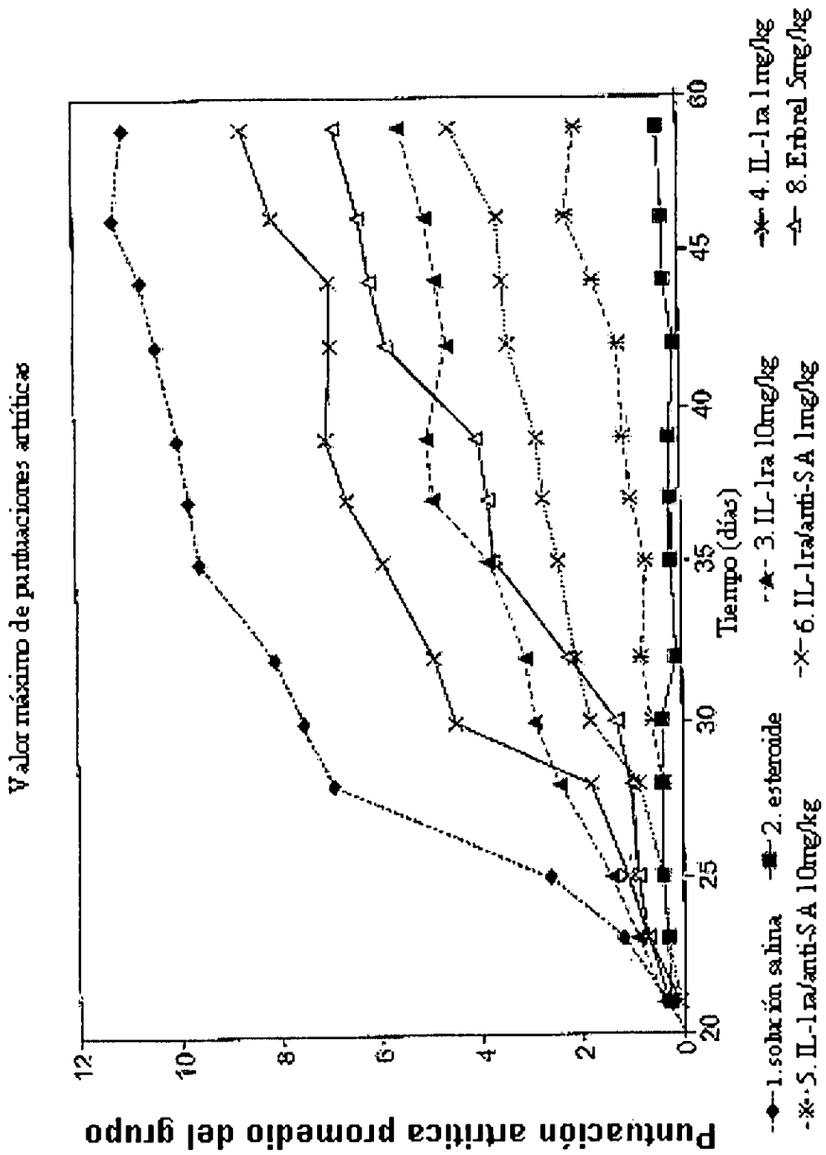

Valor máximo de puntuaciones artríticas
Puntuación artrítica promedio del grupo
Tiempo (días)
0
2
4
6
8
10
12
20
25
30
35
40
45
60
1. solución salina
2. esteroide
3. IL-1ra 10mg/kg
4. IL-1ra 1mg/kg
5. IL-1ra/anti-SA 10mg/kg
6. IL-1ra/anti-SA 1mg/kg
8. Enbrel 5mg/kg

