



Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

SOLICITUD

PATENTE DE INVENCION

07-52700

21 EXPEDIENTE N°

54 TÍTULO "LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDOGENOS"

51 CLASIFICACIÓN INTERNACIONAL A61K 39/395

71 SOLICITANTE DOMANTIS LIMITED

DOMICILIO CAMBRIDGE, REINO UNIDO

74 REPRESENTANTE LEGAL ALICIA LLOREDA RICAURTE

T P 53 215

22 BOGOTÁ, D C 25 10 2007

FW 10-06 2007

Polym, Geson

(FORMA P 10)

SS

PETITORIO

1



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 07-052700 -00000-0000

Fecha 2007-05-25 16:57:52 Dep. 2020 NUECREACIONE
Tra 11 PATENTEIYII Eve 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 284FORMULARIO 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 315 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0WGNacionalidad o Domicilio Cambridge, Reino
Unido

Lugar de Constitución

Teléfono 3264270 Fax 6069701

E-mail jllcco@lloredacamacho.com

IDENTIFICACIÓN

C C

☐

NIT

☐

C E

☐

Otro

☐

Cual _____

Numero _____

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 _____

Numero 39.690.713 TP 53.215

④

INVENTOR(ES)
(72)

Nombre TOMLINSON, Ian M

Dirección 315 Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG

Nacionalidad o Domicilio Reino Unido

⑤

PCT (86)

Solicitud Internacional No PCT/GB2005/004319

Fecha 10/11/05

Publicación Internacional No WO 2006/051288 A3

Fecha 18/05/06

⑥

Título (54)

"LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS"

⑦

Clasificación Internacional (51) A61K 39/395

⑧

Prioridad

SI ☒ NO ☐

(33) País de Origen

US

(32) Fecha

10/11/04

(31) Número de Solicitud

10/985,847

⑨

Comprobante de Pago No 07-35.283

Fecha 7 de Mayo de 2007

10

ANEXOS

- ☒ Comprobante de pago de la tasa de presentación de la solicitud
- ☐ Documento que acredite 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)
- ☒ Traducción de la solicitud internacional al castellano (Resumen, descripción, reivindicaciones, dibujos)
- ☐ Copia del examen preliminar internacional efectuado por la Autoridad Internacional de Examen Preliminar (IPEA)
- ☐ Traducción del examen preliminar internacional efectuado por la IPEA
- ☐ 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
- ☒ Otros reporte de búsqueda internacional con su traducción, publicación con su traducción y opinión escrita de la autoridad de búsqueda internacional con su traducción

11

FIGURA CARACTERISTICA

12

Solicito la concesión de la patente,

NOMBRE ALICIA LLORED RICAURTE

FIRMA

C C 39 690 713

T P 53 215

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 07-052700 -00000-0000

Fecha 2007-05-25 16:57:52 Dep. 2020 NUECREACIONI
Tra 11 PATENTEIYII Evs 378 FASENACIONALI
Act 411 PRESENTACION Folios 284

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

NIT 800176089-2

RECIBO OFICIAL DE CAJA 07 - 35 283
FECHA MAYO 7 DE 2007

***** CONSIGNACION *****

DEPOSITANTE	TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No PAGO	FECHA PGO	Vr PAGO
LLOREDA Y CIA S A	CONSIGNACION	BANCO POPULAR	050-00110-6	64016222	07/05/2007	7 446 000 00

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

CANT	RENTISTICO	CONCEPTO	TOTAL CONCEPTO
1	50005-01-01	SOLICITUDES	
		1 TRANITES DE SOL DE PATENTE DE IN	482 000 00
		TOTAL	\$ 482 000 00

SOM CUATROCIENTOS OCHENTA Y DOS MIL PESOS

RESPONSABLE _____ 



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES

4

Industria y Comercio

TARJETA ARCHIVO PROPIETARIOS

SUPERINTENDENCIA

PATENTE DE INVENCION

PCT

X

MODELO DE UTILIDAD

DISEÑO INDUSTRIAL

(21) N° de solicitud

(22) Fecha de solicitud 25-05-07

(51) Clasificación Internacional A61K 39/395

(71) Solicitante(s) DOMANTIS LIMITED

(72) Inventor(es) TOMLINSON, Ian, M

(74) Apoderado ALICIA LLOREDA RICAURTE

(30) Prioridad

(31)

No. Prioridad

(32)

Fecha

(33)

País

10/985 847

10-11-04

US

(85) Fecha límite inicio fase nacional 10-06-07

(87) Publicación Internacional

(86) Datos relativos a la presentación de la solicitud PCT

Fecha 18-05-06

Fecha de presentación de la solicitud 10-11-05

N° publicación WO 2006/051288 A3

No. de solicitud PCT/GB2005/004319

(54) Título LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS

4

		SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO		5	
Industria y Comercio		DIVISIÓN DE NUEVAS CREACIONES			
SUPERINTENDENCIA		TARJETA ARCHIVO TEMÁTICO			
PATENTE DE INVENCION		PCT ☒		MODELO DE UTILIDAD	
DISEÑO INDUSTRIAL					
(21) N° de solicitud		(22) Fecha de solicitud		25-05-07	
(51) Clasificación Internacional		A61K 39/395			
(71) Solicitante(s)		DOMANTIS LIMITED			
(72) Inventor(es)		TOMLINSON, Ian, M			
(74) Apoderado		ALICIA LLORED A RICAURTE			
(30) Prioridad	(31) No. Prioridad	(32) Fecha	(33) País	FIGURA CARACTERISTICA 6 x 6 cm	
	10/985,847	10-11-04	US		
(85) Fecha límite inicio fase nacional	10-06-07	(87) Publicación internacional	Fecha: 18-05-08		
(86) Datos relativos a la presentación de la solíc. PCT	Fecha de presentación de la solicitud	10-11-05	No. Publicación	WO 2006/051288 A3	
(54) Título		LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS			
(57) Resumen					
<u>Reivindicación número 81.</u> Un ligando que une un compuesto objetivo endógeno teniendo actividad adecuada para tratar una enfermedad en un sujeto en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno para uso en terapia de una enfermedad apta para tratamiento con dicho compuesto objetivo endógeno					
CONTINUA AL RESPALDO					

5

Casilla II Observaciones donde ciertas reivindicaciones fueron inescrutables (Continuación del ítem 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 la reivindicación 98 está dirigida a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición
- 2 ☒ Reivindicaciones Nos 33-58
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
ver INFORMACIÓN ADICIONAL hoja PCT/ISA/210
- 3 ☐ Reivindicaciones Nos
porque son reivindicaciones dependientes y no están diseñadas de acuerdo con la segunda y tercera oración de la Regla 6 4(a)

Casilla III Observaciones donde falta unidad de invención (Continuación del ítem 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.

INFORMACIÓN ADICIONAL CONTINUACIÓN DE PCT/ISA/210

7

Continuación de la Casilla II 1

Aunque la reivindicación 98 está dirigida a un método de tratamiento del cuerpo humano/animal, la búsqueda ha sido llevada a cabo y basada en los efectos alegados del compuesto/composición

Continuación de la Casilla II 2

Reivindicaciones Nos 33-58

La reivindicación 33 y las reivindicaciones que son dependientes de ella (reivindicaciones 34-58) no son claras (Artículo 6 PCT) porque la reivindicación independiente 33 exige que el ligando aumente la actividad del objetivo endógeno. Esta característica está en contradicción directa con la reivindicación 35, que es dependiente de la reivindicación 33 y que afirma que el ligando inhibe la actividad del compuesto objetivo endógeno en no más de 10%. Por lo tanto, el alcance de la reivindicación independiente 33 y las reivindicaciones dependientes 34-58 es tan confuso que no podría ser sujeto de una búsqueda significativa.

Se atrae la atención del solicitante al hecho de que las reivindicaciones relacionadas con invenciones respecto de las cuales no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional no es necesario que sean el objeto de un examen preliminar internacional (Regla 66 1(e) PCT). Se le notifica al solicitante que la política de la EPO al actuar como una Autoridad de Examen Preliminar Internacional normalmente es no llevar a cabo un examen preliminar sobre asuntos que no se han buscado. Este es el caso prescindiendo de si las reivindicaciones se han modificado o no después del recibo del reporte de búsqueda o durante un procedimiento del Capítulo II. Si la solicitud procede a la fase regional ante la EPO, se le recuerda al solicitante que puede llevarse a cabo una búsqueda durante el examen ante la EPO (ver Lineamiento C-VI, 8.5 de la EPO), si se superan los problemas que llevaron a la declaración del Artículo 17(2).

7

REPORTE DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/004319

9

C (Continuación) DOCUMENTOS CONSIDERADOS RELEVANTES		
Categoría *	Citación de documento, con indicación donde sea apropiado, de los textos relevantes	Relevante a la reivindicación No.
A	EP 0 467 416 A (HYBRITECH INCORPORATED) 22 de Enero de 1992 (1992-01-22) el documento completo	1-98
A	EP 0 298 654 A (HYBRISENS LTD) 11 de Enero de 1989 (1989-01-11) el documento completo	1-98
A	EP 0 339 505 A (E I DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2 de Noviembre de 1989 (1989-11-02) el documento completo	1-98

9

REPORTE DE BUSQUEDA INTERNACIONAL
Información sobre miembros de familia de patentes

Solicitud Internacional No
PCT/GB2005/004319

10

Documento de patente citado en el reporte de búsqueda	Fecha de publicación	Miembro(s) de la familia de patentes	Fecha de publicación
WO 2005094881 A1	13-10-2005	NINGUNO	
WO 2004003019 A	08-01-2004	CA 2492092 A1 CN 1678634 A EP 1517921 A2	08-01-2004 05-10-2005 30-03-2005
WO 2004001064 A	31-12-2003	AU 2003245664 A1 CA 2490009 A1 EP 1576172 A2 JP 2006512050 T	06-01-2004 31-12-2003 21-09-2005 13-04-2006
EP 0467416 A	22-01-1992	NINGUNO	
EP 0298654 A	11-01-1989	AT 106250 T AU 1865288 A DE 3889783 D1 DE 3889783 T2 DK 375188 A ES 2056108 T3 JP 1138461 A	15-06-1994 12-01-1989 07-07-1994 08-09-1994 08-01-1989 01-10-1994 31-05-1989
EP 0339505 A	02-11-1989	AU 3332389 A DK 166489 A FI 891956 A JP 2013395 A NO 891713 A PT 90364 A US 5225540 A ZA 8903088 A	02-11-1989 27-10-1989 27-10-1989 17-01-1990 27-10-1989 10-11-1989 06-07-1993 28-12-1990

AD

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/GB2005/004319

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 ☒ Claims Nos. because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Although claim 98 is 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. 33-58 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:
see FURTHER INFORMATION sheet PCT/ISA/210
- 3 ☐ Claims Nos. because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 8.4(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.

AA

FURTHER INFORMATION CONTINUED FROM PCTASA/ 210

Continuation of Box II 1

Although claim 98 is 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

Continuation of Box II 2

Claims Nos 33-58

Claim 33 and the claims which are dependent thereon (claims 34-58) are not clear (Article 6 PCT) because independent claim 33 requires that the ligand must increase the activity of the endogenous target. This feature is in direct contradiction with claim 35, which is dependent on claim 33 and which states that the ligand inhibits the activity of the endogenous target compound by no more than 10%. Therefore the scope of independent claim 33 and dependent claims 34-58 is so unclear that it could not be subject to a meaningful search.

The applicant's attention is drawn to the fact that claims relating to inventions in respect of which no international search report has been established need not be the subject of an international preliminary examination (Rule 66 1(e) PCT). The applicant is advised that the EPO policy when acting as an International Preliminary Examining Authority is normally not to carry out a preliminary examination on matter which has not been searched. This is the case irrespective of whether or not the claims are amended following receipt of the search report or during any Chapter II procedure. If the application proceeds into the regional phase before the EPO, the applicant is reminded that a search may be carried out during examination before the EPO (see EPO Guideline C-VI, 8.5), should the problems which led to the Article 17(2) declaration be overcome.

13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

/GB2005/004319

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

INV A61K39/395

ADD C07K16/24 C07K16/26

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

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, WPI Data, PAJ, EMBASE, BIOSIS

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
P, X	DATABASE WPI Section Ch, Week 200574 Derwent Publications Ltd, London, GB, Class B04, AN 2005-725413 XP002380847 & WO 2005/094881 A1 (TAKEDA PHARM CO LTD) 13 October 2005 (2005-10-13) abstract	1-98
A	WO 2004/003019 A (DOMANTIS LIMITED, WINTER, GREG, TOMLINSON, IAN, IGNATOVICH, OLGA, HOLT) 8 January 2004 (2004-01-08) example 12	17-20
A	WO 2004/001064 A (DYAX CORPORATION, SATO, AARON, K, EDGE, ALBERT) 31 December 2003 (2003-12-31) page 3, claim 24	1-93
-/-		

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☒ See patent family names.

Special categories of cited documents

- A document claiming 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 claims or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- C document relating 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
- A document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

15 May 2006

Date of mailing of the international search report

29/05/2006

Name and mailing address of the ISA/

European Patent Office, P.O. Box 5010 Patentamt 2
M - 2000 HV Filzweg
Tel (+31-70) 240-2040, Tlx 31 001 apo nl,
Fax (+31-70) 240-2016

Authorized officer

Wagner, R

13

14

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

international application No
/GB2005/004319

C(Description). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	EP 0 467 416 A (HYBRITECH INCORPORATED) 22 January 1992 (1992-01-22) the whole document	1-98
A	EP 0 298 654 A (HYBRISSENS LTD) 11 January 1989 (1989-01-11) the whole document	1-98
A	EP 0 339 505 A (E I DU PONT DE NEMOURS AND COMPANY) 2 November 1989 (1989-11-02) the whole document	1-98

Form PCT/IB/210 (Continuation of standard sheet) (April 2003)

14

15

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

national application No

/682005/004319

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 2005094881 A1	13-10-2005	NONE	
WO 2004003019 A	08-01-2004	CA 2492092 A1 CN 1678634 A EP 1517921 A2	08-01-2004 05-10-2005 30-03-2005
WO 2004001064 A	31-12-2003	AU 2003245664 A1 CA 2490009 A1 EP 1576172 A2 JP 2006512050 T	06-01-2004 31-12-2003 21-09-2005 13-04-2006
EP 0467416 A	22-01-1992	NONE	
EP 0298654 A	11-01-1989	AT 106250 T AU 1865288 A DE 3889783 D1 DE 3889783 T2 DK 375188 A ES 2056108 T3 JP 1138461 A	15-06-1994 12-01-1989 07-07-1994 08-09-1994 08-01-1989 01-10-1994 31-05-1989
EP 0339505 A	02-11-1989	AU 3332389 A DK 166489 A FI 891956 A JP 2013395 A NO 891713 A PT 90364 A US 5225540 A ZA 8903088 A	02-11-1989 27-10-1989 27-10-1989 17-01-1990 27-10-1989 10-11-1989 06-07-1993 28-12-1990

15

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

(19) Organización Mundial de Propiedad Intelectual
Oficina Internacional(43) Fecha de Publicación Internacional
18 de Mayo de 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) Número de Publicación Internacional
WO 2006/051288 A3(51) Clasificación Internacional de Patentes
A61K 39/395 (2006.01)(74) Agentes. LOCK, Graham, James y col. Fry Heath & Spence
LLP, The Gables, Massetts Road, Horley, Surrey RH6 7DQ
(GB)

(21) Número de Solicitud Internacional PCT/GB2005/004319

(22) Fecha de Registro Internacional
10 de Noviembre de 2005 (10.11.2005)

(25) Idioma de Registro Inglés

(26) Idioma de Publicación Inglés

(81) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección nacional disponible): 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

(30) Información de Prioridad
10/985 847 10 de Noviembre de 2004 (10.11.2004) US

(84) Estados Designados (a menos que sea indicado de otra manera, para cada tipo de protección regional disponible): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LS, MW, MZ, NA, SD, SL, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), Euroasiática (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), 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), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG)

(71) Solicitante (para todos los Estados designados excepto Estados Unidos de América): DOMANTIS LIMITED
[GB/GB] 315 Cambridge Science Park, Cambridge
CB4 0WG (GB)(72) Inventor: e
(73) Inventor/Solicitante (para Estados Unidos de América solamente): TOMLINSON, Ian, M. [GB/GB] 315
Cambridge Science Park, Cambridge CB4 0WG (GB)Publicada
— con reporte de búsqueda internacional(88) Fecha de publicación del reporte de búsqueda internacional
17 de Agosto de 2006Para los códigos de dos letras y otras abreviaturas, refiérase a "Las Notas
Guías sobre Códigos y Abreviaturas" que aparecen al comienzo de cada
edición regular de la Gaceta PCT

(54) Título LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS

(57) Resumen La invención se refiere a ligandos que comprenden una porción (por ejemplo, un dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno pero no inhiben substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno. Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo de un compuesto objetivo endógeno. La invención se refiere al uso de tal ligando para la fabricación de un medicamento para incrementar la vida media, biodisponibilidad, actividad o cantidad de un compuesto objetivo endógeno al cual el ligando se une.

17

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

(19) World Intellectual Property Organization
International Bureau



(43) International Publication Date
18 May 2006 (18.05.2006)

PCT

(10) International Publication Number
WO 2006/051288 A3

(51) International Patent Classification:
A61K 39/395 (2006.01)

(21) International Application Number:
PCT/GB2005/004319

(22) International Filing Date:
10 November 2005 (10.11.2005)

(25) Filing Language: English

(26) Publication Language: English

(30) Priority Data:
10985,847 10 November 2004 (10.11.2004) US

(71) Applicant (for all designated States except US): DOMAN
TIS LIMITED (GB/GB) 315 Cambridge Science Park,
Cambridge CB4 0WG (GB).

(72) Inventor, and

(75) Inventor/Applicant (for US only): 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, Minnetts 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, EG, ES, FI,
GB, GD, GE, GR, GM, HN, 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, MY, 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

(86) Date of publication of the international search report:
17 August 2006

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 2006/051288 A3

(54) Title: LIGANDS THAT ENHANCE ENDOGENOUS COMPOUNDS

(57) Abstract: The invention relates to ligands that comprise a moiety (e.g. a dAb) that has a binding site with binding specificity for an endogenous target compound but do not substantially inhibit the activity of said endogenous target compound. Preferably the ligand does not bind to the active site of an endogenous target compound. The invention relates to the use of such a ligand for the manufacture of a medicament for increasing the half life, bioavailability, activity or amount of an endogenous target compound to which the ligand binds.

17

De la
AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL

Para ver forma PCT/ISA/220		PCT OPINIÓN ESCRITA DE LA AUTORIDAD DE BÚSQUEDA INTERNACIONAL (PCT Regla 43bis 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 PCT/GB2005/004319	Fecha de registro internacional (día/mes/año) 10 11 2005	Fecha de prioridad (día/mes/año) 10 11 2004																									
Clasificación Internacional de Patentes (IPC) o clasificación nacional e IPC INV A61K39/395 ADD C07K 16/24 C07K16/26																											
Solicitante DOMANTIS LIMITED																											
1 Esta opinión contiene indicaciones relacionadas con los siguientes ítems <table border="0"> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No I</td> <td>Bases de la opinión</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No II</td> <td>Prioridad</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No III</td> <td>No establecimiento de opinión respecto a novedad, nivel inventivo y aplicabilidad industrial</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No IV</td> <td>Falta de unidad de invención</td> </tr> <tr> <td>☒</td> <td>Casilla No V</td> <td>Afirmación razonada de conformidad con la Regla 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No VI</td> <td>Ciertos documentos citados</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No VII</td> <td>Ciertos defectos en la solicitud internacional</td> </tr> <tr> <td>☐</td> <td>Casilla No VIII</td> <td>Ciertas observaciones sobre la solicitud internacional</td> </tr> </table> 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 1bis(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				☒	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 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas 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
☒	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 43bis 1(a)(i) con respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas 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																									
Nombre y dirección de correo de la ISA Oficina Europea de Patentes D-80298 Munich Tel +49 89 2399 - 0 Tx 523656 epmu d Fax +49 89 2399 - 4465		Fecha de terminación de esta opinión PCT/ISA/210	Funcionario Autorizado Wagner, R Teléfono No +49 89 2399-7357																								

Casilla No. I Bases de la opinión

- 1 Respecto al idioma, esta opinión ha sido establecida sobre las bases de
 - ☒ la solicitud internacional en el idioma en el cual se presentó
 - ☐ una traducción de la solicitud internacional en , el cual es el idioma de una traducción proporcionada para los propósitos de 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

Casilla No. II Prioridad

- 1 ☐ La validez de la reivindicación de prioridad no ha sido considerada ya que la Autoridad de Búsqueda Internacional no tiene a su disposición una copia de la solicitud anterior cuya prioridad ha sido reivindicada o, donde sea necesario, una traducción de la solicitud anterior Sin embargo, esta opinión ha sido establecida bajo la suposición que la fecha relevante (Reglas 43bis 1 y 64 1) es la fecha de prioridad reivindicada
- 2 ☒ Esta opinión ha sido establecida como sino se hubiera reclamado prioridad debido a que la reivindicación de prioridad ha sido encontrada inválida (Reglas 43bis 1 y 64 1) De esta manera, para los propósitos de esta opinión, la fecha de presentación internacional indicada arriba es considerada la fecha relevante
- 3 Observaciones adicionales de ser necesario
ver hoja separada

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 nivel inventivo (ser no obvia) o ser aplicable industrialmente no se han examinado respecto a

- ☐ toda la solicitud internacional,
☒ reivindicaciones Nos 33-58, 93(LA)

porque:

- ☒ dicha solicitud internacional, o dichas reivindicaciones Nos 93(respecto a LA) se refieren a la siguiente materia objeto la cual no requiere un examen preliminar internacional (*especifique*)

ver hoja separada

- ☐ la descripción, reivindicaciones o dibujos (*indique los elementos particulares a continuación*) de dichas reivindicaciones Nos son tan poco claros que no se podría formar una opinión significativa (*especifique*)

- ☐ las reivindicaciones, o dichas reivindicaciones Nos son sustentadas tan inadecuadamente por la descripción que no se podría formar una opinión significativa

- ☒ no se ha establecido ningún reporte de búsqueda internacional para toda la solicitud o para dichas reivindicaciones Nos 33-58

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin el listado de secuencia, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no

- ☐ suministró un listado de secuencias en papel para cumplir con el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas, y dicho listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ suministró un listado de secuencias en formato electrónico para cumplir en el estándar para ello provisto en el Anexo C de las Instrucciones Administrativas y tal listado no estuvo disponible para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta.