Fig. 14A

1 MKIYVVATIA WILLQFSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG

61 TDIAVIGPPS KDKFLRINFQ SSRGTVSLGL KRDNLYVVAY LAMDNTNVNR AYYFKSEITS

121 AELTALFPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQGDKSR KELGLGIDLL LTFMEAVNKK

181 ARVVKNEARF LLIAIQMTAE VARFRYIQNL VTKNFPNKFD SDNKVIQFEV SWRKISTAIY

241 GDAKNGVFNK DYDFGFGKVR QVKDLQMGLL MYLGKPKSSN EANSTAYATT VL

Fig. 14B

1 DPNLKYGGTD IAVIGPPSRD KFLRLNFQSS RGTVSLGLKR ENLYVVAYLA MDNANVNRAY

61 YFGTEITSAE LTTLLPEATV ANQKALEYTE DYQSIEKNAK ITEGDKTRKE LGLGINLLST

121 LMDAVNKKAR VVKNEARFLL IAIQMTAEAA RFRYIQNLVT KNFPNKFNSE DKVIQFQVNW

181 SKISKAIYGD AKNGVFNKDY DFGFGKVRQV KDLQMGLLMY LGTTPNNAAD RYRAEL

Fig. 14C

```
  1 MKIYVVATIA WILLQFSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG

 61 TDIAVIGPPS KGKFLRINFQ SSRGTVSLGL KRDNLYVVAY LAMDNTNVNR AYYFRSEITS

121 AELTALFPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQED
```

Fig. 14D

```
  1 VTSITLDLVN PTAGQYSSFV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSKEKF LRINFQSSRG

 61 TVSLGLKRDN LYVVAYLAMD NTNVNRAYYF RSEITSAELT ALFPEATTAN QKALEYTEDY

121 QSIEKNAQIT QGDKSRKELG LGIDLLLTSM EAVNKKARVV KNEARFLLIA IQMTAEVARF

181 RYIQNLVTKN FPNKFDSDNK VIQFEVSWRK ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GFGKVRQVKD

241 LQMGLLMYLG KPK
```

Fig. 14E

1 MKIYVVATIA WILLQFSAWT TTDAVTSITL DLVNPTAGQY SSFVDKIRNN VKDPNLKYGG

61 TDIAVIGPPS KEKFLRINFQ SSRGTVSLGL KRDNLYVVAY LAMDNTNVNR AYYFRSEITS

121 AESTALFPEA TTANQKALEY TEDYQSIEKN AQITQGDQSR KELGLGIDLL STSMEAVNKK

181 ARVVKDEARF LLIAIQMTAE AARFRYIQNL VIKNFPNKFN SENKVIQFEV NWKKISTAIY

241 GDAKNGVFNK DYDFGFGKVR QVKDLQMGLL MYLGKPKSSN EANSTVRHYG PLKPTLLIT

Fig. 14F

1 VTSITLDLVN PTAGQYSSFV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSKEKF LRINFQSSRG

61 TVSLGLKRDN LYVVAYLAMD NTNVNRAYYF RSEITSAELT ALFPEATTAN QKALEYTEDY

121 QSIEKNAQIT QGDKSRKELG LGIDLLLTSM EAVNKKARVV KNEARFLLIA IQMTAEAARF

181 RYIQNLVIKN FPNKFNSENK VIQFEVNWKK ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GFGKVRQVKD

241 LQMGLLMYLG KPK

Fig. 14G

VTSITLDLVN PTAGQYSSFV DKIRNNVKDP NLKYGGTDIA VIGPPSK(E/D)KF LRINFQSSRG

TVSLGLKRDN LYVVAYLAMD NTNVNRAYYF (R/K)SEITSAE(S/L)T ALFPEATTAN

QKALEYTEDY QSIEKNAQIT QGD(Q/K)SRKELG LGIDLL(S/L)T(S/F)M EAVNKKARVV

K(D/N)EARFLLIA IQMTAE(A/V)ARF RYIQNLV(I/T)KN FPNKF(N/D)S(E/D)NK

VIQFEV(N/S)W(K/R)K ISTAIYGDAK NGVFNKDYDF GFGKVRQVKD LQMGLLMYLG

KPKSSNEANS TVRHYGPLKP TLLIT

Fig. 15

	Secuencia
	Anti-albúmina de suero de ratón
A	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLSCEASGFTFSRFGMTWVRQAPGKGVEWV SGISSLGDSTLYADSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLNPGGQGTQVTVSS
B	QVQLQESGGGLVQPGNSLRLSCAASGFTFRNFGMSWVRQAPGKEPEWV SSISGSGSNTIYADSVKDRFTISRDNAKSTLYLQMNSLKPEDTAVYYC TIGGSLSRSSQGTQVTVSS
C	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISSDSGTKNYADSVKGRFTISRDNAKKMLFLQMNSLRPEDTAVYYC VIGRGSPSSQGTQVTVSS
D	QVQLQESGGGLVQPGGSLRLTCTASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGLEWV SAISADGSDKRYADSVKGRFTISRDNGKKMLTLDMNSLKPEDTAVYYC VIGRGSPASQGTQVTVSS
E	AVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCVVSGTTFSSAAMGWFRQAPGKEREFV GAIKWSGTSTYYTDSVKGRFTISRDNVKNTVYLQMNNLKPEDTGVYTC AADRDRYRDRMGPMTTTDFRFWGQGTQVTVSS
F	QVKLEESGGGLVQTGGSLRLSCAASGRTFSSFAMGWFRQAPGREREFV ASIGSSGITTNYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTGLCYC AVNRYGIPYRSGTQYQNWGQGTQVTVSS
G	EVQLEESGGGLVQPGGSLRLSCAASGLTFNDYAMGWYRQAPGKERDMV ATISIGGRTYYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAIYYCV AHRQTVVRGPYLLWGQGTQVTVSS
H	QVQLVESGGKLVQAGGSLRLSCAASGRTFSNYAMGWFRQAPGKEREFV AGSGRSNSYNYYSDSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AASTNLWPRDRNLYAYWGQGTQVTVSS
I	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYRMGWFRQVPGKEREFV AAISWSGGTTRYLDSVKGRFTISRDSTKNAVYLQMNSLKPEDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
J	QVQLVEFGGGLVQAGDSLRLSCAASGRSLGIYKMAWFRQVPGKEREFV AAISWSGGTTRYIDSVKGRFTLSRDNTKNMVYLQMNSLKPDDTAVYYC AVDSSGRLYWTLSTSYDYWGQGTQVTVSS
K	EVQLVESGGGLVQAGGSLSLSCAASGRTFSPYTMGWFRQAPGKEREFL AGVTWSGSSTFYGDSVKGRFTASRDSAKNTVTLEMNSLNPEDTAVYYC AAAYGGGLYRDPRSYDYWGRGTQVTVSS
L	AVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTLDAWPIAWFRQAPGKEREGV SCIRDGTTYYADSVKGRFTISSDNANNTVYLQTNSLKPEDTAVYYCAA PSGPATGSSHTFGIYWNLRDDYDNWGQGTQVTVSS
M	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGFTFDHYTIGWFRQVPGKEREGV SCISSSDGSTYYADSVKGRFTISSDNAKNTVYLQMNTLEPDDTAVYYC AAGGLLLRVEELQASDYDYWGQGIQVTVSS
N	AVQLVDSGGGLVQPGGSLRLSCTASGFTLDYYAIGWFRQAPGKEREGV ACISNSDGSTYYGDSVKGRFTISRDNAKTTVYLQMNSLKPEDTAVYYC ATADRHYSASHHPFADFAFNSWGQGTQVTVSS
O	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAAYGLTFWRAAMAWFRRAPGKERELV VARNWGDGSTRYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSLKPEDTAVYYC AAVRTYGSATYDIWGQGTQVTVSS
P	EVQLVESGGGLVQDGGSLRLSCIFSGRTFANYAMGWFRQAPGKEREFV AAINRNGGTTNYADALKGRFTISRDNTKNTAFLQMNSLKPDDTAVYYC AAREWPFSTIPSGWRYWGQGTQVTVSS
Q	DVQLVESGGGWVQPGGSLRLSCAASGPTASSHAIGWFRQAPGKEREFV VGINRGGVTRDYADSVKGRFAVSRDNVKNTVYLQMNRLKPEDSAIYIC AARPRYSFTAMSKGDMDYWGKGTLVTVSS