- ☐ pagó la tarifa de suministro tardío para el suministro de un listado de secuencia en respuesta a una invitación de acuerdo con las Reglas 13ter 1(a) o (b)

- ☐ no pudo establecerse una opinión significativa sin las tablas relacionadas con los listados de secuencias, el solicitante, dentro del límite de tiempo prescrito, no suministró dichas tablas en formato electrónico para cumplir con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas y dichas tablas no estuvieron disponibles para la Autoridad Internacional de Examen Preliminar de forma y manera aceptable para ésta

- ☐ las tablas que se relacionan con el listado de secuencias de aminoácidos y/o nucleótidos, si están solamente en formato electrónico, no cumplen con los requisitos técnicos para ello provistos en el Anexo C-bis de las Instrucciones Administrativas

- ☒ Ver Casilla Suplementaria para detalles adicionales

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

1 Declaración

Novedad (N)	Si	Reivindicaciones 14, 16-25, 62-65, 67-80, 93-95, 97, 98
	No	Reivindicaciones 1-13, 15, 26, 31, 32, 59-61, 66, 81-92, 96
Nivel Inventivo (IS)	Si	Reivindicaciones
	No	Reivindicaciones 1-32, 59-93
Aplicabilidad Industrial (IA)	Si	Reivindicaciones 1-32, 59-92
	No	Reivindicaciones

2 Citaciones y explicaciones
ver hoja separada

Re Ítem I

Base del reporte

El listado de secuencias presentado el 02 03 2006 no es parte de la solicitud según se presentó

Re Ítem II

Prioridad

- 1 El documento de prioridad no revela el concepto de "compuesto objetivo endógeno" ni muestra ninguna preferencia por los ligandos no inhibitorios. El documento de prioridad atribuye únicamente una importancia igual a ligandos agonistas y a ligandos antagonistas. En el documento de prioridad no se revela una clase de "no inhibitorios", que incluyen ligandos agonistas y ligandos que no tienen un efecto sobre la actividad. Por lo tanto, la fecha de prioridad de todas las presentes reivindicaciones, que usan un ligando no inhibitorio contra objetivos andrógenos, no es válidamente reivindicada y la fecha de presentación 10 11 2005 es considerada como la primera fecha de presentación.

Re Ítem III

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

- 1 La reivindicación 33 y las reivindicaciones dependientes de ella (reivindicaciones 34-58) no son claras (Artículo 6 PCT) porque la reivindicación independiente 33 exige que el ligando incrementa la actividad del objetivo endógeno. Esta característica está en contradicción directa con la reivindicación 35, que es dependiente de la reivindicación 33 y que afirma que el ligando inhibe la actividad del compuesto objetivo endógeno en no más de 10%. Por lo tanto, el alcance de la reivindicación independiente 33 y las reivindicaciones dependientes 34-58 es tan confuso que no podría ser sujeto de una búsqueda significativa y por lo tanto la materia objeto tampoco será examinada.
- 2 La reivindicación 98 se relaciona con la materia objeto que esta Autoridad considera que está cubierta por las disposiciones de la Regla 67 1(iv) PCT. Por consiguiente, no se formulará ninguna opinión respecto a la aplicabilidad industrial de la materia objeto de esta reivindicación (Artículo 34(4)(a)(i) PCT).

Re Ítem V

Afirmación razonada respecto a novedad, nivel inventivo o aplicabilidad industrial, citas y explicaciones que sustentan dicha afirmación

1 Se hace referencia al siguiente documento

D1 WO2005094881

2 El resumen en Inglés de D1, que está en japonés, revela el uso médico de un ligando, que puede ser un anticuerpo, que une un objetivo endógeno sin neutralizar sustancialmente la actividad del objetivo y por lo tanto aumentando la vida media del objetivo endógeno y aumentando la concentración del objetivo endógeno en la sangre. Por lo tanto, D1 anticipa la materia objeto de las reivindicaciones independientes 1-4, 59, 81, 87, 96 y de las reivindicaciones dependientes 11, 82-86, 88-92 Artículo 33(2) PCT. D1 también anticipa la reivindicación independiente 5 y las reivindicaciones dependientes 12, 13, 15, 60, 61, 66 porque un anticuerpo tiene dos sitios ligantes.

Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 5-10, 26, 62, 77 representan resultados que deben ser logrados, que no son sustentados experimentalmente por la presente solicitud y que parecen ser inherentes a los anticuerpos que unen a los ligandos endógenos. Los rangos de afinidad propuestos por las características de las reivindicaciones 31, 32, 79, 80 son comunes para anticuerpos y puede considerarse que los anticuerpos de D2 tienen las afinidades deseadas. Por lo tanto, D1 también anticipa la materia objeto de las reivindicaciones 31, 32, 79, 80 (Artículo 33(2) PCT).

Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 14, 16-18, 67-69 describen ligandos alternativos, que son bien conocidos en el campo y que no confieren un nivel inventivo sobre el uso (Artículo 33(3) PCT).

Las características adicionales de las reivindicaciones dependientes 19-25, 70-76 representan estrategias bien conocidas para aumentar más la vida media de los ligandos y por lo tanto no confieren un nivel inventivo sobre la materia objeto de dichas reivindicaciones (Artículo 33(3) PCT)

El uso de una formulación de depósito (reivindicación 27), un dispositivo de liberación de fármacos (reivindicación 93-95) y la escogencia de posibles objetivos endógenos (reivindicaciones 28-30, 63, 64, 97) no confieren un nivel inventivo sobre el uso

- 3 El uso de la reivindicación 98 es nuevo (Artículo 33(2) PCT), pero la escogencia de un miembro de la superfamilia del receptor TNF como objetivo no confiere un nivel inventivo sobre el uso (Artículo 33(3) PCT). Además, la presente solicitud no ha proporcionado ninguna prueba experimental de que la biodisponibilidad, o actividad del miembro de la superfamilia del receptor TNF fue preservado en vivo después de estar unido al ligando. Por lo tanto, falta el efecto técnico sobre el cual podría basarse la evaluación de la presencia o ausencia de un nivel inventivo.
- 4 Para la evaluación de la presente reivindicación 98 sobre la pregunta de si son aplicables industrialmente, no existen criterios unificados en los Estados Contratantes del PCT. La patentabilidad también puede depender de la formulación de la reivindicación. La EPO, por ejemplo, no reconoce como aplicable industrialmente la materia objeto de las reivindicaciones en cuanto al uso de un compuesto en el tratamiento médico, pero puede permitir, sin embargo, reivindicaciones a un compuesto conocido para primer uso en el tratamiento médico y el uso de dicho compuesto para la elaboración de un medicamento para un nuevo tratamiento médico.

PATENT COOPERATION TREATY

From the
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY

To

see form PCT/ISA/220

PCT

WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY
(PCT Rule 43b's.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 1 below

International application No PCT/GB2005/004319	International filing date (day/month/year) 10.11.2005	Priority date (day/month/year) 10.11.2004
---	--	--

International Patent Classification (IPC) or both national classification and IPC
INV A61K38095
ADD. C07K16/24 C07K16/26

Applicant
DOMANTIS LIMITED

1. This opinion contains indicators 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 43b's.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. VII 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 notified the International Bureau under Rule 56.1(a)(b) that written opinions of this International Searching Authority will not be so considered.

If the 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  European Patent Office D-60090 Munich Tel. +49 89 2339-0 711, 323655 ext. 4 Fax: +49 89 2339 4443	Date of completion of this opinion see form PCT/ISA/210	Authorized Officer WAGNER, R Telephone No. +49 89 2339-7357 
--	--	--

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/004319

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 13.1 (b)).
- 2 With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the 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.

Box No. II Priority

- 1 ☐ The validity of the priority claim has not been considered because the International Searching Authority does not have in its possession a copy of the earlier application whose priority has been claimed or where required, a translation of that earlier application. This opinion has nevertheless been established on the assumption that the relevant date (Rules 43bis.1 and 64.1) is the claimed priority date.
- 2 ☒ This opinion has been established as if no priority had been claimed due to the fact that the priority claim has been found invalid (Rules 43bis.1 and 64.1). Thus for the purposes of this opinion, the international filing date indicated above is considered to be the relevant date.
- 3 Additional observations, if necessary
see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING AUTHORITY**

International application No.
PCT/GB2005/004319

Box No. B1 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. 33-58, 93(IA)

because:

☒ the said international application or the said claims Nos. 93 (regarding IA) 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. 33-58

☐ 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 bis 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/GB2005/004319

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

1 Statement

Novelty (N)	Yes	Claims	14, 16-25, 52-66, 67-80, 93-95, 97, 98
	No	Claims	1, 13, 15, 26, 31, 32, 50-51, 56, 51-92, 96
Inventive step (IS)	Yes	Claims	
	No	Claims	1-32, 50-92
Industrial applicability (IA)	Yes	Claims	1-32, 50-92
	No	Claims	

2 Citations and explanations

see separate sheet

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/004319

Re Item I

Basis of the report

The sequence listing filed on 02.03.2006 is not part of the application as filed.

Re Item II

Priority

- 1 The priority document does not disclose the concept of "endogenous target compound" nor does it show any preference for non-inhibitory ligands. The priority document attributes only an equal importance to agonist ligands and to antagonist ligands. A class of "non-inhibitory", which include agonist ligands and ligands which do not have an effect on the activity is not disclosed in the priority document. Therefore the priority date of all the present claims, which use a non-inhibitory ligand against endogenous targets, is not validly claimed and the filing date of 10.11.2005 is considered as the first filing date.

Re Item III

Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability

- 1 Claim 33 and the claims which are dependant thereon (claims 34-58) are not clear (Article 6 PCT) because independent claim 33 requires that the ligand must increase the activity of the endogenous target. This feature is in direct contradiction with claim 35 which is dependent on claim 33 and which states that the ligand inhibits the activity of the endogenous target compound by no more than 10%. Therefore the scope of independent claim 33 and dependent claims 34-58 is so unclear that it could not be subject to a meaningful search and thus the subject-matter will also not be examined.
2. Claims 98 relates 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 this claim (Article 34(4)(a)(i) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.
PCT/GB2005/004319

Re Item V

**Reasoned statement with regard to novelty, inventive step or industrial applicability,
citations and explanations supporting such statement**

1 Reference is made to the following document.

D1 WO2006094881

2 The English abstract of D1, which is in Japanese, discloses the medical use of a ligand, which can be an antibody binding an endogenous target without substantially neutralizing the activity of the target and thereby increasing the half-life of the endogenous target and increasing the concentration of the endogenous target in the blood. Thus D1 anticipates the subject-matter of independent claims 1-4, 59-81, 87, 96 and dependent claims 11, 82-85, 88-92 (Article 33(2) PCT). Independent claim 5 and dependent claims 12, 13, 15, 60, 61, 66 are also anticipated by D1 because an antibody has two binding sites.

The additional features of dependent claims 5-10, 26, 82, 77 represent results to be achieved, which are not further experimentally substantiated by the present application and which appear to be inherent to antibodies binding the endogenous ligands. The affinity ranges proposed by the features of claims 31, 32, 79, 80 are common for antibodies and the antibodies of D1 can be considered to have the desired affinities. Thus the subject-matter of claims 31-32, 79, 80 is also anticipated by D1 (Article 33(2) PCT).

The additional features of dependent claims 14, 16-18, 67-69 describe alternative ligands which are well known in the field and which do not confer an inventive step on the use (Article 33(3) PCT).

**WRITTEN OPINION OF THE
INTERNATIONAL SEARCHING
AUTHORITY (SEPARATE SHEET)**

International application No.

PCT/GB2005/004319

The additional features of dependent claims 19-25, 70-76 represent well known strategies for further increasing the half-life of the Igands and do therefore not confer an inventive step on the subject-matter of said claims (Article 33(3) PCT).

The use of a depot formulation (claim 27), a drug delivery device (claims 93-95) and the choice of possible endogenous targets (claims 28-30 63,64,97) does not confer an inventive step on the use.

3. The use of claim 98 is new (Article 33(2) PCT) but the choice of a member of the TNF receptor superfamily as a target does not confer an inventive step on the use (Article 33(3) PCT). In addition the present application has not provided any experimental proof that the bioavailability, or activity of the member of the TNF receptor superfamily was preserved in vivo after being bound to the Igand. Thus the technical effect on which the evaluation of the presence or absence of an inventive step could be based is missing.
4. For the assessment of the present claim 98 on the question whether it is industrially applicable, no unified criteria exist in the PCT Contracting States. The patentability can also be dependent upon the formulation of the claim. The EPO, for example does not recognize as industrially applicable the subject-matter of claims to the use of a compound in medical treatment, but may allow, however, claims to a known compound for first use in medical treatment and the use of such a compound for the manufacture of a medicament for a new medical treatment.

LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS

RESUMEN-OBJETO Y FINALIDAD DE LA INVENCION

- 5 La invención se refiere a ligandos que comprenden una porción (por ejemplo, un dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno pero no inhiben substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno. Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo de un compuesto
- 10 objetivo endógeno. La invención se refiere al uso de tal ligando para la fabricación de un medicamento para incrementar la vida media, biodisponibilidad, actividad o cantidad de un compuesto objetivo endógeno al cual el ligando se une.

LIGANDOS QUE MEJORAN COMPUESTOS ENDÓGENOS

Solicitudes relacionadas

Esta solicitud es una continuación en parte de la Solicitud de
5 Patente de EE UU No 10/985,847, presentada el 10 de Noviembre
de 2004, las enseñanzas totales de la cual se incorporan en la
presente para referencia

Antecedentes de la Invención

10 Animales, incluyendo mamíferos, y humanos producen una
variedad de compuestos endógenos que tienen actividades que
ayudan a mantener la salud normal y fisiología del animal. Tales
compuestos se incluyen en muchos procesos fisiológicos tales
como hemostasis, función inmune, metabolismo, regulación de
15 proliferación celular y diferenciación y lo similar. Muchos
compuestos endógenos se han aislado y formas sintéticas o
recombinantes pueden hacerse y administrarse a pacientes para
combatir la enfermedad. Planteamientos terapéuticos actuales con
frecuencia incluyen administrar formas exógenas o producidas de
20 manera exógena de compuestos endógenos a pacientes. Tales
planteamientos terapéuticos pueden producir efectos indeseables
debido a las altas dosis que se administran normalmente, y ciertos
agentes terapéuticos, tales como formas recombinantes de
proteínas humanas generalmente deben producirse por expresión
25 en células mamíferas que es costosa y produce producciones

inferiores que la expresión en sistemas de levadura o bacterianos

Estos problemas podrían superarse por el desarrollo de agentes terapéuticos y métodos que pueden fortalecer y explotar las actividades benéficas de compuestos endógenos para producir efectos terapéuticos. Existe una necesidad de tales agentes terapéuticos y métodos

Breve Descripción de la Invención

La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno, para la fabricación de un medicamento. Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo del compuesto objetivo endógeno

El medicamento puede ser para incrementar la cantidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, para incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, para incrementar la vida media *in vivo* de un compuesto objetivo endógeno. El medicamento también puede ser para incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) de un compuesto objetivo endógeno. El medicamento puede ser para suministro local o sistémico

En algunas modalidades, la cantidad de ligando objetivo endógeno en el sujeto aproximadamente 4 horas después de la

administración del medicamento se incrementa por al menos 1 5 veces, en relación a la cantidad antes de la administración del medicamento En algunas modalidades, la vida media *in vivo* del compuesto objetivo endógeno se incrementa por al menos 1 5 5 veces después de la administración del medicamento

Generalmente, el ligando inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno por no más de aproximadamente 10%, o tiene una concentración inhibidora 50 (IC50) de al menos 1 micromolar

10 El ligando puede comprender dos o más copias de dicha porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno Por ejemplo, el ligando puede ser un dímero de una porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno, tal como un dímero dAb

15 La porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno puede ser un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio clase A del receptor LDL, un dominio EGF, un avímero, anticuerpo o un fragmento de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento 20 Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina (por ejemplo, un V_H humano, y un V_L humano, un V_{HH})

Si se desea, el ligando puede comprender además una 25 porción que extiende la vida media como se describe en la

presente. Por ejemplo, el ligando puede comprender una porción que extiende la vida media seleccionada del grupo consistiendo de una porción de glicol de polialquileno, albumina de suero o un fragmento de la misma, receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*. De manera adecuada una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* incluye un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, un avimero, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tales como un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo, y un dominio variable sencillo de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H humano, V_L humano, V_{HH})

Los medicamentos y ligandos de la invención son substancialmente no inmunogénicos. En algunas modalidades, el medicamento es una formulación de depósito. En algunas modalidades, el compuesto objetivo endógeno es un agonista soluble (por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas), receptor soluble (por ejemplo, receptores de citoquina solubles, tales como TNFR1 soluble, TNFR2 soluble, receptor IL-1 soluble, receptor IL-4 soluble, receptor IL-13 soluble), antagonista de receptor endógeno (por ejemplo, antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra)) o una enzima. En modalidades particulares, el compuesto

objetivo endógeno es un receptor de citoquina soluble, tal como TNFR1 soluble. Preferentemente, el ligando une el compuesto objetivo endógeno con alta afinidad, tal como K_d de 1×10^{-7} M o menos.

5 En ciertas modalidades, los medicamentos o ligandos de la invención no incluyen un anticuerpo, fragmento o región del mismo descritos en la publicación de solicitud de patente de EE UU publicada no 2003/0144484. En ciertas modalidades, los medicamentos o ligandos de la invención no inhiben la unión del
10 anticuerpo A2 o anticuerpo A2 quimérico (cA2) a TNF-alfa de humano. En modalidades particulares, los medicamentos o ligandos de la invención no se unen a un epítipo incluido en aminoácidos 87-108 o un epítipo incluido en ambos aminoácidos 59-80 y 87-108 de TNF humano (factor de necrosis de tumor).

15 Estos aminoácidos son

59-80 Tyr-Ser-Gln-Val-Leu-Phe-Lys-Gly-Gln-Gly-Cys-Pro-Ser-Thr-His-Val-Leu-Leu-Thr-His-Thr-Ile (SEQ ID NO 26), y

87-108 Tyr-Gln-Thr-Lys-Val-Asn-Leu-Leu-Ser-Ala-Ile-Lys-Ser-Pro-Cys-Gln-Arg Glu-Thr-Pro-Glu-Gly (SEQ ID NO 27)

20 La invención también se refiere al uso de compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la actividad de dicho objetivo endógeno, en donde dicho ligando une dicho objetivo endógeno y no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno.
25 Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo de dicho

compuesto objetivo endógeno En algunas modalidades, la actividad de unión del ligando objetivo endógeno se incrementa, por ejemplo la actividad de unión (por ejemplo, afinidad, avidéz) puede incrementarse por un factor de al menos 10

5 La invención también se refiere a un ligando que une un compuesto objetivo endógeno teniendo actividad adecuada para tratar una enfermedad en un sujeto, en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo
10 endógeno, para uso en terapia de una enfermedad apta para tratamiento con dicho compuesto objetivo endógeno

La invención también se refiere a una composición farmacéutica comprendiendo un ligando que une un compuesto objetivo endógeno teniendo actividad adecuada para tratar una
15 enfermedad en un sujeto y un vehiculo fisiológicamente aceptable, en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

La invención también se refiere a un sistema de suministro
20 de fármaco comprendiendo una composición farmacéutica de la invención En algunas modalidades ese dispositivo de suministro de fármaco es un dispositivo de suministro parenteral, dispositivo de suministro intravenoso, dispositivo de suministro intramuscular, dispositivo de suministro intraperitoneal, dispositivo de suministro
25 transdérmico, dispositivo de suministro pulmonar, dispositivo de

suministro intraarterial, dispositivo de suministro intratecal, dispositivo de suministro intraarticular, dispositivo de suministro subcutáneo, dispositivo de suministro intranasal, dispositivo de suministro vaginal, y dispositivo de suministro rectal Por ejemplo, el dispositivo de suministro de fármaco puede ser una jeringa, un dispositivo de suministro transdérmico, una cápsula una tableta, un nebulizador, un inhalador, un atomizador, un aerosolizador, un vaporizador, un Inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, un rociador de dosis medida, un vaporizador de dosis medida un atomizador de dosis medida, un catéter

La invención se refiere a un método para incrementar la vida media de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la cantidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo

una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para tratar un sujeto teniendo una enfermedad que es apta para tratamiento con un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención también se refiere a nuevos ligandos (por ejemplo, dAbs) descritos en la misma

Breve Descripción de los Dibujos

Figura 1 es una gráfica de la concentración relativa de TNFR1 soluble detectado por ELISA en el suero con el tiempo (curva de tiempo de concentración) después de una administración intravenosa única de un monómero dAb PEGilado que une TNFR1 (TAR2m-21-23/40K PEG ramificado, también referido como PEG

anti-TNFR1 dAb) Los puntos de datos en el diagrama se obtienen por ELISA utilizando una dilución 1 5 de suero La gráfica muestra claramente que la biodisponibilidad de TNFR1 en la circulación sistémica se incrementa por la administración de un monómero dAb PEGilado que une TNFR1 Como se muestra por la curva de tiempo de concentración, el nivel de TNFR1 soluble en suero aumentó después de que el monómero dAb PEGilado se administra, alcanza una concentración máxima, y entonces se reduce con el tiempo a niveles básicos a medida que el dAb PEGilado se despeja Los resultados demuestran que administrar un dAb que une un receptor soluble puede incrementar la biodisponibilidad del receptor e incrementar el nivel o cantidad de receptor soluble en la circulación sistémica, y que el nivel incrementado o cantidad de receptor soluble en la circulación sistémica se despeja y regresa a niveles básicos Los resultados indican que el nivel de receptor soluble en la circulación sistémica puede controlarse al administrar un monómero dAb PEGilado que une el receptor soluble