Fig. 16A

[Pro^{9}] GLP-1(7-37) DOM7h8 con conductor GAS (sin enlazante)

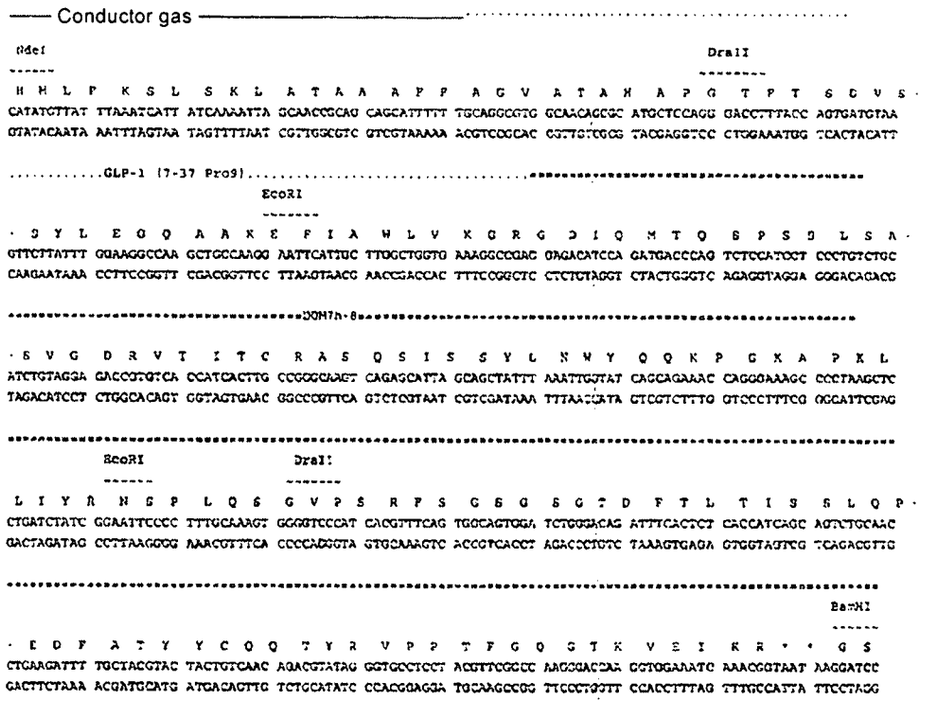


Fig. 16B

[Pro^{9}] GLP-1-PSS-iDOM7h-8 con conductor GAS (enlazante PSS)

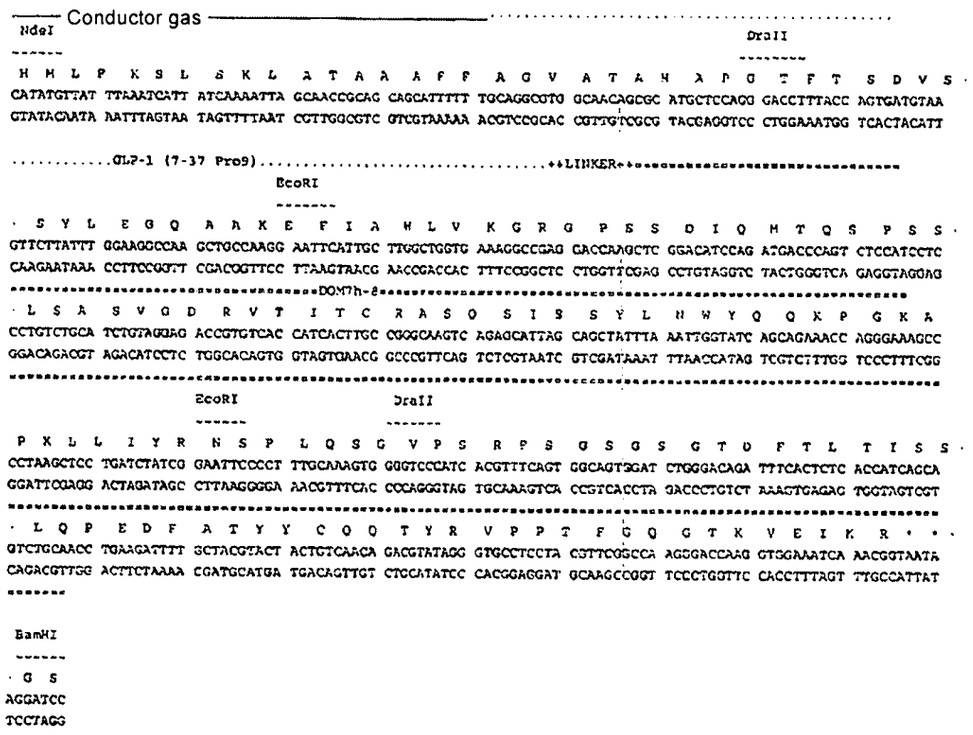


Fig. 16C

[Pro^{9}] GLP-1-PSSGAP-iDOM7h-8 con conductor GAS (enlazante PSSGAP)