20 Descripción Detallada de la Invención

Dentro de esta especificación las modalidades se han descrito en una manera que permite que una especificación clara y concisa sea escrita, pero se propone y se apreciará bien que las modalidades pueden combinarse de manera variada o separada sin apartarse de la invención

Como se utiliza en la presente, el término "ligando" se refiere a un compuesto que comprende al menos un péptido, polipéptido o porción de proteína que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado. Por ejemplo, la porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede ser un dominio variable sencillo de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H , V_L , V_{HH}) que tiene especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado (por ejemplo, una proteína de receptor soluble, antagonista de receptor endógeno, citoquina o factor de crecimiento). La porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno también puede comprender una o más regiones de determinación complementarias (CDRs) de un dominio variable sencillo de inmunoglobulina que tiene especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado en un formato adecuado, de manera que la porción tiene especificidad de unión para el compuesto objetivo endógeno. Por ejemplo, las CDRs pueden injertarse en una estructura o microandamio de proteína adecuada, tales como un aficuerpo, un microandamio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL o un dominio EGF. Además, el ligando puede ser monovalente (por ejemplo, un monómero dAb), bivalente (homobivalente, heterobivalente) o multivalente (homomultivalente, heteromultivalente) como se describe en la presente. De esta manera "ligandos" incluyen polipéptidos que consisten de dAb,

incluyen polipéptidos que consisten esencialmente de tal dAb polipéptidos que comprenden un dAb (o las CDRs de un dAb) en un formato adecuado, tales como un formato de anticuerpo (por ejemplo, formato similar a IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂) o una estructura o microandamio de proteína adecuada, tales como un 5 anticuerpo, un microandamio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL o un dominio EGF, ligandos específicos duales que comprenden un dAb que une un primer compuesto objetivo endógeno y un segundo dAb que une otro compuesto objetivo 10 endógeno (por ejemplo, albumina de suero), y ligandos multiespecíficos como se describe en la presente. La porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno también puede ser un dominio de proteína comprendiendo un sitio de unión para un objetivo deseado, por ejemplo, un dominio de 15 proteína se selecciona de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, un avímero (ver, por ejemplo, Publicaciones de Solicitud de Patente de EE UU Nos 2005/0053973, 2005/0089932, 2005/0164301). Si se desea, un "ligando" puede comprender además una o más porciones 20 adicionales, que pueden ser cada una independientemente un péptido, polipéptido o porción de proteína o una porción no peptídica (por ejemplo, un glicol de polialquileno, un lípido, un carbohidrato). Por ejemplo, el ligando puede comprender además una porción que extiende la vida media como se describe en la 25 presente (por ejemplo, una porción de glicol de polialquileno, una

porción comprendiendo albumina, un fragmento de albumina o variante de albumina, una porción comprendiendo transferrina, un fragmento de transferrina o variante de transferrina, una porción que une albumina, una porción que une receptor neonatal Fc)

5 Como se utiliza en la presente, el término "compuesto objetivo endógeno" se refiere un compuesto soluble que se produce por un sujeto (por ejemplo, un mamífero, un humano) de interés. Compuestos objetivo endógenos incluyen, por ejemplo, agonistas solubles (por ejemplo, citoquinas, factores de crecimiento, hormonas), receptores solubles (por ejemplo, receptores de citoquina solubles, tales como TNFR1 soluble, soluble, TNFR2 soluble, receptor IL-1 soluble, receptor IL-4 soluble, receptor IL-13 soluble), antagonistas de receptor endógeno (por ejemplo, antagonista de receptor IL-1 (IL-1ra)),
10 enzimas, y lo similar

 Como se utiliza en la presente, el término "sitio activo" se refiere al sitio o dominio de un compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, proteína) que interactúa con (por ejemplo, une) un compañero de unión endógeno de un compuesto objetivo endógeno
20 (por ejemplo, sitio o dominio de una proteína receptora que hace contacto con el ligando del receptor, sitio o dominio de una proteína agonista (por ejemplo, una citoquina) que hace contacto con el receptor del agonista, el dominio catalítico de una enzima). Por ejemplo, como se utiliza en la presente, el "sitio activo" de un
25 compuesto endógeno soluble tales como una citoquina, factor de

crecimiento u hormona es el sitio en la citoquina, factor de crecimiento u hormona que hace contacto con el receptor endógeno que une la citoquina, factor de crecimiento u hormona

Como se utiliza en la presente, "biodisponibilidad" se refiere al grado al cual un compuesto objetivo endógeno o complejo de ligando-compuesto objetivo endógeno está presente u obtiene acceso a un sitio de acción deseado (por ejemplo, la circulación sistémica, el sistema nervioso central, un sitio de acción local (por ejemplo, un órgano particular, un área particular de tejido (por ejemplo, musculo, piel))) Biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno puede incrementarse independientemente de cualquier cambio en la vida media *in vivo* del compuesto objetivo endógeno, o de cualquier cambio en la cantidad del compuesto objetivo endógeno en un sujeto Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno que tiene actividad benéfica en la circulación sistémica pero que se distribuye rápidamente en los tejidos, y disminuye la velocidad de distribución en los tejidos Tal ligando incrementaría la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la circulación sistémica donde la actividad benéfica del compuesto objetivo endógeno puede tener efecto terapéutico

Como se utiliza en la presente, "actividad de unión" se refiere a la capacidad de los compañeros de unión a unirse entre sí Por ejemplo, la capacidad de un receptor o receptor soluble para unir su ligando cognado La actividad de unión puede

expresarse, por ejemplo, como afinidad (K_d , $K_d = K_{\text{apagada}}/K_{\text{encendida}}$) o avidez. Actividad de unión puede incrementarse, por ejemplo, al incrementar la afinidad (por ejemplo, incrementar la velocidad de unión ($K_{\text{encendida}}$) o disminuir la velocidad de disociación (K_{apagada}))

5 o al incrementar avidez. Avidez puede incrementarse, por ejemplo, al incrementar el número de sitios en los cuales un primer compañero de unión y un segundo compañero de unión hacen contacto.

Como se utiliza en la presente, la frase "substancialmente no inmunogénico" significa anticuerpos de alta afinidad que unen el
 10 ligando, ligando-compuesto objetivo endógeno o compuesto objetivo endógeno no se producen con un ligando que se administra a un sujeto. Los anticuerpos de alta afinidad unen el ligando, complejo ligando-compuesto objetivo endógeno o
 15 compuesto objetivo endógeno con una afinidad de 500 nM o inferior, o 300 nM o inferior, o 100 nM o inferior, o 10 nM o inferior, o 1 nM o inferior. Los anticuerpos que unen el ligando, complejo ligando-compuesto objetivo endógeno o compuesto objetivo endógeno y la afinidad de tales anticuerpos pueden
 20 identificarse utilizando cualquier método adecuado. Varios de tales métodos se conocen bien en la materia. Por ejemplo, una muestra de suero puede obtenerse de un humano a quien un ligando se ha administrado (por ejemplo, aproximadamente 1 semana, 2 semanas, 3 semanas, 4 semanas después de la
 25 administración) y el suero puede probarse por la presencia de

anticuerpos que unen ligando, ligando-compuesto objetivo endógeno o compuesto objetivo endógeno utilizando, por ejemplo ELISA u otro ensayo adecuado. La afinidad de anticuerpos pueda determinarse utilizando cualquier método adecuado, tal como por

5 diálisis de equilibrio o por resonancia de plasmón de superficie

La frase "dominio variable sencillo de Inmunoglobulina" se refiere a una región variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) que específicamente une un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones V o dominios, sin embargo, como el término se

10 utiliza en la presente, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (por ejemplo, homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o dominios variables donde las otras regiones o dominios no se requieren para unión de antígeno por el dominio variable de inmunoglobulina

15 único (es decir, donde el dominio variable sencillo de inmunoglobulina une el antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). "Dominio variable sencillo de inmunoglobulina" comprende no solamente un polipéptido de dominio variable sencillo de anticuerpo aislado, sino que también

20 polipéptidos más grandes que comprenden uno o más monómeros de una secuencia de polipéptidos de dominio variable sencillo de anticuerpo. Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es el mismo que un polipéptido de "dominio variable sencillo de inmunoglobulina" como el término se utiliza en la presente. Un polipéptido de

25 dominio variable sencillo de inmunoglobulina, como se utiliza en la

presente se refiere a un polipéptido de dominio variable sencillo de inmunoglobulina de mamífero, preferentemente humano, pero también incluye V_{HH} dAbs de roedor (por ejemplo, como se describe en WO 00/29004, los contenidos de la cual se incorporan en la presente para referencia en su totalidad) o camélido dAbs de camélido son polipéptidos de dominio variable sencillo de inmunoglobulina que se derivan de especies incluyendo camello, llama, alpaca, camello árabe, y guanaco, y comprenden anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadena ligera V_{HH} . Moléculas V_{HH} son aproximadamente diez veces más pequeñas que las moléculas IgG, y como polipéptidos únicos, son muy estables, resistiendo condiciones de temperatura y pH extremas.

"Complementario" Dos dominios de inmunoglobulina son "complementarios" donde pertenecen a familias de estructuras que forman pares cognados o grupos o se derivan de tales familias y retienen esta característica. Por ejemplo, un dominio V_H y un dominio V_L de un anticuerpo son complementarios, dos dominios V_H no son complementarios, y dos dominios V_L no son complementarios. Los dominios complementarios pueden encontrarse en otros miembros de la superfamilia de inmunoglobulina, tales como los dominios V_α y V_β (α y δ) del receptor de célula T. Dominios que son artificiales, tales como dominios en base a microandamios de proteína que no unen epítopos al menos que se planeen para hacer eso, no son

complementarios Del mismo modo, dos dominios en base a (por ejemplo) un dominio de inmunoglobulina y un dominio de fibronectina no son complementarios

"Familia de inmunoglobulina" Esto se refiere a una familia de polipéptidos que retienen la característica de doblez de inmunoglobulina de moléculas de anticuerpo, que contiene dos hojas β y, usualmente, un enlace de disulfuro conservado. Miembros de la superfamilia de inmunoglobulina se incluyen en muchos aspectos de interacciones celulares y no celulares *in vivo*, incluyendo papeles de difusión en el sistema inmune (por ejemplo anticuerpos, moléculas de receptor de célula T y lo similar), la inclusión en adhesión celular (por ejemplo las moléculas ICAM) y señalización intracelular (por ejemplo, moléculas receptoras, tal como el receptor PDGF). La presente invención es aplicable a todas las moléculas de superfamilia de inmunoglobulina que posee dominios de unión. Preferentemente, la presente invención se refiere a anticuerpos.

"Dominio" Un dominio es una estructura de proteína doblada que retiene su estructura terciaria independientemente del resto de la proteína. Generalmente, dominios son responsables de propiedades funcionales discretas de proteínas, y en muchos casos pueden agregarse, removerse o transferirse a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Por dominio variable de anticuerpo único se entiende un dominio de polipéptido doblado comprendiendo secuencias

características de dominios variables de anticuerpo Por lo tanto incluye dominios variables de anticuerpo completo y dominios variables modificados, por ejemplo, en los cuales uno o más ciclos se han reemplazado por secuencias que no son características de dominios variable de anticuerpo, o dominios variable de anticuerpo que se han truncado o comprenden extensiones de terminal N o C, así como también fragmentos doblados de dominios variables que retienen al menos en parte la actividad de unión y especificidad del dominio de longitud completa

10 "Repertorio" Una recolección de diversas variantes, por ejemplo, variantes de polipéptido que difiere en su secuencia primaria Una biblioteca utilizada en la presente invención comprenderá un repertorio de polipéptidos comprendiendo al menos 1000 miembros

15 "Biblioteca" El término biblioteca se refiere a una mezcla de polipéptidos heterogéneos o ácidos nucleicos La biblioteca se compone de miembros, cada uno de los cuales tiene una secuencia de ácidos nucleicos o polipéptidos única Para este grado, *biblioteca* es sinónimo de repertorio Las diferencias de
20 secuencia entre miembros de la biblioteca son responsables de la diversidad presente en la biblioteca La biblioteca puede tomar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en la forma de organismos o células, por ejemplo bacterias, virus, células vegetales o animales y lo similar,
25 transformada con una biblioteca de ácidos nucleicos

Preferentemente cada organismo o célula individual contiene solamente uno o un número limitado de miembros de biblioteca. Ventajosamente, los ácidos nucleicos se incorporan en vectores de expresión, para permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una biblioteca puede tomar la forma de una población de organismos huésped, cada organismo conteniendo una o más copias de un vector de expresión conteniendo un miembro único de la biblioteca en forma de ácido nucleico que puede expresarse para producir su miembro de polipéptido correspondiente. De esta manera, la población de organismos huésped tiene el potencial de codificar un gran repertorio de variantes de polipéptido genéticamente diversas.

"Anticuerpo" Un anticuerpo (por ejemplo IgG, IgM, IgA, IgD o IgE) o fragmento (tales como un Fab, F(ab')₂, Fv, Fv enlazado de disulfuro, scFv, anticuerpo multiespecífico de conformación cerrada, scFv enlazado a disulfuro, diacuerpo) ya sea derivado de cualquier especie que produce de manera natural un anticuerpo, o creado por tecnología de ADN recombinante, ya sea aislado de suero, células B, hibridomas, transfectomas, levadura o bacteria).

"Ligando específico dual" Un ligando comprendiendo un primer dominio variable sencillo de inmunoglobulina y un segundo dominio variable sencillo de inmunoglobulina como se define en la presente, en donde las regiones variables son capaces de unirse a dos antígenos diferentes o dos epítopos en el mismo antígeno que

no se unen normalmente por una inmunoglobulina monoespecífica. Por ejemplo, los dos epítopos pueden estar en el mismo hapteno, pero no el mismo epítipo o suficientemente adyacente para unirse por un ligando monoespecífico. Los ligandos específicos duales de acuerdo a la invención se componen de dominios variables que tienen diferentes especificidades, y no contienen pares de dominio variable mutuamente complementarios que tienen la misma especificidad. Ligandos específicos duales y métodos adecuados para preparar ligandos específicos duales se describen en WO 2004/058821, WO 2004/003019, y WO 03/002609, las enseñanzas completas de cada una de estas solicitudes internacionales publicadas se incorporan en la presente para referencia.

"Antígeno" Una molécula que se une por un ligando de acuerdo a la presente invención. Típicamente, antígenos se unen por ligandos de anticuerpo y son capaces de obtener una respuesta de anticuerpo *in vivo*. Puede ser un polipéptido, proteína, ácido nucleico u otra molécula. Generalmente, los ligandos específicos duales de acuerdo a la invención se seleccionan para especificidad objetivo contra un antígeno particular. En el caso de anticuerpos convencionales y fragmentos de los mismos, el sitio de unión a anticuerpo definido por los ciclos variables (L1, L2, L3 y H1, H2, H3) es capaz de unirse al antígeno.

"Epítipo" Una unidad de estructura convencionalmente unida por un par V_H/V_L de inmunoglobulina. Epítopos definen el sitio de unión mínimo para un anticuerpo, y de esta manera representan el

objetivo de especificidad de un anticuerpo En el caso de un anticuerpo de dominio unico, un epítipo representa la unidad de estructura unida por un dominio variable en aislamiento

"Estructura universal" Una secuencia de estructura de anticuerpo unica correspondiente a las regiones de un anticuerpo conservado en secuencia como se define por Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services) o correspondiente a la estructura o repertorio de inmunoglobulina de la línea germinal de humano como se define por Chothia and Lesk, (1987) J Mol Biol 196 910-917 La invención proporciona el uso de una estructura unica, o un conjunto de tales estructuras, que se ha encontrado que permiten la derivación de virtualmente cualquier especificidad de unión a través de variación en las regiones hipervariables solas

"Vida media" El tiempo tomado para la concentración del suero del ligando para reducirse por 50%, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación del ligando y/o despeje o secuestación del ligando por mecanismos naturales Los ligandos e la invención se estabilizan *in vivo* y su vida media se incrementa al unirse a moléculas que resisten la degradación y/o despeje o secuestación Típicamente, tales moléculas son proteínas que ocurren de manera natural que tienen por ellas mismas una vida media larga *in vivo* La vida media de un ligando se incrementa si su actividad funcional persiste, *in vivo*, por un periodo más largo que un ligando similar que no es específico para la molécula

incrementando la vida media De esta manera, un ligando específico para HSA y una molécula objetivo se compara con el mismo ligando en donde la especificidad para HSA no está presente, que no une HSA pero une otra molécula Por ejemplo, puede ser un segundo epítopo en la molécula objetivo. Típicamente, la vida media se incrementa por 10%, 20%, 30%, 40%, 50% o más Incrementos en el rango de 2x, 3x, 4x, 5x, 10x, 20x, 30x, 40x, 50x o más de la vida media son posibles Alternativamente, o además, los incrementos en el rango de hasta 30x, 40x, 50x, 60x, 70x, 80x, 90x, 100x, 150x de la vida media son posibles

"Substancialmente idéntica (o "substancialmente homóloga")
Una primer secuencia de nucleótidos o aminoácidos que contiene un numero suficiente de nucleótidos o residuos de aminoácidos idénticos o equivalentes (por ejemplo, con una cadena lateral similar, por ejemplo, substituciones de aminoácido conservadas) a una segunda secuencia de nucleótidos o aminoácidos de manera que las secuencias de nucleótidos o aminoácidos, primera y segunda, tienen actividades similares En el caso de anticuerpo, el segundo anticuerpo tiene la misma especificidad de unión y tiene al menos 50% de la afinidad de la misma

Como se refiere en la presente, el término "aproximadamente" se interpreta preferentemente por significar más o menos 20%, más preferentemente más o menos 10%, aun más preferentemente más o menos 5%, aun más preferentemente

más o menos 2%, más preferentemente más o menos 1%

Como se utiliza en la presente, los términos "baja
severidad", "severidad media", "alta severidad", o "condiciones de
muy alta severidad" describen condiciones para hibridización de
5 ácido nucleico y enjuague. Guías para realizar reacciones de
hibridización pueden encontrarse en *Current Protocols in
Molecular Biology*, John Wiley & Sons, N Y (1989), 6.3.1-6.3.6,
que se incorpora en la presente para referencia en su totalidad.
Los métodos acuosos y no acuosos se describen en esa referencia.
10 y cualquiera puede utilizarse. Las condiciones de hibridización
específicas referidas en la presente son como sigue: (1)
condiciones de hibridización de baja severidad en 6X cloruro de
sodio/citrato de sodio (SSC) a aproximadamente 45°C, seguido por
dos enjuagues en 0.2X SSC, 0.1% SDS al menos a 50°C (la
15 temperatura de los enjuagues puede incrementarse a 55°C para
condiciones de baja severidad, (2) condiciones de hibridización de
severidad media en 6X SSC a aproximadamente 45°C, seguido por
uno o más enjuagues en 0.2X SSC, 0.1% SDS a 60°C, (3)
condiciones de hibridización de alta severidad en 6X SSC a
20 aproximadamente 45°C, seguido por uno o más enjuagues 0.2X
SSC, 0.1% SDS a 65°C, y preferentemente (4) condiciones de
hibridización de muy alta severidad son 0.5M fosfato de sodio, 7%
SDS a 65°C, seguido por uno o más enjuagues a 0.2X SSC, 1%
SDS a 65°C. Condiciones de muy alta severidad (4) son las
25 condiciones preferidas y las que deben utilizarse al menos que se

especifique de otra manera

Como se refiere en la presente, el término "compite" significa que la unión de un primer epítipo a su dominio de unión de epítipo cognado se inhibe cuando un segundo epítipo se une a su dominio de unión de epítipo cognado. Por ejemplo, la unión puede inhibirse estéricamente, por ejemplo por bloqueo físico de un dominio de unión o por alteración de la estructura o ambiente de un dominio de unión de manera que su afinidad o avidez para un epítipo se reduce

10 Secuencias similares u homólogas (por ejemplo, al menos aproximadamente 70% de identidad de secuencia) a las secuencias descritas en la presente también son parte de la invención. En algunas modalidades, la identidad de secuencia al nivel de aminoácido puede ser aproximadamente 80%, 85%, 90%, 15 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alta. Al nivel de ácido nucleico, la identidad de secuencia puede ser aproximadamente 70%, 75%, 80%, 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% o más alta. Alternativamente, la identidad substancial existe cuando los segmentos de ácido 20 nucleico se hibridarán bajo condiciones de hibridización selectivas (por ejemplo, condiciones de hibridización de muy baja severidad), al complemento del filamento. Los ácidos nucleicos pueden estar presentes en células completas, en un lisato de célula, o en una forma parcialmente purificada o substancialmente 25 pura

Los cálculos de "homología" o "identidad de secuencia" o "similitud" entre dos secuencias (los términos se utilizan de manera intercambiable en la presente) se realizan como sigue