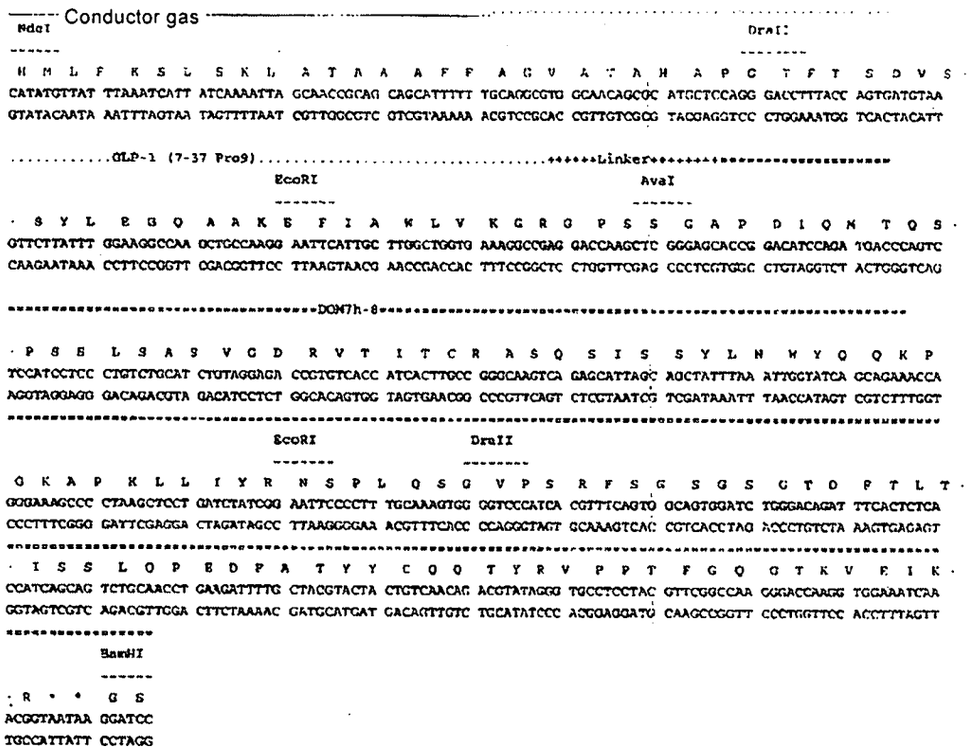


Fig. 17

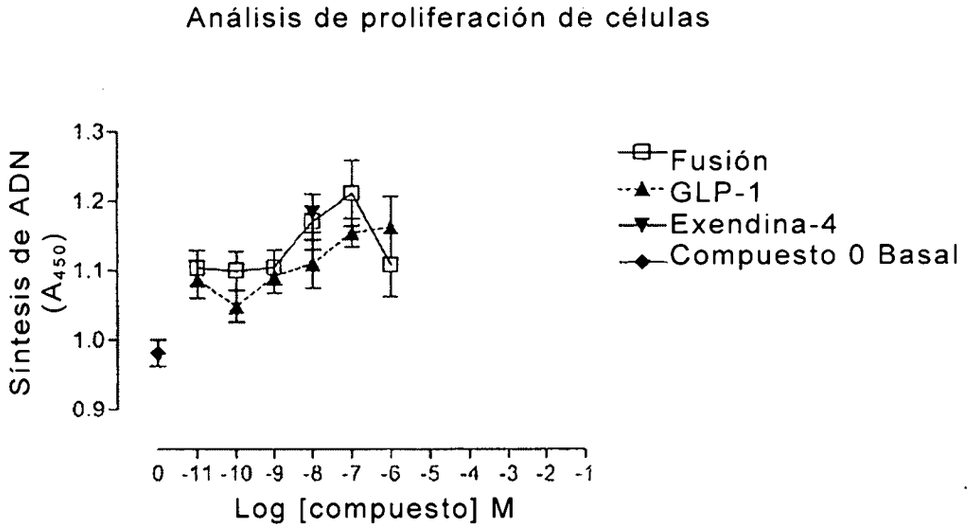

Análisis de proliferación de células
Síntesis de ADN (A_{450})
1.3
1.2
1.1
1.0
0.9
0 -11 -10 -9 -8 -7 -6 -5 -4 -3 -2 -1
Log [compuesto] M
Fusión
GLP-1
Exendina-4
Compuesto 0 Basal

Fig. 18

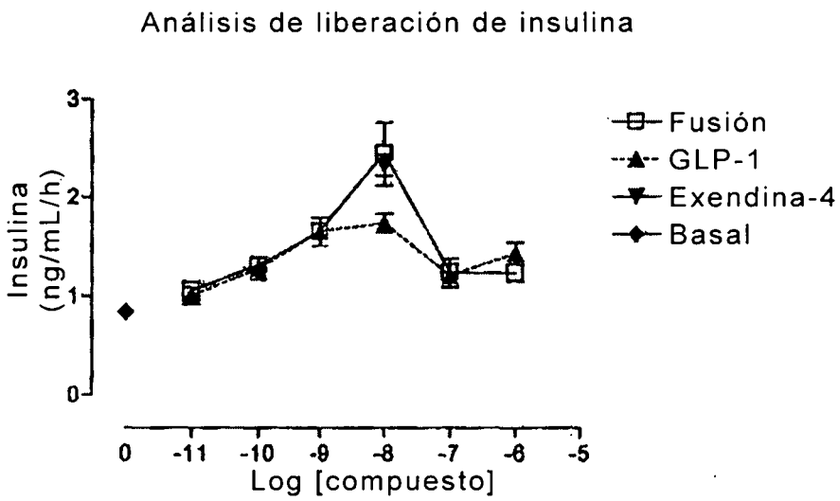

Análisis de liberación de insulina
Insulina (ng/mL/h)
3
2
1
0
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
-5
Log [compuesto]
Fusión
GLP-1
Exendina-4
Basal

Fig. 19

(a) fusión de DOM7h-8 PYY3-36

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRNSPLQS
GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQTYRVPPTFGQGTKVEIKRIKPEA
PGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRY

(b) fusión de PYY DOM7h-8

IKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNLVTRQRYDIQMTQSPSSLSASVGDRVTIT
CRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRNSPLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYCQQTYRVPPTFGQGTKVEIKR

(c) fusión de GPL-1 7-37DOM7h-8 PYY3-36

HAPGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVKGRGDIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCR
ASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYRNSPLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPE
DFATYYCQQTYRVPPTFGQGTKVEIKRIKPEAPGEDASPEELNRYYASLRHYLNL
VTRQRY