Las secuencias se alinean para propósitos de comparación óptimos (por ejemplo, espacios pueden introducirse en una o ambas de una primer y una segunda secuencia de ácidos nucleicos o aminoácidos para alineación óptima y secuencias no homólogas pueden descartarse para propósitos de comparación) En una modalidad preferida, la longitud de una secuencia de referencia alineada para propósitos de comparación es al menos 30%, preferentemente al menos 40%, más preferentemente al menos 50%, aun más preferentemente al menos 60%, y aun más preferentemente al menos 70%, 80%, 90%, 100% de la longitud de la secuencia de referencia Los nucleótidos o residuos de aminoácido en posiciones de nucleótido o posiciones de aminoácido correspondientes se comparan entonces Cuando una posición en la primer secuencia se ocupa por el mismo nucleótido o residuo de aminoácido como la posición correspondiente en la segunda secuencia, entonces las moléculas son idénticas en esa posición (como se utiliza en la presente "homología" de ácido nucleico o aminoácido es equivalente a "identidad" de ácido nucleico o aminoácido) El por ciento de identidad entre las dos secuencias es una función del número de posiciones idénticas compartidas por las secuencias, tomando en cuenta el número de espacios, y la longitud de cada espacio, que necesitan introducirse

para alineación óptima de las dos secuencias

Las alineaciones de la secuencia de nucleótidos y aminoácidos y homología, similitud o identidad, como se define en la presente se preparan preferentemente y determinan utilizando las secuencias de algoritmo BLAST 2, utilizando parámetros de falla (Tatusova, T A et al, *FEMS Microbiol Lett*, 174 187-188 (1999)) Alternativamente, ventajosamente, el algoritmo BLAST (versión 2 0) se emplea para alineación de secuencia, con parámetros establecidos a valores de falla El algoritmo BLAST se describe en detalle en el sitio web ("www") del Centro Nacional para Información de Biotecnología ("ncbi") de los Institutos Nacionales de Salud ("nih") del Gobierno de EE UU ("gov"), en el directorio "/Blast/", en el archivo "blast_help.html" Los parámetros de búsqueda se definen como sigue, y se establecen ventajosamente a los parámetros de falla definidos

BLAST (Herramienta de Búsqueda de Alineación Local Básica) es el algoritmo de búsqueda heurístico empleado por los programas blastp, blastn, blastx, tblastn, y tblastx, estos programas adscriben significado a sus descubrimientos utilizando los métodos estadísticos de Karlin and Altschul, 1990, *Proc Natl Acad Sci USA* 87(6) 2264-8 (ver el archivo "blast_help.html", como se describe arriba) con unas pocas mejoras Los programas BLAST se adecuan para búsqueda de similitud de secuencia, por ejemplo, para identificar homólogos con una secuencia de consulta Los programas generalmente no son útiles para

busqueda de motivo-estilo Para una discusión de los campos básicos en busqueda de similitud de bases de datos de secuencias, ver Altschul et al (1994)

Los cinco programas BLAST disponibles en el sitio web del
5 Centro Nacional para Información de Biotecnología realizan las siguientes tareas

"blastp" compara una secuencia de consulta de aminoácidos contra una base de datos de secuencias de proteínas,

"blastn" compara una secuencia de consulta de nucleótidos
10 contra una base de datos de secuencias de nucleótidos,

"blastx" compara los productos de traslación conceptual de seis estructuras de una secuencia de consulta de nucleótidos (ambos filamentos) contra una base de datos de secuencias de proteínas,

15 "tblastn" compara una secuencia de consulta de proteínas contra una base de datos de secuencias de nucleótidos dinámicamente trasladada en todas las seis estructuras de lectura (ambos filamentos)

"tblastx" compara las traslaciones de seis estructuras de una
20 secuencia de consulta de nucleótidos contra las traslaciones de seis estructuras de una base de datos de secuencias de nucleótidos

BLAST utiliza los siguientes parámetros de busqueda

HISTOGRAMA Despliega un histograma de puntuaciones
25 para cada busqueda, falla es sí (Ver parámetro H en el Manual

BLAST)

DESCRIPCIONES Restringe el numero de descripciones cortas de secuencias de acoplamiento reportadas para el numero especificado, límite de falla es 100 descripciones (Ver parámetro

5 V en la página del manual) Ver también ESPERA y CORTE

ALINEACIONES Restringe las secuencias de las bases de datos al numero especificado para el cual los pares de segmento de alta puntuación (HSPs) se reportan, el límite de falla es 50 Si más secuencias de bases de datos que este pasan para satisfacer el umbral de significado estadístico para reportar (ver ESPERA y CORTE abajo), solamente los acoplamientos que adscriben el mayor significado estadístico se reportan (Ver parámetro B en el Manual BLAST)

ESPERA El umbral de significado estadístico para reportar acoplamientos contra secuencias de bases de datos, el valor de falla es 10, de manera que 10 acoplamientos se esperan encontrar meramente por suerte, de acuerdo al modelo estocástico de Karlin and Altschul (1990) Si el significado estadístico adscrito a un acoplamiento es mayor que el umbral de ESPERA, el acoplamiento no se reportará Los umbrales de ESPERA bajos son más severos, conduciendo a pocos acoplamientos por suerte reportándose Los valores de fracción son aceptables (Ver parámetro E en el Manual BLAST)

CORTE puntuación de Corte para reportar pares de segmento de alta puntuación El valor de falla se calcula del valor

ESPERA (ver arriba) HSPs se reporta para una secuencia de base de datos solamente si el significado estadístico adscrito a ellos es al menos tan alto como sería adscrito a HSP solo teniendo una puntuación igual al valor de CORTE Los valores de CORTE
5 altos son más severos, conduciendo a pocos acoplamientos por suerte reportándose (Ver parámetro S en el Manual BLAST) Típicamente, los umbrales de significado pueden manejarse de manera más intuitiva utilizando ESPERA

MATRIZ Especificar una matriz de puntuación alterna para
10 BLASTP, BLASTX, TBLASTN y TBLASTX La matriz de falla es BLOSUM62 (Henikoff & Henikoff, 1992, Proc Natl Acad Sci USA 89(22) 10915-9) Las elecciones alternativas válidas incluyen PAM40, PAM120, PAM250 e IDENTIDAD Ninguna matriz de puntuación alterna está disponible para BLASTN, especificar la
15 **MATRIZ** directiva en solicitudes BLASTN regresa una respuesta de error

FILAMENTO Restringir una búsqueda TBLASTN a solo el filamento superior o inferior de las secuencias de bases de datos o restringir una búsqueda BLASTN, BLASTX o TBLASTX a solo las
20 estructuras de lectura en el filamento superior o inferior de la secuencia de consulta

FILTRO Ocultar segmentos de la secuencia de consulta que tienen baja complejidad de composición, como se determina por el programa SEG de Wootton & Federhen (1993) Computers and
25 Chemistry 17 149-163, o segmentos consistiendo de repeticiones

internas de corta periodicidad, como se determina por el programa XNU de Claverie & States, 1993, Computers and Chemistry 17 191-201, o, para BLASTN, por el programa DUST de Tatusov and Lipman (ver el sitio web de NCBI) La filtración puede eliminar
5 reportes estadísticamente significativos pero biológicamente no interesantes de la salida blast (por ejemplo, golpes contra regiones comunes ácidas, básicas o ricas en prolina), conduciendo a las regiones más biológicamente interesantes de la secuencia de consulta disponible para acoplamiento específico contra
10 secuencias de bases de datos

Secuencia de baja complejidad encontrada por un programa de filtro se sustituye utilizando la letra "N" en secuencia de nucleótidos (por ejemplo, "N" repetida 13 veces) y la letra "X" en secuencias de proteínas (por ejemplo, "X" repetida 9 veces)

15 La filtración solamente se aplica a la secuencia de consulta (o sus productos de traslación), ninguna secuencia de bases de datos La filtración de falla es DUST para BLASTN, SEG para otros programas

No es inusual que todos se oculten por SEG, XNU, o ambos,
20 cuando se aplican a secuencias en SWISS-PROT, de manera que la filtración no debe esperarse que siempre produzca un efecto Además, en algunos casos, las secuencias se ocultan en su totalidad, indicando que el significado estadístico de cualquier acoplamiento reportado contra la secuencia de consulta sin filtrar
25 debe esperarse Causas NCBI-gi identificadores NCBI gi se

muestran en la salida, además del acceso y/o número de lugar. Más preferentemente, las comparaciones de secuencias se conducen utilizando el algoritmo de búsqueda BLAST simple proporcionado en el sitio web NCBI descrito arriba, en el directorio

5 "/BLAST"

Al menos que se defina de otra manera, todos los términos técnicos y científicos utilizados en la presente tienen el mismo significado como se entiende comúnmente por alguien de experiencia ordinaria en la materia (por ejemplo, en cultivo celular
10 genéticas moleculares, química de ácido nucleico, técnicas de hibridización y bioquímica). Las técnicas estándar se utilizan para métodos moleculares, genéticos y bioquímicos (ver generalmente, Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, 2d ed (1989) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor,
15 N Y y Ausubel *et al.*, *Short Protocols in Molecular Biology* (1999) 4th Ed, John Wiley & Sons, Inc que se incorpora en la presente para referencia) y métodos químicos.

La invención se refiere a ligandos que comprenden una porción de unión que tiene especificidad de unión para un
20 compuesto objetivo endógeno deseado, a tales ligandos para uso en terapia y al uso de tales ligandos para la fabricación de un medicamento y a métodos terapéuticos que comprenden administrar tales ligandos.

Se ha descubierto que los agentes que unen compuestos
25 objetivo endógenos solubles pero no alteran substancialmente la

actividad de tales compuestos, tales como anticuerpos y fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂, fragmento Fv (por ejemplo, scFv, Fv unido a disulfuro), dAb, diacuerpo), pueden utilizarse para alterar ciertas

5 propiedades del compuesto objetivo endógeno, y así hacer el compuesto objetivo endógeno más efectivo para tratar, suprimir o mitigar una enfermedad, o para propósitos de diagnóstico De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere a ligandos, como se describe en la presente, que unen un compuesto objetivo

10 endógeno soluble pero no inhibe substancialmente la actividad del compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, no unen el sitio activo del compuesto objetivo endógeno), pero que son útiles para alterar ciertas propiedades de los compuestos objetivo endógenos Por ejemplo, un ligando que comprende una porción de unión que tiene

15 especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede unir el compuesto objetivo endógeno, incrementando así el tamaño hidrodinámico del compuesto objetivo endógeno e incrementando la vida media en suero del compuesto objetivo endógeno Benéficamente, el compuesto objetivo

20 endógeno retiene su actividad biológica cuando se une por el ligando (por ejemplo, es activo en un complejo consistiendo de ligando y compuesto objetivo endógeno), y puede producir efectos benéficos para propósitos terapéuticos y/o de diagnóstico

El ligando, como se describe en la presente, puede

25 incrementar la vida media en suero de un compuesto objetivo

endógeno al, por ejemplo, reducir la velocidad de despeje del compuesto objetivo endógeno. En tal situación, la cantidad de compuesto objetivo endógeno en un sujeto (por ejemplo, en la circulación sistémica) puede aumentar a una cantidad que es mayor que la cantidad normalmente presente en un sujeto, y la cantidad incrementada de ligando objetivo endógeno puede producir efectos terapéuticos benéficos que no se producen por cantidades inferiores o normales de compuesto objetivo endógeno.

Un ligando que comprende una porción de unión que tiene especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede unir el compuesto objetivo endógeno e incrementar la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno independiente de cualquier cambio en la vida media *in vivo* del compuesto objetivo endógeno, o de cualquier cambio en la cantidad del compuesto objetivo endógeno en un sujeto. Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno que tiene actividad benéfica en la circulación sistémica pero se distribuye rápidamente en los tejidos o despeja (por ejemplo, un esteroide u hormona de péptido), y disminuye la velocidad de distribución o despeje. Tal ligando puede incrementar la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la circulación sistémica donde la actividad del compuesto objetivo endógeno puede tener un efecto benéfico (por ejemplo, terapéutico).

Un ligando que comprende una porción de unión que tiene

especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede unir el compuesto objetivo endógeno e incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) del compuesto objetivo endógeno. Por ejemplo, un ligando puede unir un
5 compuesto objetivo endógeno tales como un agonista endógeno (por ejemplo, una citoquina) o un receptor de citoquina soluble y mejorar la actividad de unión del compuesto objetivo endógeno al incrementar la afinidad y/o avidéz del compuesto objetivo endógeno para su compañero de unión endógeno. Por ejemplo, un
10 ligando que comprende dos o más porciones que tienen sitios de unión con especificidad de unión para una citoquina deseada puede unir dos o más moléculas de citoquina individuales produciendo así un dímero de citoquina, trimero, oligómero o multímero. Tal un dímero, trimero, oligómero o multímero tendrá
15 una actividad de unión mejorada hacia, por ejemplo, una célula que expresa el receptor para la citoquina debido a avidéz más alta. De manera similar, la actividad de unión de receptores solubles (por ejemplo, TNFR1 soluble) puede incrementarse por un ligando que comprende dos o más sitios de unión para TNFR1
20 soluble. Tal un ligando puede, por ejemplo, unir dos cadenas de TNFR1 solubles formando un dímero de TNFR1 soluble que unirá TNF trimérico con avidéz más alta que una cadena de TNFR1 única.

Los ligandos descritos en la presente pueden administrarse
25 sistémicamente, por ejemplo, para unir ligandos objetivo

endógenos en la circulación sistémica y producir efectos benéficos en la circulación sistémica. Adicionalmente, los ligandos pueden administrarse localmente (por ejemplo, por inyección subcutánea, inyección intramuscular, inyección intrarticular, inyección intradérmica, inhalación, y lo similar) y mejorar así la biodisponibilidad local de un compuesto objetivo endógeno o para incrementar la cantidad de compuesto objetivo endógeno al sitio donde el ligando se administra localmente. Por ejemplo, una formulación de depósito de un ligando puede administrarse localmente por inyección subcutánea, y el ligando administrado puede reclutar ligando objetivo endógeno al sitio del depósito y unir el ligando objetivo endógeno para mejorar biodisponibilidad local o para producir una cantidad localmente alta de ligando objetivo endógeno. Tal planteamiento es ventajoso, por ejemplo, para promover la curación de la herida, o para inhibir reacciones inflamatorias locales (por ejemplo, en la piel, en el pulmón, en una articulación).

La invención proporciona varias ventajas sobre agentes terapéuticos convencionales y planteamientos. Por ejemplo, los ligandos descritos en la presente son generalmente polipéptidos pequeños que pueden producirse de manera económica y en grandes cantidades utilizando sistemas de expresión de levadura o bacteriales, en lugar de sistemas de expresión de mamífero más costosos que producen producciones inferiores. Además, los ligandos descritos en la presente se administran para aprovechar y

explotar las actividades benéficas de los compuestos (por ejemplo, proteínas) que son endógenos al paciente, y generalmente el ligando se compone de dominios de proteína (por ejemplo, dAb) que son del mismo origen como el paciente (por ejemplo, origen humano) y por lo tanto son substancialmente no inmunogénicos. Ventajosamente, esto reduce significativamente o elimina el riesgo de que el paciente producirá anticuerpos neutralizantes de alta afinidad contra el ligando, complejo ligando-compuesto objetivo endógeno o compuesto objetivo endógeno. Esto es una ventaja distinta sobre planteamientos terapéuticos que comprenden administrar compuestos exógenos, o aun proteínas endógenas recombinantemente producidas, que inducen frecuentemente la producción de anticuerpos de alta afinidad en el paciente que pueden restringir o eliminar la eficacia del agente terapéutico.

15 Ligandos que Unen un Compuesto Objetivo Endógeno

La invención se refiere a ligandos que comprenden una porción (por ejemplo, dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno pero no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno. Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo de un compuesto objetivo endógeno.

Los ligandos descritos en la presente no inhiben substancialmente la actividad de los compuestos objetivo endógenos a los cuales se unen, y el compuesto objetivo endógeno permanece activo cuando se une por el ligando. Por

ejemplo, un receptor soluble se une por un ligando de la invención, y el receptor soluble en el complejo receptor-ligando resultante puede unir el ligando endógeno del receptor soluble. En otro ejemplo, una enzima se une por un ligando de la invención, y la enzima en el complejo enzima-ligando resultante puede unir
5 substrato y catalizar la reacción enzimática.

Generalmente, el ligando inhibe la actividad del compuesto objetivo endógeno al cual se une por no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de
10 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 tiene substancialmente efecto inhibitor en la actividad del compuesto
15 objetivo endógeno. En algunos ejemplos, un ligando que no inhibe substancialmente la actividad de un compuesto objetivo endógeno al cual se une, inhibe esa actividad de dicho compuesto objetivo endógeno con una concentración inhibidora alta 50 (IC₅₀), tal como una IC₅₀ de al menos 1 nanomolar, al menos 10
20 nanomolares, al menos 100 nanomolares, al menos 1 micromolar, o al menos 10 micromolares.

La habilidad de un ligando para inhibir la actividad del compuesto objetivo endógeno puede valorarse utilizando cualquier ensayo *in vitro* o *in vivo*. Muchos ensayos adecuados se conocen
25 bien en la materia y utilizan de manera rutinaria para valorar la

actividad inhibidora de los *compuestos* Por ejemplo, la habilidad de ligandos que comprenden una porción que tiene un sitio de unión para TNFR1 para inhibir la actividad o TNFR1 puede valorarse utilizando modelos de choque de endotoxina *in vivo* o
5 necrosis de piel inducida por TNF (ver, Sheehan *et al* , J Exp Med , 181 607-611 (1995)), y/o el ensayo de unión del receptor *in vitro*, ensayo de citotoxicidad L929, ensayo IL-8 HeLa, o ensayo de liberación IL-8 MRC-5 descrito en la presente Otros ensayos adecuados para valorar si un ligando inhibe la actividad de un
10 compuesto objetivo endógeno deseado, tales como aquellos descritos en la presente, se conocen bien en la materia

Los ligandos *per se* generalmente no tienen actividad terapéutica substancial pero se utilizan para aprovechar y explotar la actividad de compuestos objetivo endógenos para propósitos de
15 diagnóstico y terapéuticos En algunas modalidades, los ligandos no tienen actividad substancial en un ensayo *in vitro* adecuado para la actividad de un compuesto objetivo endógeno Por ejemplo, un ligando que une un compuesto objetivo endógeno e incrementa la vida media del compuesto objetivo endógeno
20 generalmente no alterará la actividad de un compuesto objetivo endógeno en el ensayo en comparación con la actividad del compuesto objetivo endógeno en el mismo ensayo pero sin ligando

Ligandos (por ejemplo, dAbs) que une un compuesto objetivo
25 endógeno deseado, tales como una proteína receptora, un

agonista soluble (por ejemplo, una citoquina), o una enzima, pero no unen el sitio activo del compuesto objetivo endógeno pueden identificarse utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, ligandos individuales, o porciones que tienen un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno o colecciones de tales porciones (por ejemplo, una biblioteca o repertorio) pueden seleccionarse en un ensayo de competición adecuado en el cual la unión de un compañero de unión endógeno (por ejemplo, ligando natural, substrato, cofactor) al compuesto objetivo endógeno se valora en la presencia del ligando o porción (o colección de ligandos o porciones) seleccionándose. Ninguna reducción substancial (por ejemplo, inhibición) en unión del compañero de unión endógeno al compuesto objetivo endógeno en relación a un control adecuado indica que el ligando o porción seleccionándose no une el sitio activo del compuesto objetivo endógeno.

Muchos ensayos adecuados para seleccionar ligandos y porciones que comprenden un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno, tales como enzimas, receptores (por ejemplo, receptores de citoquina, receptores de factor de crecimiento), y agonistas solubles (por ejemplo, citoquinas quimoquinas, factores de crecimiento, hormonas) se conocen bien en la materia. Adicionalmente, los ensayos de competición se utilizan de manera rutinaria para seleccionar colecciones de compuestos que contienen 10^6 a 10^9 o más miembros. De esta manera, tal actividad de selección está dentro de la experiencia ordinaria en la

materia y no se considera problemática o indebida por aquellos en la materia. Por ejemplo, los dominios variables descritos en WO 03002609, WO 2004101790, WO 2005035572, WO 2004061026, WO 2004003019, WO 2004058821, WO 9404678, WO 9749805, 5 WO 9923221, WO 9937681, WO 0024884, WO 0043507, WO 0065067, WO 0140310, WO 03035694, WO 03053531, WO 03054015, WO 0305527, WO 2004015425, WO 2004041862, WO 2004041863, WO 2004041865, WO 2004062551, WO 2005044858 y EP1134231 pueden seleccionarse por la habilidad para unir un 10 compuesto objetivo endógeno deseado sin unión al sitio activo en un ensayo de competición adecuado. La descripción de los dominios variables, sus secuencias y métodos de producción y selección en los documentos anteriores se incorporan de manera explícita para referencia en la presente para proporcionar la 15 dirección experta con ejemplos de porciones que tienen un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para uso en la invención.

Los ligandos pueden incrementar la vida media de los objetivos a los cuales se unen, incrementar la cantidad de 20 objetivos endógenos a los cuales se unen en un sujeto (por ejemplo, la cantidad sistémica, la cantidad en un sitio o ubicación deseada), y/o incrementar la biodisponibilidad de los objetivos endógenos a los cuales se unen.

Un ligando puede incrementar la vida media de un 25 compuesto objetivo endógeno al cual se une al, por ejemplo, unir

el compuesto objetivo endógeno e incrementar así el tamaño hidrodinámico del compuesto objetivo endógeno, al unir y estabilizar el compuesto objetivo endógeno, o al unir y disminuir la velocidad de despeje o metabolismo del compuesto objetivo endógeno. Generalmente, el ligando incrementará la vida media del compuesto objetivo endógeno al cual se une por un factor de al menos aproximadamente 1.5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10, en relación a la vida media del compuesto objetivo endógeno en la ausencia de ligando. Por ejemplo, un compuesto objetivo endógeno puede tener una vida media de aproximadamente 1 hora, y después de la administración de un ligando que comprende una porción con un sitio de unión que une dicho compuesto objetivo endógeno, la vida media del compuesto objetivo endógeno puede incrementarse a aproximadamente 1.5 horas, a aproximadamente 10 horas, o más tiempo.