LISTA DE SECUENCIAS

GLP-1 (7-37)

Aminoácido:

HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGRG - SEQ ID NO:157

secuencia de nucleótidos

ca tgctgaaggg acctttacca gtgatgtaag ttcttatttg gaaggccaag ctgccaagga attcattgct tggctggtga aaggccgagg a SEQ ID NO:158

GLP-1 (7-36)

HAE GTFTSDVSSY LEGQAAKEFI AWLVKGR SEQ ID NO:159

ca tgctgaaggg acctttacca gtgatgtaag ttcttatttg gaaggccaag ctgccaagga attcattgct tggctggtga aaggccga - SEQ ID NO:160

Exedina-4

HGE GTFTSDLSKQ MEEEAVRLFI EWLKNGGPSS GAPPPS - SEQ ID NO:161

catggt gaaggaacat ttaccagtga cttgtcaaaa cagatggaag aggaggcagt gcggttattt attgagtggc ttaagaacgg aggaccaagt agcggggcac ctccgccatc g - SEQ ID NO:162

Oxintomodulina

HSQGTFTS DYSKYLDSRR AQDFVQWLMN TKRNRNNIA - SEQ ID NO:163

cattcac agggcacatt caccagtgac tacagcaagt atctggactc caggcgtgcc caagattttg tgcagtggtt gatgaatacc aagaggaaca ggaataacat tgcc - SEQ ID NO:164

Exedina-3

HSDGTFTSDL SKQMEEEAVR LFIEWLKNGG PSSGAPPPS - SEQ ID NO:165

catagtga tggaacattt accagtgact tgtcaaaaca gatggaagag gaggcagtgc ggttatttat tgagtggctt aagaacggag gaccaagtag cggggcacct ccgccatcg - SEQ ID NO:166

PYY (3-36)

IKPEAPGEDA SPEELNRYYA SLRHYLNLVT RQRY - SEQ ID NO:167

Atcaaacccg aggctcccgg cgaagacgcc tcgccggagg agctgaaccg ctactacgcc tccctgcgcc actacctcaa cctggtcacc cggcagcggt at - SEQ ID NO:168

Péptido inhibidor gástrico

YAEGTFISD YSIAMDKIHQ QDFVNWLLAQ KGKKNDWKHN ITQ - SEQ ID NO:169

tacgcggaaa gggactttca tcagtgacta cagtattgcc atggacaaga ttcaccaaca agactttgtg aactggctgc tggcccaaaa ggggaagaag aatgactgga aacacaacat cacccag - SEQ ID NO:170

370

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 07-058600- -00000-0000

Fecha: 2007-06-08 16:26:59 Dep: 2020 NUECREACIONI
Tra: 11 PATENTEIYII Eve: 379 FASENACIONALII
Act: 411 PRESENTACION Folios: 342

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

REQUISITOS MINIMOS PARA ADMISION A TRAMITE
PCT

PATENTE DE INVENCION [x] MODELO DE UTILIDAD [ ]

- Indicación de que se solicita la concesión de una patente [X]1
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [X]1
- Descripción de la invención [X]83
- Dibujos de ser estos pertinentes [X] 299
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [X]2

COMPLETA [X] INCOMPLETA [ ]

DISEÑO INDUSTRIAL [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de Diseño Industrial [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica y fotográfica del Diseño Industrial o muestra del material que incorpora el diseño [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

ESQUEMA DE TRAZADO [ ]

- Indicación de que se solicita el registro de un Esquema de Trazado [ ]
- Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud [ ]
- Representación gráfica del esquema trazado [ ]
- Comprobante de pago de las tasas establecidas [ ]

COMPLETA [ ] INCOMPLETA [ ]

Claudia Mendoza

Firma Responsable

Fecha_____

Conmutador: 3 82 08 40

Carrera 13 No. 27-00 Piso 5, 7 y 10

Fax: 350 52 20
E-mail: info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
Bogotá, D.C., Colombia

372