El nivel o cantidad de compuesto objetivo endógeno puede aumentar después de la administración de un ligando, como se describe en la presente, debido al efecto que incrementa la vida media de los ligandos. Por ejemplo, el nivel o cantidad de ligando objetivo endógeno (por ejemplo, en suero) 1 hora, o 2 horas, o 3 horas, o 4 horas, o 5 horas, o 6 horas, o 7 horas, o 8 horas, o 9

horas, o 10 horas, u 11 horas, o 12 horas, o 1 día después de la administración de un ligando de la invención puede incrementarse por un factor de al menos aproximadamente 1.5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 500, al menos aproximadamente 1,000, al menos aproximadamente 5,000, al menos aproximadamente 10,000, al menos aproximadamente 50,000, o al menos aproximadamente 100,000. El incremento de los niveles o cantidades de un compuesto objetivo endógeno pueden detectarse fácilmente utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, una muestra adecuada (por ejemplo, suero) puede obtenerse antes de la administración del ligando y en uno o más puntos de tiempo después de la administración, y el nivel o cantidad de compuesto objetivo endógeno en las muestras puede determinarse utilizando cualquier método adecuado. La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, suero, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, lavado broncoalveolar, enema o una biopsia. En algunas modalidades, la cantidad o nivel de ligando en tal una muestra se incrementa, en relación a la cantidad o nivel antes de que el ligando se administre.

Los ligandos pueden incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno. La biodisponibilidad puede incrementarse sistémicamente, o en un sitio de acción deseado.

(por ejemplo, en un sitio donde el ligando se administra localmente) Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno que tiene actividad benéfica en la circulación sistémica pero se distribuye rápidamente en los tejidos o se despeja (por ejemplo, un esteroide u hormona de péptido), y disminuye la velocidad de distribución o despeje. Tal ligando puede incrementar biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la circulación sistémica donde la actividad del compuesto objetivo endógeno puede tener un efecto benéfico (por ejemplo, terapéutico). Un ligando puede incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno en un sitio deseado al reclutar el compuesto objetivo endógeno a ese sitio. Por ejemplo, un ligando comprendiendo un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede administrarse localmente a un paciente (por ejemplo, como una formulación de depósito). El ligando localmente administrado puede unir el compuesto objetivo endógeno deseado, y reclutar compuesto objetivo endógeno adicional al sitio. De esta manera, un nivel o cantidad incrementada de compuesto objetivo endógeno puede estar presente en el sitio para producir efectos benéficos. Por ejemplo, en una modalidad, el ligando comprende una porción con un sitio de unión para isoforma de TGF beta 3. Tal un ligando puede administrarse localmente para unir isoforma de TGF beta 3 y reclutar la isoforma de TGF beta 3 al sitio de administración local, y de esta manera promover la curación de la herida.

Ligandos similares que comprenden una porción con un sitio de unión para un objetivo de superficie celular deseado pueden prepararse utilizando los métodos descritos en la presente y se utilizan, por ejemplo, para reclutar un tipo celular deseado a un sitio deseado (por ejemplo, un sitio de lesión, sitio de inflamación)

Generalmente, el ligando incrementará la biodisponibilidad (por ejemplo, en la circulación sistémica, en un sitio deseado de acción) del compuesto objetivo endógeno al cual se une por un factor de al menos aproximadamente 1.5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10, en relación a la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la ausencia de ligando. Por ejemplo cuando el ligando incrementa la biodisponibilidad en la circulación sistémica, una curva de tiempo de concentración para el ligando endógeno iniciando en el tiempo de administración del ligando puede prepararse, y compararse con los niveles sistémicos normales del ligando objetivo endógeno para determinar el grado de incremento en biodisponibilidad sistémica.

Los ligandos pueden incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) de los objetivos endógenos a los cuales se unen. Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno tal como un agonista endógeno (por ejemplo, una

citoquina) o un receptor de citoquina soluble y mejorar la actividad de unión del compuesto objetivo endógeno al incrementar la afinidad y/o avidéz del compuesto objetivo endógeno para su compañero de unión endógeno. Ligandos que comprenden dos o más porciones que tienen sitios de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado pueden unir dos o más moléculas de compuesto objetivo endógeno individuales produciendo así un dímero, trímero, oligómero o multímero de compuesto objetivo endógeno. Tal un dímero, trímero, oligómero o multímero tendrán actividad de unión mejorada hacia, por ejemplo, una célula que expresa el compañero de unión natural para el compuesto objetivo endógeno debido a avidéz más alta. Generalmente, tal un ligando puede mejorar la actividad de unión del compuesto objetivo endógeno. Por ejemplo, la intensidad de unión (por ejemplo, afinidad o avidéz) de un dímero, trímero, oligómero o multímero de compuesto objetivo endógeno para su compañero de unión puede ser al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1000 o al menos aproximadamente 10,000 veces más fuerte que la intensidad de unión del compuesto objetivo endógeno como un monómero (es decir, no en un complejo con un ligando de la invención).

En un ejemplo, el ligando comprende dos o más porciones que tienen sitios de unión con especificidad de unión para un agonista endógeno deseado (por ejemplo, una citoquina, un factor

de crecimiento) y una o más moléculas agonistas endógenas produciendo así un dímero, trímero, oligómero o multímero de agonista endógeno. Tal un dímero, trímero, oligómero o multímero tendrá actividad de unión mejorada hacia, por ejemplo, una célula
5 que expresa el receptor para el agonista endógeno debido a una avidencia más alta, y puede tener eficacia terapéutica mejorada. De manera similar, la actividad de unión de un receptor soluble (por ejemplo, TNFR1 soluble) puede incrementarse por un ligando que comprende dos o más sitios de unión para el receptor soluble. Tal
10 un ligando puede, por ejemplo, unir dos cadenas de receptor soluble formando un dímero de receptor soluble que unirá el ligando endógeno del receptor con una avidencia más alta que una cadena de receptor única.

En una modalidad específica, el ligando comprende dos o
15 más porciones (dAbs) que tienen especificidad de unión para TNFR1 soluble pero no une el sitio activo (el sitio activo de TNFR1 soluble se contiene dentro de Dominios 2 y 3). Tal un ligando puede unir dos o más cadenas de TNFR1 soluble para formar un dímero, trímero, oligómero o multímero de TNFR1 soluble, que
20 tiene actividad de unión mejorada hacia su ligando trimérico TNF, debido a una avidencia incrementada. También debe apreciarse que la vida media de tal dímero, trímero, oligómero o multímero de TNFR1 soluble, que tiene un tamaño hidrodinámico más grande que una cadena de TNFR1 soluble único, también puede
25 extenderse en relación a un TNFR1 único. Como un resultado, tal

un ligando puede mejorar la actividad de unión a TNF de TNFR1 soluble y mejorar su eficacia terapéutica. Por ejemplo, tal un ligando puede mejorar la eficacia de TNFR1 soluble por un factor de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1,000 o al menos aproximadamente 10,000.

En un ejemplo de esta modalidad, un ligando que es un dímero de un dAb que une Dominio 1 de TNFR1 de ratón se utiliza para demostrar que ligandos que inducen dimerización de TNFR1 soluble mejoran la eficacia de TNFR1 soluble. Por ejemplo, tal un ligando puede agregarse a un ensayo conteniendo células MRC5 de humano, TNF de humano y TNFR1 de ratón soluble. TNFR1 de ratón soluble competirá con TNFR1 de humano en las células MRC5 para unión a TNF de humano. El ligando que es un dímero de un dAb que une Dominio 1 de TNFR1 de ratón une dos cadenas de TNFR1 de ratón soluble para formar un dímero de TNFR1 de ratón que será más efectivo para inhibir los efectos de TNF en el ensayo. Por ejemplo, la IC₅₀ para TNFR1 de ratón puede reducirse del rango nanomolar al rango picomolar (aproximadamente 10 o aproximadamente 100 o aproximadamente 1000 veces de reducción) por la adición del ligando que induce la dimerización de TNFR1 soluble.

Administración de ligandos que induce dimerización (o trimerización u oligomerización) de cadenas de receptor soluble a pacientes puede causar el agrupamiento y activación de formas de

transmembrana de ciertos receptores que se expresan en la superficie celular. Generalmente, cualquier efecto no deseado de tal activación (por ejemplo, activación de células inmunes) será mínimo en comparación con la función de unión mejorada y eficacia del receptor soluble dimerizado. Sin embargo, si se desea, la interacción de un ligando de dimerización, trimerización u oligomerización con la forma de transmembrana de un receptor puede reducirse además al formar el ligando para incrementar su tamaño hidrodinámico como se describe en la presente. Por ejemplo, el ligando puede formarse para incluir una porción PEG u otra porción que extiende la vida media, tal como una porción que tiene un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* (por ejemplo, un dAb que une albumina de suero). Como se muestra en la presente utilizando dAbs que unen TNFR1, PEGilación de dAbs redujo dramáticamente la habilidad de dAb para inhibir la actividad de TNFR1 en un ensayo a base de célula, pero no tuvo casi efecto en la habilidad de dAbs para unir TNFR1 en un ensayo de unión al receptor que aproxima las condiciones para unión a TNFR1 soluble *in vivo*. Estos resultados indican que dAbs de PEGilación y ligandos que comprenden dos o más dAbs mejora la selectividad de dAbs para receptor soluble sobre la forma de transmembrana del receptor.

Algunos compuestos objetivo endógenos naturalmente se unen juntos para formar dímeros, trímeros o multímeros activos. De esta manera, la porción que tiene un sitio de unión para un

compuesto objetivo endógeno puede ser el compuesto objetivo endógeno por si mismos de un fragmento o porción del compuesto objetivo endógeno En algunas modalidades, tales como cuando la porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es el compuesto objetivo endógeno, el ligando puede tener la actividad del compuesto objetivo endógeno De acuerdo con lo anterior, la administración de tal un ligando puede, como se describe en la presente, incrementar la vida media, incrementar la biodisponibilidad, incrementar la cantidad y/o incrementar la actividad del compuesto objetivo endógeno, y también proporcionará actividad adicional del compuesto objetivo endógeno debido a la presencia de una forma biológicamente activa del compuesto objetivo endógeno en el ligando

En otras modalidades, el ligando puede comprender una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno que es una porción del compuesto objetivo endógeno Por ejemplo, la porción del compuesto objetivo endógeno puede ser una porción que se une al compuesto objetivo endógeno *in vivo*, pero no tiene la actividad (por ejemplo, actividad de unión de ligando, actividad de unión de receptor, actividad catalítica) del compuesto objetivo endógeno

Ejemplos de compuestos objetivo endógenos que forman naturalmente dímeros, trímeros o multímeros incluyen, por ejemplo, factores de crecimiento (por ejemplo, PDGF que forma homodímeros y heterodímeros de cadenas A y B), citoquinas (por

ejemplo, citoquinas de la superfamilia TNF (por ejemplo, RANK-L) que forma trímeros), y receptores (por ejemplo, receptor de la superfamilia de receptor TNF que forma trímeros) Porciones adecuados de tales compuestos objetivo endógenos pueden prepararse fácilmente en base al conocimiento de la estructura de los dominios formadores de dímero, trimero o multímero de los compuestos objetivo endógenos, o al preparar fragmentos de péptido o polipéptido del compuesto objetivo endógeno y analizar los péptidos o polipéptidos para la habilidad para unir el compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, utilizando resonancia de plasmón de superficie o cualquier otro método adecuado)

Ilustrativos de las porciones de compuestos objetivo endógenos que unen el compuesto objetivo endógeno correspondiente *in vivo* son los así llamados dominios de ensamble de pre-ligando (PLAD) de miembros de la superfamilia del receptor TNF (Ver, por ejemplo, WO 01/58953, Publicación de Solicitud de Patente de EE UU No 2003/0108992 A1, Deng et al, Nature Medicine, doi 10.1038/nml304 (2005)) Dominios PLAD de un receptor particular se unen entre sí *in vivo* Por ejemplo, el dominio PLAD de TNFR1 se unirá a otro dominio PLAD de TNFR1 *in vivo*

La superfamilia de receptor TNF es un grupo de proteínas reconocido en la materia que incluye TNFR1 (p55, CD120a, p60, miembro de la superfamilia de receptor TNF 1A, TNFRSF1A) TNFR2 (p75, p80, CD120b, miembro de la superfamilia de receptor

TNF 1B, TNFRSF1B), CD (TNFRSF3, LT β R TNFR2-RP, TNFR-RP, TNFCR, TNF-R-III), OX40 (TNFRSF4, ACT35, TXGPIL), CD40 (TNFRSF5, p50, Bp50), Fas (CD95 TNFRSF6, APO-I, APTI), DcR3 (TNFRSF6B), CD27 (TNFRSF7, Tp55, S152), CD30 (TNFRSF8, Ki-
 5 1, D1S166E), CD137 (TNFRSF9, 4-1BB, ILA), TRAILR-1 (TNFRSF10A, DR4, Apo2), TRAIL-R2 (TNFRSF10B, DR5, KILLER, TRICK2A, TRICKB), TRAILR3 (TNFRSF10C, DcRI , LIT, TRID), TRAILR4 (TNFRSF10D, DcR2, TRUNDD), RANK (TNFRSF11A), OPG (TNFRSF11B, OCIF, TRI), DR3 (TNFRSF12, TRAMP, WSL-1,
 10 LARD, WSL-LR, DDR3, TR3, APO-3), DR3L (TNFRSF12L), TACI (TNFRSF13B), BAFFR (TNFRSF13C), HVEM (TNFRSF14, ATAR, TR2, LIGHTR, HVEA), NGFR (TNFRSF16), BCMA (TNFRSF17 BCM), AITR (TNFRSF18, GITR), TNFRSF19, FLJ14993 (TNFRSF19L, RELT), DR6 (TNFRSF21), SOBa (TNFRSF22,
 15 Tnfrh2, 2810028K06Rik), mSOB (THFRSF23, Tnfrh1)

Varios dominios PLAD se conocen en la materia y otros dominios PLAD y variantes de dominios PLAD pueden aislarse fácilmente y prepararse utilizando cualquier método adecuado, tales como los métodos descritos en WO 01/58953, Publicación de
 20 Solicitud de Patente de EE UU No 2003/0108992 A1, Deng *et al*, *Nature Medicine*, doi 10 1038/nml304 (2005) Muchos métodos adecuados para preparar polipéptidos, fragmentos de proteína, y variantes de péptido, así como también ensayos de unión adecuados, tal como el ensayo de unión de receptor TNFR1
 25 descrito en la presente se conocen bien y son convencionales en

la materia Dominios PLAD ejemplificativos se presentan en la
Tabla 1

Tabla 1

	Receptor	Dominio PLAD
5	TNFR1	Cys Pro Gln Gly Lys Tyr Ile His Pro Gln Asn Asn Ser Ile Cys Cys Thr Lys Cys His Lys Gly Thr Tyr Leu Tyr Asn Asp Cys Pro Gly Pro Gly Gln Asp Thr Asp Cys (SEQ ID NO 28)
	TNFR2	Cys Arg Leu Arg Glu Tyr Tyr Asp Gln Thr Ala Gln Met Cys Cys Ser Lys Cys Ser Pro Gly Gln His Ala Lys Val Phe Cys Thr Lys Thr Ser Asp Thr Val Cys (SEQ ID NO 29)
10	FAS	Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys (SEQ ID NO 30)
	FAS	Arg Leu Ser Ser Lys Ser Val Asn Ala Gln Val Thr Asp Ile Asn Ser Lys Gly Leu Glu Leu Arg Lys Thr Val Thr Thr Val Glu Thr Gln Asn Leu Glu Gly Leu His His Asp Gly Gln Phe Cys His Lys Pro Cys Pro Pro Gly Glu Arg Lys Ala Arg Asp Cys Thr Val Asn Gly Asp (SEQ ID NO 31)
15	LTBR	Cys Arg Asp Gln Glu Lys Glu Tyr Tyr Glu Pro Gln His Arg Ile Cys Cys Ser Arg Cys Pro Pro Gly Thr Tyr Val Ser Ala Lys Cys Ser Arg Ile Arg Asp Thr Val Cys (SEQ ID NO 32)
	CD40	Cys Arg Glu Lys Gln Tyr Leu Ile Asn Ser Gln Cys Cys Ser Leu Cys Gln Pro Gly Gln Lys Leu Val Ser Asp Cys Thr Glu Phe Thr Glu Thr Glu Cys (SEQ ID NO 33)
20	CD30	Cys His Gly Asn Pro Ser His Tyr Tyr Asp Lys Ala Val Arg Arg Cys Cys Tyr Arg Cys Pro Met Gly Leu Phe Pro Thr Gln Gln Cys Pro Gln Arg Pro Thr Asp Cys Arg Lys Gln Cys (SEQ ID NO 34)
	CD27	Trp Trp Leu Cys Val Leu Gly Thr Leu Val Gly Leu Ser Ala Thr Pro Ala Pro Lys Ser Cys Pro Glu Arg His Tyr Trp Ala Gln Gly Lys Leu Cys Cys Gln Met (SEQ ID NO 35)
25	HVEM	Cys Lys Glu Asp Glu Tyr Pro Val Gly Ser Glu Cys Cys Pro Lys Cys Ser Pro Gly Tyr Arg Val Lys Glu Ala Cys Gly Glu Leu Thr Gly Thr Val Cys (SEQ ID NO 36)
	OX40	Val Gly Ala Arg Arg Leu Gly Arg Gly Pro Cys Ala Ala Leu Leu Leu Leu Gly Leu Gly Leu Ser Thr Val Thr Gly Leu His Cys Val Gly Asp Thr Tyr (SEQ ID NO 37)
	DR4	Ala Thr Ile Lys Leu His Asp Gln Ser Ile Gly Thr Gln Gln Trp Glu His Ser Pro Leu Gly Glu Leu Cys Pro Pro Gly Ser His Arg (SEQ ID NO 38)

En algunas modalidades, el ligando comprende una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno que es PLAD, tal como PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40 DR4 u otro miembro de la superfamilia de receptor TNF, o una variante de un Dominio PLAD. La variante de un dominio PLAD puede, por ejemplo, ser un dominio PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40, o DR4, en donde uno o más aminoácidos se han eliminado, insertado o sustituido, pero que retiene la habilidad de unirse a PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40, o DR4 correspondiente. La secuencia de aminoácidos de un dominio PLAD variante puede comprender una región de al menos aproximadamente 10 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 15 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 20 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 25 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 30 aminoácidos contiguos, al menos aproximadamente 35 aminoácidos contiguos, o al menos aproximadamente 40 aminoácidos contiguos que son los mismos que los aminoácidos en la secuencia de aminoácidos de PLAD correspondiente (por ejemplo, PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40, DR4). Además, o alternativamente, la secuencia de aminoácidos de un dominio PLAD variante puede ser al menos aproximadamente 80%, al menos aproximadamente 85%,

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%,
5 al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente
99% idéntica a la secuencia de aminoácidos de PLAD
correspondiente (por ejemplo, PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT
 β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40, o DR4)

Ligandos que comprenden una porción de unión que tiene un
10 sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno que es PLAD
o variante de PLAD, pueden formatearse como se describe en la
presente. Por ejemplo el ligando puede ser un dímero, trímero o
multímero de PLAD o variante de PLAD, o una proteína de fusión
comprendiendo PLAD o variante de PLAD y una porción que
15 extiende la vida media (por ejemplo, una porción que tiene un sitio
de unión para albumina de suero o receptor Fc neonatal)

Ligandos que comprenden dos o más PLAD o variantes de
PLAD (por ejemplo, dímeros, trímeros, multímeros de PLAD)
pueden unir dos o más cadenas de receptor soluble para formar
20 dímeros de receptor soluble, trímeros o multímeros que, como se
describe en la presente, pueden tener función de unión mejorada
en comparación con los monómeros de receptor soluble. En
algunas circunstancias, tal un ligando puede unir receptor soluble
y también unir la forma de transmembrana del receptor expresado
25 en la superficie celular. Si se desea, la selectividad para receptor

soluble de unión puede mejorarse al formatear el ligando para tener un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo utilizando una porción PEG, u otra porción que extiende la vida media como se describe en la presente

5 En modalidades particulares, el ligando comprende PLAD (por ejemplo, PLAD de TNFR1, TNFR2, FAS, LT β R, CD40, CD30, CD27, HVEM, OX40, o DR4) o variante de PLAD y una porción que extiende la vida media, tal como una porción PEG o un dAb que une albumina de suero o receptor Fc neonatal

10 Preferentemente, un ligando que induce dimerización (o trimerización u oligomerización) de cadenas de receptor soluble no agoniza substancialmente la superficie celular o formas de transmembrana del receptor en un ensayo de célula estándar (es decir, cuando presente a una concentración de 1 nM, 10 nM, 100
15 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M o 5,000 μ M, resulta en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por el receptor inducida por ligando natural del receptor en el ensayo)

Se prefiere que la porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno una
20 el compuesto objetivo endógeno con alta afinidad, tal como K_d de 300 nM a 5 pM (es decir, 3×10^{-7} a 5×10^{-12} M), preferentemente 50 nM a 20 pM, más preferentemente 5 nM a 200 pM y más preferentemente 1 nM a 100 pM, por ejemplo 1×10^{-7} M o menos, preferentemente 1×10^{-8} M o menos, más preferentemente 1×10^{-9}
25 M o menos, ventajosamente 1×10^{-10} M o menos y más

preferentemente 1×10^{11} M o menos, y/o una constante de velocidad K_{escape} de $5 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, preferentemente $1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, más preferentemente $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, por ejemplo $5 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ o menos, preferentemente $1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ o
5 menos, ventajosamente $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ o menos, más preferentemente $1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ o menos, aun más preferentemente $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ o menos, y más preferentemente $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ o menos como se determina por resonancia de plasmón de superficie Una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un
10 compuesto objetivo endógeno y une el compuesto objetivo endógeno con alta afinidad puede formatearse en cualquier formato de ligando adecuado como se describe en la presente

Además de las características de los ligandos descritos en la presente, se prefiere que el ligando una el compuesto objetivo
15 endógeno con alta afinidad, tal como K_d de 300 nM a 5 pM (es decir, 3×10^7 a 5×10^{12} M), preferentemente 50 nM a 20 pM, más preferentemente 5 nM a 200 pM y más preferentemente 1 nM a 100 pM, por ejemplo 1×10^7 M o menos, preferentemente 1×10^8 M o menos, más preferentemente 1×10^9 M o menos, ventajosamente
20 1×10^{10} M o menos y más preferentemente 1×10^{11} M o menos, y/o una constante de velocidad K_{escape} de $5 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^7 \text{ s}^{-1}$, preferentemente $1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, más preferentemente $5 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ a $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$, por ejemplo $5 \times 10^1 \text{ s}^{-1}$ o menos, preferentemente $1 \times 10^2 \text{ s}^{-1}$ o menos, ventajosamente $1 \times 10^3 \text{ s}^{-1}$ o
25 menos, más preferentemente $1 \times 10^4 \text{ s}^{-1}$ o menos, aun más

preferentemente $1 \times 10^5 \text{ s}^{-1}$ o menos, y más preferentemente $1 \times 10^6 \text{ s}^{-1}$ o menos como se determina por resonancia de plasmón de superficie

En ciertas modalidades, el ligando comprende un dAb que
 5 une un compuesto objetivo endógeno El compuesto objetivo endógeno puede ser, por ejemplo, un receptor soluble (por ejemplo, receptor de citoquina soluble, receptor del factor de crecimiento soluble, receptor de hormona soluble), un antagonista de receptor endógeno (por ejemplo, IL-1ra), una enzima, un
 10 agonista endógeno (por ejemplo, una citoquina, un factor de crecimiento, una hormona) En algunas modalidades, el ligando es un dímero, trímero, oligómero o multímero de dAb

Los ligandos pueden comprender una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno, en donde
 15 dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno se selecciona del grupo consistiendo de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avímero El ligando también puede comprender una porción que tiene un sitio de unión para un
 20 compuesto objetivo endógeno en donde la porción es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tales como un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$, un diacuerpo, un dominio variable sencillo de
 25 inmunoglobulina (por ejemplo, V_H humano, V_L humano, VH_{HH})

Si se desea, el ligando puede comprender además una porción que extiende la vida media como se describe en la presente. Por ejemplo, el ligando puede comprender una porción que extiende la vida media seleccionada del grupo consistiendo de una porción de glicol de polialquileno, albumina de suero o un fragmento del mismo, receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*. Porciones adecuadas comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* incluyen un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, un avímero, un anticuerpo o fragmento de anticuerpo, tales como un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo, y un dominio variable sencillo de inmunoglobulina (por ejemplo, V_H humano, V_L humano, V_{HH}).

Como se describe en la presente, los ligandos de la invención no inhiben substancialmente la actividad del compuesto objetivo endógeno al cual se unen. Sin embargo, donde un objetivo tiene más de una actividad (por ejemplo, actividad de unión y actividad de señalización), el ligando puede inhibir la actividad que no se asocia con la actividad o beneficio terapéutico propuesto. Por ejemplo, un ligando o monómero de dAb puede unir un receptor soluble y también unir la forma de transmembrana

del receptor En tal situación, la forma de transmembrana del receptor puede tener actividad de unión a ligando y también actividad de señalización Preferentemente, el ligando de la invención no inhibirá la actividad de unión del ligando (de las formas soluble y de transmembrana del receptor) que actúa para inhibir los procesos inducidos por ligando, pero puede inhibir la actividad de señalización de la forma de transmembrana del receptor

Para ilustrar más la invención, modalidades de ligandos ejemplificativos que unen TNFR1 soluble se describen abajo Modalidades de ligandos que unen TNFR1 soluble son ilustrativas de ligandos de la invención que unen otros receptores

TNFR1 es un receptor de transmembrana conteniendo una región extracelular que une el ligando y un dominio intracelular que carece de actividad de transducción de señal intrínseca pero puede asociarse con moléculas de transducción de señal El complejo de TNFR1 con TNF unido contiene tres cadenas TNFR1 y tres cadenas TNF (Banner *et al*, *Cell*, 75(3) 431-445 (1993)) El ligando TNF está presente como un trímero, que se une por tres cadenas TNFR1 (Id) Las tres cadenas TNFR1 se agrupan de manera cercana juntas en el complejo receptor-ligando, y este agrupamiento es un requisito a transducción de señal mediada por TNFR1 de hecho, los agentes multivalentes que unen TNFR1, tales como anticuerpos anti-TNFR1, pueden inducir agrupamiento de TNFR1 y transducción de señal en la ausencia de TNF y se

utilizan comúnmente como agonistas TNFR1 (Ver, por ejemplo, Belka *et al*, EMBO, 14(6) 1156-U65 (1995), Mandik-Nayak *et al*, J Immunol, 167 1920-1928 (2001)) De acuerdo con lo anterior, agentes multivalentes que unen TNFR1, son generalmente antagonistas no efectivos de TNFR1 aun si bloquean la unión de TNF α a TNFR1

La región extracelular de TNFR1 comprende un segmento de terminal amino de trece aminoácidos (aminoácidos 1-13 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 1-13 de SEQ TD NO 4 (ratón)), Dominio 1 (aminoácidos 14-53 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 14-53 de SEQ ID NO 4 (ratón)), Dominio 2 (aminoácidos 54-97 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 54-97 de SEQ ID NO 4 (ratón)), Dominio 3 (aminoácidos 98-138 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 98-138 de SEQ ID NO 4 (ratón)), y Dominio 4 (aminoácidos 139-167 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 139-167 de SEQ ID NO 4 (ratón)) que se sigue por una región próxima a la membrana (aminoácidos 168-182 de SEQ ED NO 2 (humano), aminoácidos 168-183 SEQ ID NO 4 (ratón)) (Ver, Banner *et al*, Cell 73(3) 431-445 (1993) y Loetscher *et al*, Cell 61(2) 351-359 (1990)) Dominios 2 y 3 hacen contacto con ligando unido (TNF β , TNF α) (Banner *et al*, Cell, 73(3) 431-445 (1993)) La región extracelular de TNFR1 también contiene una región referida como el dominio de ensamble de unión de pre-ligando o dominio PLAD (aminoácidos 1-53 de SEQ ID NO 2 (humano), aminoácidos 1-53 de SEQ ID NO 4 (ratón)) (El

Gobierno de EE UU, WO 01/58953, Deng *et al* , Nature Medicine, doi 10 1038/nml304 (2005))

TNFR1 se difunde de la superficie de células *in vivo* a través de un proceso que incluye proteólisis de TNFR1 en Dominio 4 o en la región próxima a membrana (aminoácidos 168-182 de SEQ ID NO 2, aminoácidos 168-183 de SEQ ED NO 4), para producir una forma soluble de TNFR1. TNFR1 soluble retiene la capacidad para unir TNF α , y funciona así como un Inhibidor endógeno de la actividad de TNF α .

En algunas modalidades, un ligando o monómero de dAb que une TNFR1 soluble puede unir también TNFR1 de transmembrana e inhibir agrupamiento inducido por TNF α de TNFR1 en la superficie celular, que precede la transducción de señal a través del receptor, pero no inhibe la unión de TNF α a TNFR1 de transmembrana y TNFR1 soluble.

En modalidades particulares, el ligando o monómero de dAb no inhibe la actividad de unión a TNF de formas soluble y de transmembrana de TNFR1 pero puede inhibir la actividad de señalización de TNFR1. Un ligando o monómero de dAb de este tipo puede unir Dominio 1 o Dominio 4 de TNFR1. Tal un ligando o monómero de dAb puede unir TNFR1 soluble y TNFR1 de transmembrana, pero no inhibe la actividad de unión a TNF de cualquier forma de TNFR1. De acuerdo con lo anterior, tal un ligando o dAb puede administrarse, por ejemplo, para extender la vida media de TNFR1 soluble o para mejorar la actividad de unión.

de TNFR1 soluble De acuerdo con lo anterior, administrar tal ligando o monómero de dAb a un mamífero en necesidad del mismo puede aprovechar y explotar las trayectorias reguladoras endógenas que inhiben la actividad de TNFR1 de superficie celular

5 para propósitos terapéuticos

En otras modalidades, la invención proporciona ligandos y monómeros de dAbs similares que unen otros receptores solubles pero no inhiben la unión de ligandos endógenos a receptores solubles

10 En modalidades más particulares, el ligando comprende un dAb que une Dominio 1 de TNFR1 y compite con TAR2m-21-23 para unión a TNFR1 de ratón o compite con TAR2h-205 para unión a TNFR1 de humano En modalidades más particulares, el ligando es un dímero de tal un dAb y, si se desea, comprende además una
15 porción PEG En ciertas modalidades, el ligando o monómero de dAb es substancialmente resistente a agregación Por ejemplo, en algunas modalidades, menos de aproximadamente 10%, menos de aproximadamente 9%, menos de aproximadamente 8%, menos de aproximadamente 7%, menos de aproximadamente 6%, menos de
20 aproximadamente 5%, menos de aproximadamente 4%, menos de aproximadamente 3%, menos de aproximadamente 2% o menos de aproximadamente 1% del ligando o monómero de agregados de dAb cuando una solución de 1-5 mg/ml, 5-10 mg/ml, 10-20 mg/ml, 20-50 mg/ml, 50-100 mg/ml, 100-200 mg/ml o 200-500 mg/ml de
25 ligando o dAb en un solvente que se utiliza de manera rutinaria

para formulación de fármaco tales como salina, salina regulada salina de regulador de citrato, agua, una emulsión, y, cualquiera de estos solventes con un excipiente aceptable tales como aquellos aprobados por FDA, se mantiene a aproximadamente

5 22°C, 22-25°C, 25-30°C, 30-37°C, 37-40°C, 40-50°C, 50-60°C, 60-70°C, 70-80°C, 15-20°C, 10-15°C, 5-10°C, 2-5°C, 0-2°C, -10°C a 0°C -20°C a -10°C, -40°C a -20°C, -60°C a -40°C, o -80°C a -60°C, por un periodo de tiempo de aproximadamente, por ejemplo 10 minutos, 1 hora, 8 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 4 días, 1

10 semana, 2 semanas, 3 semanas, 1 mes, 2 meses, 3 meses, 4 meses, 6 meses, 1 año, o 2 años

La agregación puede valorarse utilizando cualquier método adecuado, tal como, por microscopia, valorando turbidez de una solución por inspección visual o espectroscopia o cualquier otro

15 método adecuado Agregación puede valorarse utilizando cualquier método adecuado, tal como, por microscopia, valorando turbidez de una solución por inspección visual o espectroscopia o cualquier otro método adecuado Preferentemente, agregación se valora por difusión de luz dinámica Ligandos o monómeros de

20 dAb que son resistentes a agregación proporcionan varias ventajas Por ejemplo, tales ligandos o monómeros de dAb pueden producirse fácilmente en alta producción como proteínas solubles por expresión utilizando un sistema de producción biológico adecuado, tal como *E coli*, y puede formularse y/o

25 almacenarse a concentraciones más altas que los polipéptidos

convencionales, y con menos agregación y pérdida de actividad

Además, ligandos o monómeros de dAb que son resistentes a agregación pueden producirse de manera más económica que otros polipéptidos de unión a antígeno o epítopo (por ejemplo, anticuerpos convencionales) Por ejemplo, generalmente, preparación de polipéptidos de unión a epítopo o antígeno propuestos para aplicaciones *in vivo* incluye procesos (por ejemplo, filtración de gel) que remueven polipéptidos agregados. La falla para remover tales agregados puede resultar en una preparación que no es adecuada para aplicaciones *in vivo* debido a que, por ejemplo, los agregados de un polipéptido de unión a antígeno que se propone actuar como un antagonista, pueden funcionar como un agonista al inducir la degradación o agrupamiento del antígeno objetivo. Los agregados de proteína también pueden reducir la eficacia de polipéptido terapéutico al inducir una respuesta inmune en el sujeto al cual se administran.

En contraste, los ligandos resistentes a agregación o monómeros de dAb de la invención pueden prepararse para aplicaciones *in vivo* sin la necesidad de incluir etapas del proceso que remueven agregados, y pueden utilizarse en aplicaciones *in vivo* sin las desventajas arriba mencionadas causadas por agregados de polipéptido.

En algunas modalidades, el ligando o monómero de dAb se desdobra de manera reversible cuando se calienta a una temperatura (T_s) y enfría a una temperatura (T_c), en donde T_s es

mayor que la temperatura de fusión (T_m) de dAb, y T_c es inferior que la temperatura de fusión de dAb. Por ejemplo, el monómero de dAb puede desdoblarse de manera reversible cuando se calienta a 80°C y enfría a aproximadamente temperatura ambiente

- 5 Un polipéptido que se desdobla de manera reversible pierde función cuando se desdobla pero vuelve a ganar función al volverse a doblar. Tales polipéptidos se distinguen de polipéptidos que se agregan cuando se desdoblan o que se vuelven a doblar de manera inapropiada (polipéptidos mal
10 doblados), es decir, no vuelve a ganar función

El desdoblado y redoblado del polipéptido puede valorarse, por ejemplo, al detectar directa o indirectamente la estructura de polipéptido utilizando cualquier método adecuado. Por ejemplo, estructura de polipéptido puede detectarse por dicroísmo circular
15 (CD) (por ejemplo, lejos de UV CD, cerca de UV CD), fluorescencia (por ejemplo, fluorescencia de cadenas laterales de triptofan), susceptibilidad a proteólisis, resonancia magnética nuclear (NMR), o al detectar o medir una función de polipéptido que es dependiente del doblado apropiado (por ejemplo, unión a ligando
20 objetivo, unión a ligando genérico). En un ejemplo, el desdoblado de polipéptido se valora utilizando un ensayo funcional en el cual la pérdida de función de unión (por ejemplo, unión de un ligando genérico y/u objetivo, uniendo un substrato) indica que el polipéptido se desdobla

- 25 El grado de desdoblado y redoblado de un ligando o

monómero de dAb puede determinarse utilizando una curva de desdoblado o desnaturalización. Una curva de desdoblado puede producirse al trazar la temperatura como la ordenada y la concentración relativa de polipéptido doblado como la abscisa. La

5 concentración relativa de ligando doblado o monómero de dAb puede determinarse directa o indirectamente utilizando cualquier método adecuado (por ejemplo, CD, fluorescencia, ensayo de unión). Por ejemplo, una solución de monómero de dAb o ligando puede prepararse y la elipticidad de la solución determinarse por

10 CD. El valor de elipticidad obtenido representa una concentración relativa de ligando doblado o monómero de dAb del 100%. El ligando o monómero de dAb en la solución se desdobla entonces al elevar de manera creciente la temperatura de la solución y la elipticidad se determina en incrementos adecuados (por ejemplo,

15 después de cada incremento de un grado en temperatura). El ligando o monómero de dAb en solución se dobla de nuevo entonces al reducir de manera creciente la temperatura de la solución y elipticidad se determina a incrementos adecuados. Los datos pueden trazarse para producir una curva de desdoblado y

20 una curva de redoblado. Las curvas de desdoblado y redoblado tienen una forma sigmoidal característica que incluye una porción en la cual las moléculas de ligando o monómero de dAb se desdoblan a varios grados, y una porción en la cual las moléculas de ligando o monómero de dAb se desdoblan. La intercepción del

25 eje y de la curva de redoblado es la cantidad relativa de ligando

redoblado o monómero de dAb recuperado Una recuperación de al menos aproximadamente 50%, o al menos aproximadamente 60%, o al menos aproximadamente 70%, o al menos aproximadamente 75%, o al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95% es indicativa de que el ligando o monómero de dAb se desdobla de manera reversible

En una modalidad preferida, la capacidad de reversa del desdoblado del ligando o monómero de dAb se determina al preparar una solución de monómero de dAb o ligando y trazar las curvas de redoblado y desdoblado por calor La solución de monómero de dAb o ligando puede prepararse en cualquier solvente adecuado, tal como un regulador acuoso que tiene un pH adecuado para permitir que el ligando o monómero de dAb se disuelva (por ejemplo, pH que es aproximadamente 3 unidades arriba o debajo del punto isoeléctrico (pI)) La solución de monómero de dAb o ligando se concentra lo suficiente para permitir que se detecte el desdoblado/doblado Por ejemplo, la solución de monómero de dAb o ligando puede ser aproximadamente 0.1 μM a aproximadamente 100 μM , o preferentemente aproximadamente 1 μM a aproximadamente 10 μM

Si la temperatura de fusión (T_m) del ligando o monómero de dAb se conoce, la solución puede calentarse a aproximadamente diez grados por debajo de la T_m (T_m-10) y el doblado valorarse

por elipticidad o fluorescencia (por ejemplo, exploración lejos de UV CD de 200 nm a 250 nm, longitud de onda fija CD a 235 nm o 225 nm, espectros de emisión fluorescente de triptofan a 300 a 450 nm con excitación a 298 nm) para proporcionar 100% ligando
5 doblado o monómero de dAb relativo La solución se calienta entonces a al menos diez grados arriba de T_m (T_m+10) en incrementos predeterminados (por ejemplo, incrementos de aproximadamente 0.1 a aproximadamente 1 grado), y elipticidad o fluorescencia se determina en cada incremento Entonces, el
10 ligando o monómero de dAb se dobla de nuevo al enfriar a al menos T_m-10 en incrementos predeterminados y elipticidad o fluorescencia se determina en cada incremento Si la temperatura de fusión del ligando o monómero de dAb no se conoce, la solución puede desdoblarse al calentar de manera creciente de
15 aproximadamente 25°C a aproximadamente 100°C y después volver a doblar al enfriar de manera creciente a al menos aproximadamente 25°C, y elipticidad o fluorescencia en cada incremento de calentamiento y enfriamiento se determina Los
20 datos obtenidos pueden trazarse para producir una curva de desdoblado y una curva de redoblado, en la cual la intercepción del eje y de la curva de redoblado es la cantidad relativa de proteína redoblada recuperada

El ligando o monómero de dAb puede comprender cualquier dominio variable de inmunoglobulina adecuado, y preferentemente
25 comprende un dominio variable de humano o un dominio variable

que comprende regiones de estructura de humano En ciertas modalidades, el monómero de dAb comprende una estructura universal, como se describe en la presente

La estructura universal puede ser una estructura V_L ($V\lambda$ o $V\kappa$) , tal como una estructura que comprende las secuencias de aminoácidos de la estructura codificadas por el segmento de gen de inmunoglobulina DPK1, DPK2, DPK3, DPK4, DPK5, DPK6, DPK7, DPK8, DPK9, DPK10, DPK12, DPK13, DPK15, DPK16, DPK18, DPK19, DPK20, DPK21, DPK22, DPK23, DPK24, DPK25, DPK26 o DPK 28 de la línea germinal de humano Si se desea, la estructura V_L puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la estructura codificada por el segmento de gen de inmunoglobulina $J_{\kappa}1$, $J_{\kappa}2$, $J_{\kappa}3$, $J_{\kappa}4$, o $J_{\kappa}5$ de la línea germinal de humano

En otras modalidades la estructura universal puede ser una estructura V_H , tal como una estructura que comprende las secuencias de aminoácidos de la estructura codificada por el segmento de gen de inmunoglobulina DP4, DP7, DP8, DP9, DP10, DP31, DP33, DP38, DP45, DP46, DP47, DP49, DP50, DP51, DP53, DP54, DP65, DP66, DP67, DP68 o DP69 de la línea germinal de humano Si se desea, la estructura V_H puede comprender además la secuencia de aminoácidos de la estructura codificada por el segmento de gen de inmunoglobulina J_H1 , J_H2 , J_H3 , J_H4 , J_H4b , J_H5 y J_H6 de la línea germinal de humano

En modalidades particulares, el ligando de monómero de dAb

comprende la estructura V_L DPK9, o una estructura V_H seleccionada del grupo consistiendo de DP47, DP45 y DP38

El monómero de dAb puede comprender un sitio de unión para un ligando genérico, tal como proteína A, proteína L y
5 proteína G

En ciertas modalidades, el monómero de dAb comprende una o más regiones de estructura comprendiendo una secuencia de aminoácidos que es la misma que la secuencia de aminoácidos de una región de estructura correspondiente codificada por un
10 segmento de gen de anticuerpo de línea germinal de humano, o las secuencia de aminoácidos de una o más de dichas regiones de estructura colectivamente comprenden hasta 5 diferencias de aminoácido en relación a la secuencia de aminoácidos de dicha región de estructura correspondiente codificada por un segmento
15 de gen de anticuerpo de línea germinal de humano

En otras modalidades, las secuencia de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 del monómero de dAb son las mismas que las secuencias de aminoácidos de regiones de estructura correspondientes codificadas por un segmento de gen de
20 anticuerpo de línea germinal de humano, o las secuencia de aminoácidos de FW1, FW2, FW3 y FW4 colectivamente contienen hasta 10 diferencias de aminoácido en relación a las secuencias de aminoácidos de regiones de estructura correspondientes codificadas por dicho segmento de gen de anticuerpo de línea
25 germinal de humano

En otras modalidades, el monómero de dAb comprende regiones FW1, FW2 y FW3, y la secuencia de aminoácidos de dichas regiones FW1, FW2 y FW3 son las mismas que las secuencia de aminoácidos de regiones de estructura correspondientes codificadas por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal de humano

En algunas modalidades, el monómero de dAb no comprende un dominio variable de inmunoglobulina *Camelid*, o uno o más aminoácidos de estructura que son únicos para dominios variables de inmunoglobulina codificados por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal *Camelid*

En ciertas modalidades, los ligandos (por ejemplo, monómeros de dAb) de la invención son eficaces en modelos de enfermedades cuando una cantidad efectiva se administra. Generalmente una cantidad efectiva es aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por ejemplo, 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). Muchos modelos adecuados de enfermedades existen. Los modelos de enfermedad inflamatoria crónica descritos en la presente se reconocen por aquellos expertos en la materia como siendo predictivos de eficacia terapéutica en humanos. La técnica anterior no sugiere utilizar

ligandos que comprenden una porción que une un compuesto objetivo endógeno, tal como un receptor de citoquina soluble (por ejemplo, TNFR1 soluble) en estos modelos, o que serían eficaces

En modalidades particulares, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo de artritis inducido por colágeno de ratón estándar. Por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede reducir la puntuación artrítica promedio de la suma de los cuatro miembros en el modelo de artritis inducido por colágeno de ratón estándar, por ejemplo, por aproximadamente 1 a aproximadamente 16, aproximadamente 3 a aproximadamente 16, aproximadamente 6 a aproximadamente 16, aproximadamente 9 a aproximadamente 16, o aproximadamente 12 a aproximadamente 16, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede retrasar el inicio de síntomas de artritis en el modelo de artritis inducida por colágeno de ratón estándar, por ejemplo, por aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede resultar en una puntuación artrítica promedio de la suma de los cuatro miembros en el modelo de artritis inducida por colágeno de ratón

estándar de 0 a aproximadamente 3, aproximadamente 3 a aproximadamente 5, aproximadamente 5 a aproximadamente 7, aproximadamente 7 a aproximadamente 15, aproximadamente 9 a aproximadamente 15, aproximadamente 10 a aproximadamente 15, aproximadamente 12 a aproximadamente 15, o aproximadamente 14 a aproximadamente 15

En otras modalidades, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo Δ ARE de ratón de artritis (Kontoyiannis *et al* , *J Exp Med* 196 1563-74 (2002)) Por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede reducir la puntuación artrítica promedio en el modelo Δ ARE de ratón de artritis, por ejemplo, por aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5, en comparación con un control adecuado En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede retrasar el inicio de síntomas de artritis en el modelo Δ ARE de ratón de artritis por, por ejemplo, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado En otro ejemplo, la administración de una cantidad

efectiva del ligando puede resultar en una puntuación artrítica promedio en el modelo Δ ARE de ratón de artritis de 0 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5

En otras modalidades, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo Δ ARE de ratón de enfermedad de intestino inflamatorio (IBD) (Kontoyiannis *et al*, *J Exp Med* 196: 1563-74 (2002)). Por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede reducir la puntuación de inflamación crónica y/o aguda promedio en el modelo Δ ARE de ratón de IBD, por ejemplo, por aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede retrasar el inicio de síntomas de IBD en el modelo Δ ARE de ratón de IBD por, por ejemplo, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días, aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control

adecuado En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede resultar en una puntuación de inflamación crónica y/o aguda promedio en el modelo Δ ARE de ratón de IBD de 0 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.5 a 5 aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5

En otras modalidades, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo de IBD inducida por sodio de sulfato de dextran (DSS) Ver, por ejemplo, Okayasu I *et al*, *Gastroenterology* 98 694-702 (1990), Podolsky K, *J Gastroenterol* 38 suppl XV 63-66 (2003)) Por ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede reducir la puntuación de severidad promedio en el modelo DSS de ratón de IBD por ejemplo, por aproximadamente 0.1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1 a aproximadamente 2.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2.5, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5, en comparación con un control adecuado En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede retrasar el inicio de síntomas de IBD en el modelo DSS de ratón de IBD por, por ejemplo, aproximadamente 1 día, aproximadamente 2 días, aproximadamente 3 días, aproximadamente 4 días, aproximadamente 5 días, aproximadamente 6 días, 25 aproximadamente 7 días, aproximadamente 10 días,

aproximadamente 14 días, aproximadamente 21 días o aproximadamente 28 días, en comparación con un control adecuado. En otro ejemplo, la administración de una cantidad efectiva del ligando puede resultar en una puntuación de severidad promedio en el modelo DSS de ratón de IBD de 0 a aproximadamente 0.5, aproximadamente 0.5 a aproximadamente 1, aproximadamente 1 a aproximadamente 1.5, aproximadamente 1.5 a aproximadamente 2, o aproximadamente 2 a aproximadamente 2.5.

10 En modalidades particulares, el ligando o monómero de dAb es eficaz en el modelo de humo de tabaco de ratón de enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD) (Ver, Wright and Churg, Chest, 122 301-306 (2002), Groneberg, DA *et al*, Respiratory Research 5 18 (2004), Coffman RL *et al*, J Exp Med 15 201(12) 1875-1879 (2001), Van Scott, MR *et al*, J App Physiol 96 1433-1444 (2004))

En modalidades adicionales, el ligando de monómero de dAb es eficaz en un modelo animal de asma (ver, Coffman RL *et al*, J Exp Med 201(12) 1875-1879 (2001), Van Scott, MR *et al*, J App 20 Physiol 96 1433-1444 (2004)), fibrosis pulmonar (por ejemplo, Venkatesan, N *et al*, Lung 287 1342-1347 (2004), lupus sistémico eritematoso (SLE) (Knight *et al* (1978) J Exp Med, 147 1653, Reinersten *et al* (1978) New Eng J Med, 299 515), miastenia gravis (Lindstrom *et al* (1988) Adv Immunol, 42 233), artritis 25 (Stuart *et al* (1984) Ann Rev Immunol, 42 233, Van Eden *et al*

(1988) *Nature*, 331 171), tiroiditis (Maron *et al* (1980) *J Exp Med*, 152 1115), diabetes mellitus dependiente de insulina (IDDM) (Kanasawa *et al* (1984) *Diabetologia*, 27 113), y el modelo EAE de esclerosis múltiple (ver 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)

Preferentemente, el ligando o monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0.5 mg/L cuando se expresa en especies *E coli* o en *Pichia* (por ejemplo, *P pastoris*). En otras modalidades preferidas, el monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 0.75 mg/L, al menos aproximadamente 1 mg/L, al menos aproximadamente 4 mg/L, al menos aproximadamente 5 mg/L, al menos aproximadamente 10 mg/L, al menos aproximadamente 15 mg/L, al menos aproximadamente 20 mg/L, al menos aproximadamente 25 mg/L, al menos aproximadamente 30 mg/L, al menos aproximadamente 35 mg/L, al menos aproximadamente 40 mg/L, al menos aproximadamente 45 mg/L, o al menos aproximadamente 50 mg/L, o al menos aproximadamente 100 mg/L, o al menos aproximadamente 200 mg/L, o al menos aproximadamente 300 mg/L, o al menos aproximadamente 400 mg/L, o al menos aproximadamente 500 mg/L, o al menos aproximadamente 600 mg/L, o al menos aproximadamente 700 mg/L, o al menos aproximadamente 800 mg/L, al menos

aproximadamente 900 mg/L, o al menos aproximadamente 1g/L cuando se expresa en especies *E coli* o en *Pichia* (por ejemplo, *P pastoris*) En otras modalidades preferidas, el monómero de dAb se secreta en una cantidad de al menos aproximadamente 1 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L al menos aproximadamente 1 mg/L a al menos aproximadamente 750 mg/L, al menos aproximadamente 100 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 200 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 300 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 400 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 500 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 600 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 700 mg/L a al menos aproximadamente 1 g/L, al menos aproximadamente 800 mg/L a al menos aproximadamente 1g/L, o al menos aproximadamente 900 mg/L a al menos aproximadamente 1g/L cuando se expresa en especies *E coli* o en *Pichia* (por ejemplo, *P pastoris*) Aunque, los ligandos y monómeros de dAb descritos en la presente pueden secretarse cuando se expresan en especies *E coli* o en *Pichia* (por ejemplo, *P pastoris*), pueden producirse utilizando cualquier método adecuado, tales como métodos químicos sintéticos o métodos de producción biológica que no emplean especies *E coli* o *Pichia*

En algunas modalidades, el ligando es un anticuerpo que tiene especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno

o un fragmento de unión a antígeno del mismo, tales como un fragmento Fab, fragmento Fab', fragmento F(ab')₂ o fragmento Fv (por ejemplo, scFV) En otras modalidades, el antagonista o ligando es monovalente, tal como un dAb o un fragmento de unión a antígeno monovalente de un anticuerpo, tales como un fragmento Fab, fragmento Fab', o fragmento Fv

En otras modalidades de la invención descritas por toda esta descripción en lugar del uso de un "dAb" en un ligando de la invención, se contempla que el experto puede utilizar un dominio que comprende las CDRs de un dAb que une un compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, CDRs injertadas en una estructura o microandamio de proteína adecuada, por ejemplo, un anticuerpo, un microandamio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL o un dominio EGF) o puede ser un dominio de proteína comprendiendo un sitio de unión para TNFR1, por ejemplo, en donde el dominio se selecciona de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL o un dominio EGF La descripción como una totalidad debe construirse de acuerdo con lo anterior para proporcionar descripción de antagonistas, ligandos y métodos utilizados tales dominios en lugar de un dAb Además, los ligandos de la invención pueden formatearse (por ejemplo formatos de vida media extendidos) como se describe en la presente

Usos de Ligandos que Unen un Compuesto Objetivo Endógeno y

Métodos Terapéuticos

La invención se refiere a ligandos que comprenden una porción (por ejemplo, dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno pero no inhiben substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno. Preferentemente, el ligando no se une al sitio activo de un compuesto objetivo endógeno. Características adicionales de los ligandos de la invención se describe en la presente. Para conciencia y para evitar la repetición, no todas las características descritas de los ligandos se describen específicamente con respecto a los usos y métodos de la invención. Se propone que los usos y métodos de la invención incluyen el uso, y métodos que comprenden administrar, cualquiera de los ligandos descritos en la presente.

La invención se refiere a composiciones comprendiendo un ligando que comprende una porción (por ejemplo, dAb) que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno, pero no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno, y un vehículo farmacéuticamente aceptable, diluyente o excipiente. La invención también se refiere a métodos de diagnóstico y terapéuticos que emplean los ligandos o composiciones de la invención. Los ligandos descritos en la presente pueden utilizarse para aplicaciones profilácticas y terapéuticas *in vivo*, aplicaciones de diagnóstico *in vivo* y lo similar.

Por ejemplo, los ligandos (por ejemplo, monómeros de dAb),

de la presente invención típicamente encontrarán uso en prevenir, suprimir o tratar enfermedades (por ejemplo, enfermedades inflamatorias crónicas y/o agudas) Por ejemplo, los antagonistas y/o ligandos pueden administrarse para tratar, suprimir o prevenir

5 una enfermedad inflamatoria (por ejemplo, inflamación aguda y/o crónica), cánceres y neoplasmas (por ejemplo, linfomas (por ejemplo, linfomas de célula B, linfomas de célula T, linfoma mielóide agudo), mieloma múltiple, cáncer de pulmón, carcinomas), enfermedades metabólicas (por ejemplo, diabetes,

10 obesidad), hipersensibilidad alérgica, infección viral o bacteriana, desórdenes autoinmunes (que incluyen, pero no se limitan a, diabetes Tipo I, asma, esclerosis múltiple, artritis (por ejemplo, artritis reumatoide, artritis reumatoide juvenil, artritis psoriática, espondilartropatía (por ejemplo, espondilitis de anquilosis)),

15 lupus eritematoso sistémico, enfermedad del intestino inflamatorio (por ejemplo, enfermedad de Crohn, colitis ulcerativa), miastenia gravis y síndrome de Behcet), psoriasis, endometriosis, adhesiones abdominales (por ejemplo, cirugía post abdominal), osteoartritis, enfermedad pulmonar obstructiva crónica, u otra

20 enfermedad que es adecuada para terapia con un compuesto objetivo endógeno

En la presente solicitud, el término "prevención" incluye administración de la composición protectora antes de la inducción de la enfermedad "Supresión" se refiere a la administración de la

25 composición después de un evento inductivo, pero antes de la

aparición clínica de la enfermedad "Tratamiento" incluye la administración de la composición protectora después de que los síntomas de la enfermedad se manifiestan

La invención se refiere al uso de un ligando, como se describe en la presente, para la fabricación de un medicamento que puede administrarse a un paciente para aprovechar y explotar las actividades benéficas de compuestos endógenos para producir efectos benéficos (por ejemplo, efectos terapéuticamente benéficos efectos benéficos de manera diagnosticada) De acuerdo con lo anterior, la invención se refiere al uso de un ligando para la fabricación de un medicamento para incrementar la cantidad de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto (por ejemplo, la cantidad del compuesto objetivo endógeno en la circulación sistémica, la cantidad en un sitio particular, tales como un órgano particular, tejido o región (por ejemplo, en una articulación, en el pulmón, en un músculo, en sitio de la piel, en el CNS)), para incrementar la biodisponibilidad de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto (por ejemplo, sistémicamente o en un sitio deseado de acción (por ejemplo, en una articulación, en el pulmón, en un músculo, en sitio de la piel, en el CNS)), para incrementar la vida media *in vivo* de dicho compuesto objetivo endógeno, o para tratar una enfermedad que es apta para tratamiento con un compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, tal como una enfermedad como se describe en la presente), por ejemplo El medicamento puede ser para administración local o

sistémica

La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar
5 la vida media de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto

El medicamento puede administrarse a un paciente para incrementar la vida media de un compuesto objetivo endógeno al cual el ligando se une al, por ejemplo, unir el compuesto objetivo endógeno e incrementar así el tamaño hidrodinámico del
10 compuesto objetivo endógeno, al unir y estabilizar el compuesto objetivo endógeno, o al unir y disminuir la velocidad de despeje o metabolismo del compuesto objetivo endógeno. Generalmente, el ligando incrementará la vida media del compuesto objetivo endógeno al cual se une por un factor de al menos
15 aproximadamente 1.5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7 al menos aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, o al menos aproximadamente 10, en relación
20 a la vida media del compuesto objetivo endógeno en la ausencia de ligando. Por ejemplo, un compuesto objetivo endógeno puede tener una vida media de aproximadamente 1 hora, y después de la administración de un ligando que comprende una porción con un sitio de unión que une dicho compuesto objetivo endógeno, la vida
25 media del compuesto objetivo endógeno puede incrementarse a

aproximadamente 1 5 horas, a aproximadamente 10 horas, o más tiempo

La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo
5 endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la cantidad de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto

El nivel o cantidad de compuesto objetivo endógeno puede aumentar después de la administración de un ligando, como se describe en la presente, por ejemplo, debido al efecto creciente de
10 la vida media de los ligandos. Por ejemplo, el nivel o cantidad de ligando objetivo endógeno (por ejemplo, en suero) 1 hora, o 2 horas, o 3 horas, o 4 horas, o 5 horas, o 6 horas, o 7 horas, o 8 horas, o 9 horas, o 10 horas, o 11 horas, o 12 horas, o 1 día después de la administración de un ligando de la invención puede
15 aumentarse por un factor de al menos aproximadamente 1 5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 50, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 500, al
20 menos aproximadamente 1,000, al menos aproximadamente 5,000, al menos aproximadamente 10,000, al menos aproximadamente 50,000, o al menos aproximadamente 100,000. El incremento de los niveles o cantidades de un compuesto objetivo endógeno puede detectarse fácilmente utilizando cualquier método
25 adecuado. Por ejemplo, una muestra adecuada (por ejemplo,

suero) puede obtenerse antes de la administración del ligando y en uno o más puntos de tiempo después de la administración, y el nivel o cantidad de compuesto objetivo endógeno en las muestras puede determinarse utilizando cualquier método adecuado La muestra puede ser, por ejemplo, una muestra de sangre, suero, fluido cerebroespinal, fluido sinovial, lavado broncoalveolar, enema o una biopsia En algunas modalidades, la cantidad o nivel de ligando en tal una muestra se incrementa, en relación a la cantidad o nivel antes de que el ligando se administre

10 La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la biodisponibilidad de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto

15 El medicamento puede administrarse a un sujeto para incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno sistémicamente, o en un sitio deseado de acción (por ejemplo, en un sitio donde el ligando se administra localmente) Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno que tiene actividad benéfica en la circulación sistémica pero se distribuye rápidamente en los tejidos o despeja (por ejemplo, un esteroide y hormona de péptido), y disminuir la velocidad de distribución o despeje Tal un ligando puede incrementar la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la circulación sistémica donde la actividad benéfica del

20

25

compuesto objetivo endógeno puede tener un efecto benéfico (por ejemplo, terapéutico) Un ligando puede incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno en un sitio deseado al reclutar el compuesto objetivo endógeno a ese sitio

- 5 Por ejemplo, un ligando comprendiendo un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado puede administrarse localmente a un paciente (por ejemplo como una formulación de depósito) El ligando localmente administrado puede unir el compuesto objetivo endógeno deseado, y reclutar el compuesto
- 10 objetivo endógeno adicional al sitio De esta manera, una cantidad o nivel incrementado de compuesto objetivo endógeno puede estar presente en el sitio para producir efectos benéficos Por ejemplo, en una modalidad, el ligando comprende una porción con un sitio de unión para isoforma de TGF beta 3 Tal un ligando
- 15 puede administrarse localmente para unir isoforma de TGF beta 3 y reclutar la isoforma de TGF beta 3 al sitio de administración local, y de esta manera promover la curación de la herida

- Generalmente, el ligando incrementará la biodisponibilidad (por ejemplo, en la circulación sistémica, en un sitio deseado de
- 20 acción) del compuesto objetivo endógeno al cual se une por un factor de al menos aproximadamente 1.5, al menos aproximadamente 2, al menos aproximadamente 3, al menos aproximadamente 4, al menos aproximadamente 5, al menos aproximadamente 6, al menos aproximadamente 7, al menos
- 25 aproximadamente 8, al menos aproximadamente 9, o al menos

aproximadamente 10, en relación a la biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno en la ausencia de ligando. Por ejemplo, cuando el ligando incrementa la biodisponibilidad en la circulación sistémica, una curva de tiempo de concentración para el ligando endógeno iniciando en el tiempo de administración del ligando puede prepararse, y la curva y área bajo la curva (AUC) puede compararse con niveles sistémicos normales del ligando objetivo endógeno para determinar el grado de incremento en la biodisponibilidad sistémica.

10 La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la actividad de dicho objetivo endógeno.

Los ligandos pueden incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) de los objetivos endógenos a los cuales se unen. Por ejemplo, un ligando puede unir un compuesto objetivo endógeno tal como un agonista endógeno (por ejemplo, una citoquina) o un receptor de citoquina soluble y mejorar la actividad de unión del compuesto objetivo endógeno al incrementar la afinidad y/o avidéz del compuesto objetivo endógeno para su compañero de unión endógeno. Ligandos que comprenden dos o más porciones que tienen sitios de unión con especificidad de unión para un compuesto objetivo endógeno deseado pueden unir dos o más moléculas de compuesto objetivo endógeno individuales produciendo así un dímero, trímero, oligómero o multímero de

compuesto objetivo endógeno Tal un dímero, trímero, oligómero o multímero tendrán actividad de unión mejorada hacia, por ejemplo, una célula que expresa el compañero de unión natural para el compuesto objetivo endógeno debido a avidéz más alta

5 Generalmente, tal un ligando puede mejorar la actividad de unión del compuesto objetivo endógeno Por ejemplo, la intensidad de unión (por ejemplo, afinidad o avidéz) de un dímero de compuesto objetivo endógeno para su compañero de unión puede ser al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100, al

10 menos aproximadamente 1,000 o al menos aproximadamente 10,000 veces más fuerte que la intensidad de unión del compuesto objetivo endógeno como un monómero (es decir, no en un complejo con un ligando de la invención)

En una modalidad específica, el ligando comprende dos o

15 más porciones (dAbs) que tienen especificidad de unión para TNFR1 soluble pero no une el sitio activo (el sitio activo de TNFR1 soluble se contiene dentro de Dominios 2 y 3) Tal un ligando puede unir dos o más cadenas de TNFR1 soluble para formar un dímero, trímero, oligómero o multímero de TNFR1 soluble, que

20 tiene actividad de unión mejorada hacia su ligando trimérico, TNF, debido a avidéz incrementada También debe apreciarse que la vida media de tal un dímero, trímero, oligómero o multímero de TNFR1 soluble, que tiene un tamaño hidrodinámico más grande que una cadena de TNFR1 soluble única, puede también

25 extenderse en relación a un TNFR1 único Como un resultado, tal

un ligando puede mejorar la actividad de unión a TNF de TNFR1 soluble y mejorar su eficacia terapéutica. Por ejemplo, tal un ligando puede mejorar la eficacia de TNFR1 soluble por un factor de al menos aproximadamente 10, al menos aproximadamente 100, al menos aproximadamente 1,000 o al menos aproximadamente 10,000.

En un ejemplo de esta modalidad, un ligando que es un dímero de un dAb que une Dominio 1 de TNFR1 de ratón se utiliza para demostrar que ligandos que inducen dimerización de TNFR1 soluble mejoran la eficacia de TNFR1 soluble. Por ejemplo, tal un ligando puede agregarse a un ensayo conteniendo células MRC5 de humano, TNF de humano y TNFR1 de ratón soluble. TNFR1 de ratón soluble competirá con TNFR1 de humano en las células MRC5 con TNF de humano. El ligando que es un dímero de un dAb que une Dominio 1 de TNFR1 de ratón une dos cadenas de TNFR1 de ratón soluble para formar un dímero de TNFR1 de ratón que será mucho más efectivo en inhibir los efectos de TNF en el ensayo. Por ejemplo, la IC₅₀ para TNFR1 de ratón puede reducirse del rango nanomolar al rango picomolar (aproximadamente 10 o aproximadamente 100 o aproximadamente 1000 veces de reducción) por la adición del ligando que induce la dimerización de TNFR1 soluble.

Preferentemente, ligando que induce dimerización (o trimerización u oligomerización) de cadenas de receptor soluble no agoniza substancialmente las formas de transmembrana o

superficie celular del receptor en un ensayo de célula estándar (es decir, cuando presente en una concentración de 1 nM, 10 nM, 100 nM, 1 μ M, 10 μ M, 100 μ M, 1000 μ M o 5,000 μ M, resulta en no más de aproximadamente 5% de la actividad mediada por el receptor
5 inducida por ligando natural del receptor en el ensayo)

En una modalidad particular, la invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo dos o más porciones que tienen un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la actividad de unión de
10 dicho compuesto objetivo endógeno, en donde dicho ligando une dicho objetivo endógeno, no une el sitio activo de dicho objetivo endógeno, y no inhibe substancialmente la actividad de unión de dicho compuesto objetivo endógeno

La invención también se refiere a un ligando que une un
15 compuesto objetivo endógeno teniendo actividad adecuada para tratar una enfermedad en un sujeto, en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno para uso en terapia de una enfermedad apta para
20 tratamiento con dicho compuesto objetivo endógeno. Por ejemplo, el ligando puede incrementar la vida media *in vivo* de dicho compuesto objetivo endógeno, incrementar la cantidad de dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto, incrementar la biodisponibilidad de dicho compuesto objetivo endógeno, y/o
25 incrementar la actividad de unión de dicho compuesto endógeno

La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción de unión que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para incrementar la vida media, biodisponibilidad o actividad de dicho compuesto endógeno, en
5 donde dicha porción de unión que tiene un sitio de unión para un compuesto endógeno es dicho compuesto endógeno o una porción o variante del mismo, y en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

10 La invención se refiere al uso de un ligando comprendiendo una porción de unión que tiene un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptor TNF para incrementar la vida media, biodisponibilidad o actividad de dicho miembro de la superfamilia de receptor TNF, en donde dicho ligando une dicho miembro de la
15 superfamilia de receptor TNF y no inhibe substancialmente la actividad de dicho miembro de la superfamilia de receptor TNF, y en donde dicha porción de unión que tiene un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptor TNF es un dominio de ensamble de pre-ligando (PLAD) o una variante del mismo

20 La invención se refiere a un método para incrementar la vida media de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho
25 compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la cantidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción
5 que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la biodisponibilidad de un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo
10 una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la actividad (por ejemplo, actividad de unión) de un compuesto
15 objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para tratar un sujeto
20 teniendo una enfermedad que es apta para tratamiento con un compuesto objetivo endógeno en un sujeto, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto
25 objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la vida media, biodisponibilidad o actividad de un compuesto objetivo endógeno, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una
5 porción que tiene un sitio de unión con especificidad de unión para dicho compuesto objetivo endógeno, en donde dicha porción de unión que tiene un sitio de unión para un compuesto endógeno es dicho compuesto endógeno o una porción o variante del mismo, y en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y
10 no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

La invención se refiere a un método para incrementar la vida media, biodisponibilidad o actividad para un miembro de la superfamilia de receptor TNF, comprendiendo administrar a un
15 sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando comprendiendo una porción de unión que tiene un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptor TNF en donde dicho ligando une dicho miembro de la superfamilia de receptor TNF y no inhibe substancialmente la actividad de dicho miembro
20 de la superfamilia de receptor TNF, y en donde dicha porción de unión que tiene un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de receptor TNF es un dominio de ensamble de pre-ligando (PLAD) o una variante del mismo

Usos profilácticos y terapéuticos de ligandos de la invención
25 incluyen la administración de ligandos de acuerdo a la invención a

un mamífero receptor, tal como un humano. Ligandos multi-específicos y dual-específicos (por ejemplo, formatos de anticuerpo dual-específicos) se unen a antígeno multimérico con mayor avidez. Ligandos dual o multi-específicos pueden permitir la degradación de dos antígenos, por ejemplo para producir dímeros, trimeros o multimeros de alta avidez de receptores solubles.

Ligandos substancialmente puros de al menos 90 a 95% homogeneidad se prefieren para administración a un mamífero, y 98 a 99% o más homogeneidad se prefiere más para usos farmacéuticos, especialmente cuando el mamífero es un humano. Una vez purificados, parcialmente o homogeneidad según se desea, los ligandos pueden utilizarse de manera de diagnóstico o terapéuticamente (incluyendo extracorporalmente) o en desarrollar y realizar procedimientos de ensayo, coloraciones inmunofluorescentes y lo similar (Lefkovite and Pernis, (1979 y 1981) Immunological Methods, Volumes I y II, Academic Press NY).

Generalmente, los ligandos se utilizarán en forma purificada junto con vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones alcohólicas o acuosas/acuosas, emulsiones o suspensiones, cualquiera incluyendo salina y/o medios regulados. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y Ringer lactado. Los

adyuvantes fisiológicamente aceptables, si es necesario mantener un complejo de polipéptido en suspensión, pueden elegirse de espesadores tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos

- 5 Vehículos intravenosos incluyen fluido y rellenos nutrientes y rellenos de electrolito, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer Conservadores y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelantes y gases inertes, pueden también estar presentes (Mack (1982) Remington's
- 10 Pharmaceutical Sciences, 16th Edition) Una variedad de formulaciones adecuadas puede utilizarse, incluyendo formulaciones de liberación extendida

La vía de administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo a la invención puede ser cualquiera de las comunmente

15 utilizadas por aquellos de experiencia ordinaria en la materia Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los ligandos seleccionados de la misma de la invención pueden administrarse a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándar La administración puede ser por cualquier modo apropiado,

20 incluyendo parenteralmente, intravenosamente, intramuscularmente, intraperitonealmente, transdérmicamente, a través de la vía pulmonar, o también, de manera apropiada, por infusión directa con un catéter La administración parenteral también puede ser por infusión o inyección intraarteria, intratecal,

25 intraarticular, subcutánea, u otra Los modos adecuados

adicionales de administración incluyen administración pulmonar, administración intranasal, intravaginal, administración intrarectal (por ejemplo, por supositorio o enema) La dosificación y frecuencia de administración dependerá de la edad, sexo y condición del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros para tomarse en cuenta por el médico La administración puede ser local (por ejemplo, suministro local al pulmón por administración pulmonar, por ejemplo, administración intranasal) o sistémica como se indica

10 Los ligandos de la presente invención pueden utilizarse como composiciones administradas de manera separada o en conjunción con otros agentes Estos pueden incluir varios fármacos inmunoterapéuticos, tales como ciclosporina, metotrexato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas Composiciones
15 farmacéuticas pueden incluir "cocktails" de varios agentes citotóxicos u otros junto con los antagonistas (por ejemplo, ligandos) de la presente invención, o aun combinaciones de ligandos de acuerdo a la presente invención teniendo diferentes especificidades, tales como ligandos seleccionados utilizando
20 diferentes epítopos o antígenos objetivo, ya sea o no se agrupen antes de la administración Generalmente, el ligando y cualquier agente adicional se administran en una manera que proporciona un recubrimiento de efecto terapéutico

En ciertas modalidades, el ligando comprendiendo una
25 porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo

endógeno se administra junto con una dosis baja del compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, una forma recombinante del compuesto objetivo endógeno) Como se describe en la presente, el ligando puede, por ejemplo, incrementar la vida media o
5 biodisponibilidad del compuesto objetivo endógeno, o incrementar la actividad del compuesto objetivo endógeno, volviendo a la dosis baja terapéuticamente efectiva Este planteamiento terapéutico es ventajoso debido a que los efectos secundarios asociados con dosis de agentes más altas para tratar enfermedad (por ejemplo,
10 formas recombinantes de proteínas objetivo endógenas) pueden evitarse

En otras modalidades, un ligando que se ha precargado con un compuesto objetivo endógeno (por ejemplo, incubado con y que permite unir una forma recombinante de un compuesto objetivo
15 endógeno) se administra Los ligandos precargados se adecuan bien para administración local para proporcionar alta biodisponibilidad de un ligando objetivo endógeno que está normalmente presente a niveles sub-terapéuticos o que es difícil de reclutarse en un sitio en donde la actividad del ligando objetivo
20 endógeno se desea

Ligandos de acuerdo a la invención que son capaces de unirse a objetivos extracelulares incluidos en endocitosis (por ejemplo, Clatrin) pueden endocitotarse, permitiendo acceso a objetivos intracelulares Además, los ligandos duales o
25 multiespecíficos, proporcionan un medio por el cual un dominio de

unión (por ejemplo, un monómero dAb) que es específicamente capaz de unirse a un objetivo intracelular puede suministrarse en un ambiente intracelular. Esta estrategia requiere, por ejemplo, un ligando específico dual con propiedades físicas que le permiten permanecer funcional dentro de la célula. Alternativamente, si el compartimiento intracelular de destino final se oxida, un ligando bien doblado puede no necesitarse que esté libre de disulfuro.

Ventajosamente, los ligandos duales y multiespecíficos pueden utilizarse para citoquinas objetivo y otras moléculas que cooperan de manera sinérgica en situaciones terapéuticas en el cuerpo de un organismo. La invención por lo tanto proporciona un método para sinergizar la actividad de dos o más dominios de unión (por ejemplo, dAbs) que unen citoquinas u otras moléculas, comprendiendo administrar un ligando dual o multiespecífico capaz de unirse a dichas dos o más moléculas (por ejemplo, citoquinas). En este aspecto de la invención, el ligando dual o multiespecífico puede ser cualquier ligando dual o multiespecífico, incluyendo un ligando compuesto de dominios complementarios y/o no complementarios, un ligando en una conformación abierta, y un ligando en una conformación cerrada. Por ejemplo, este aspecto de la invención se refiere a combinaciones de dominios V_H y dominios V_L , dominios V_H solamente y dominios V_L solamente.

Sinergia en un contexto terapéutico puede lograrse en un número de maneras. Por ejemplo, combinaciones objetivo pueden ser terapéuticamente activas solamente si ambos objetivos se

tienen como objetivo por el ligando, mientras que el objetivo de un
objetivo solo no es terapéuticamente efectivo. En otra modalidad,
un objetivo solo puede proporcionar un efecto terapéutico algo
bajo o mínimo, pero junto con un segundo objetivo la combinación
5 proporciona un incremento sinérgico en efecto terapéutico

Sistemas de modelo animal que pueden utilizarse para
seleccionar la efectividad de los ligandos para proteger contra o
tratar la enfermedad están disponibles. El modelo animal
adecuado puede utilizarse, tales como los modelos descritos en la
10 presente

Los ligandos de esta invención pueden liofilizarse para
almacenamiento y reconstituirse en un vehículo adecuado antes de
utilizarse. Esta técnica se ha mostrado efectiva con
inmunoglobulinas convencionales y técnicas de reconstitución y
15 liofilización conocidas en la materia pueden emplearse. Se
apreciará por aquellos expertos en la materia que liofilización y
reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de
actividad de anticuerpo (por ejemplo, con inmunoglobulinas
convencionales, anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de
20 actividad que anticuerpos IgG) y que niveles de uso puede que se
tengan que ajustar hacia arriba para compensar

Las composiciones conteniendo los presentes ligandos o un
de los mismos pueden administrarse para tratamientos
terapéuticos y/o profilácticos. En ciertas aplicaciones
25 terapéuticas, una cantidad adecuada para realizar al menos

inhibición parcial, supresión, modulación, muerte, o algun otro parámetro medible, de una población de células seleccionadas se define como una "dosis terapéuticamente efectiva" Las cantidades necesarias para lograr esta dosificación dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general del sistema inmune propio del paciente, pero generalmente variarán de 0 005 a 5 0 mg de ligando por kilogramo de peso corporal, con dosis de 0 05 a 2 0 mg/kg/dosis utilizándose de manera más comun Para aplicaciones profilácticas, las composiciones conteniendo los ligandos presentes o cocktails del mismo también pueden administrarse en dosificaciones similares o ligeramente inferiores, para prevenir, inhibir o retrasar el inicio de enfermedad (por ejemplo, para sostener la remisión o quiescencia o para prevenir la fase aguda) El médico experto será capaz de determinar el intervalo de dosificación apropiado para tratar, suprimir o prevenir la enfermedad Cuando un antagonista de TNFR1 (por ejemplo, ligando) se administra para tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica, puede administrarse hasta cuatro veces por día, dos veces semanalmente, una vez semanalmente, una vez cada dos semanas, una vez al mes, o una vez cada dos meses, a una dosis, por ejemplo, aproximadamente 10 μ g/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 100 μ g/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 70 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a

aproximadamente 80 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a
aproximadamente 50 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a
aproximadamente 40 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a
aproximadamente 30 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg a
5 aproximadamente 20 mg/kg , aproximadamente 1 mg/kg a
aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a
aproximadamente 10 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a
aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 10 µg/kg a
aproximadamente 2 5 mg/kg, aproximadamente 1 mg/kg,
10 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 En modalidades particulares, el
15 antagonista de TNFR1 (por ejemplo, ligando) se administra para
tratar, suprimir o prevenir una enfermedad inflamatoria crónica una
vez cada dos semanas o una vez al mes a una dosis de
aproximadamente 10 µg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (por
ejemplo, aproximadamente 10 µg/kg, aproximadamente 100 µg/kg,
20 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) Los
25 ligandos también pueden administrarse (por ejemplo,

sistémicamente o localmente), por ejemplo, a una dosis de aproximadamente 1 mg/día a aproximadamente 10 mg/día (por ejemplo, 10 mg/día, 9 mg/día, 8 mg/día, 7 mg/día, 6 mg/día, 5 mg/día, 4 mg/día, 3 mg/día, 2 mg/día, o 1 mg/día) De acuerdo con lo anterior, el agente puede administrarse localmente a tejido pulmonar a una dosis de aproximadamente 1 $\mu\text{g/kg/día}$ a aproximadamente 200 $\mu\text{g/kg/día}$ (por ejemplo, aproximadamente 10 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 20 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 30 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 40 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 50 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 60 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 70 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 80 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 90 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 100 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 110 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 120 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 130 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 140 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 150 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 160 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 170 $\mu\text{g/kg/día}$, aproximadamente 180 $\mu\text{g/kg/día}$, o aproximadamente 190 $\mu\text{g/kg/día}$)

Tratamiento o terapia realizada utilizando las composiciones descritas en la presente se considera "efectivo" si uno o más síntomas se reducen (por ejemplo, por al menos 10% o al menos un punto en una escala de valoración clínica), en relación a tales síntomas presentes antes de tratamiento, o en relación a tales síntomas en un individuo (humano o modelo animal) no tratado con tal composición u otro control adecuado Los síntomas obviamente variarán dependiendo de la enfermedad o desorden objetivo, pero

pueden medirse por un técnico o médico experto ordinario. Tales síntomas pueden medirse, por ejemplo, al monitorear el nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o desorden (por ejemplo, niveles de una enzima o metabolito correlacionado con la enfermedad, números de célula afectados, etc.), al monitorear las manifestaciones físicas (por ejemplo, inflamación, tamaño de tumor, etc.) o por una escala de valoración clínica aceptada, por ejemplo, la Escala de Estado de Incapacidad Expandida (para esclerosis múltiple), el Cuestionario de Enfermedad de Intestino Inflamatoria Irvine (valoración de 32 puntos evalúa la calidad de vida con respecto a función del intestino, síntomas sistémicos, función social y estado emocional, rangos de puntuación de 32 a 224, con puntuaciones más altas indicando una mejor calidad de vida), la Calidad de Escala de Artritis Reumatoide en Vida, el Cuestionario Respiratorio de St George, u otra valoración clínica aceptada como se sabe en la materia. Una reducción sostenida (por ejemplo, un día o más, preferentemente más larga) en síntomas de desorden o enfermedad por al menos 10% o por uno o más puntos en una escala clínica dada es indicativa de tratamiento "efectivo". De manera similar, la profilaxis realizada utilizando una composición como se describe en la presente es "efectiva" si el inicio o severidad de uno o más síntomas se retrasa, reduce o elimina en relación a tales síntomas en un individuo similar (modelo animal o humano) no tratado con la composición.

Una composición conteniendo un ligando o cocktail del mismo de acuerdo a la presente invención puede utilizarse en establecimientos terapéuticos y profilácticos para ayudar en la alteración, inactivación, muerte o retiro de una población celular
5 objetivo selecta en un mamífero además, los repertorios seleccionados de polipéptidos descritos en la presente pueden utilizarse de manera extracorporal o *in vitro* selectivamente para matar, eliminar o de otra manera remover de manera efectiva una población celular objetivo de una colección heterogénea de
10 células La sangre de un mamífero puede combinarse extracorporalmente con los ligandos, por ejemplo, anticuerpos, receptores de superficie celular o proteínas de unión de los mismos mediante los cuales las células no deseadas se mueren o de otra manera remueven de la sangre para regresar al mamífero
15 de acuerdo con técnicas estándar

Una composición conteniendo un ligando de acuerdo a la presente invención puede utilizarse en establecimientos terapéuticos o profilácticos para ayudar en la alteración, inactivación, muerte o retiro de una población celular objetivo
20 selecta en un mamífero

Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos descritos en la presente pueden utilizarse extracorporalmente o *in vitro* selectivamente para matar, eliminar o de otra manera remover de manera efectiva una población celular objetivo de una
25 colección heterogénea de células La sangre de un mamífero

puede combinarse extracorporalmente con los ligandos, por ejemplo, anticuerpos, receptores de superficie celular o proteínas de unión de los mismos mediante los cuales las células indeseadas se mueren o de otra manera remueven de la sangre para regresar al mamífero de acuerdo con técnicas estándar

Compuestos Objetivo Endógenos

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen, por ejemplo, receptores de citoquina solubles (por ejemplo, TNFR1 soluble, TNFR2 soluble, receptor IL-1 soluble, receptor IL-4 soluble, receptor IL-13 soluble), antagonistas de receptor endógeno (IL-1ra, IL-6ra), enzimas (por ejemplo, beta-glucocerebrosidasa (E C 3 2 1 45)), factores sanguíneos (por ejemplo, Factor II, Factor VIII), eritropoyetina, hormona de factor de crecimiento, TPO, interferón-alfa, interferón-beta, interferón-gamma, GLP-1, OXM, hormonas sexuales (por ejemplo, testosterona, estrógeno), proteínas morfogénicas óseas (por ejemplo, BMP-1 BMP-2, BMP-3, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7), Isoforma beta 1 del factor de crecimiento de transformación (TGF-beta), isoforma TGF-beta 2, isoforma TGF-beta 3, IL-10, IL-2, factor estimulante de colonia de macrófago-granulocito, factor estimulante de colonia de granulocito, insulina, glucagón, GIP

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen citoquinas, tales como interleuquinas, interferones, factores estimulantes de colonia y quimoquinas Ejemplos de tales

citocinas incluyen, interleuquinas IL1, IL2, IL3, IL4, IL5, IL6, IL7, IL8, IL9, IL10, IL11 IL12, IL13, IL14, IL15 (IL-T), IL16, IL17, IL17B, IL17C, IL17E, IL17F, IL18, IL19, IL20, IL21, IL22, IL23, IL24, IL25, IL26, IL27, IL28A, IL28B, IL29, IL30, IL-31 e IL-32, e
 5 interferones IFN-alfa, IFN-beta, IFN-delta, IFN-gamma, IFN-kappa, IFN-lambda-1, IFN-lambda-2, IFN-lambda-3, IFN-omega, y IFN-tau

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen quimoquinas tales como, CCF18, CCL1, CCL2, CCL3, CCL4, CCL5, CCL6, CCL7, CCL8, CCL9, CCL10, CCL11, CCL12, CCL13,
 10 CCL14, CCL15, CCL16, CCL17 CCL18, CCL19, CCL20, CCL21, CCL22, CCL23, CCL24, CCL25, CCL26 CCL27, CCL28, CXCL1 CXCL2, CXCL3, CXCL4, CXCL5, CXCL6, CXCL7, CXCL8, CXCL9 CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL13, CXCL14, CXCL15, CXCL16 ECEP-1, EDNAP, ENA-78, ENAP, ENAP-alfa, ENAP-beta, inhibidor
 15 de crecimiento celular endotelial, IL8 endotelial, FIC, FDNCF FINAP, GDCF-2, GCF, GCP-2, GRO-alfa, GRO-beta, GRO-gamma, proteína neutralizante de Heparina, Humig, I-309, ILC, ILINCK, MAC, I-TAC, IL8, IP-9, IP-10 Linfotactina, LAG-1, LARC, LCC-1 LD78-alfa, LD78-beta, LD78-gamma, LDCF, LEC, Lkn-1, LMC LAI,
 20 LCF, LA-PF4, LDGF, LDNAP, LIF, LIX, MARC, MCAF, MCIF, Mexiquina, MCP-1, MCP-2, MCP-3, MCP-4, MCP-5, MDC, MEC MIP-1-alfa, MIP-1-beta, MIP-1-delta, MIP-1-gamma, MIP-3, MIP-3-alfa, MIP-3-beta, MIP-4, MIP-4-alpha, MIP-5, Monotactin-1, MPIF-1, MPIF-2, MRP-1, MRP-2, MDGF, MDNAP, MDNCF, factor
 25 estimulador de megacariocito, MGSA, MGSA-alfa, MGSA-beta

Mig, MIP-2, MIP-2-alfa, MIP-2-beta, MIP-2-gamma, NAF, NAP-1, NAP-2, NAP-3, NAP-4 NCP, Oncostatin A, PARC, PBP, como PBP, PBSF, PF4, PLF, PPBP, RANTES, Regaquina-1, SCM-1-alfa, SCYC1, SCYC2, SCI, SCYA1, SCYA2, SCYA3, SCYA4, SCYA5, 5 SCYA6, SCYA7, SCYA8, SCYA9, SCYA10, SCYA11, SCYA12, SCYA13, SCYA14, SCYA15, SCYA16, SCYA17, SCYA19, SCYA20, SCYA21, SCYA22, SCYA23, SCYA24, SCYA25, SCYA26, SCYA27, SCYA28, SLC, SMC-CF, STCP-1, SCYB1, SCYB2, SCYB3, SCYB4, SCYB5, SCYB6, SCYB7, SCYB8, SCYB9, SCYB9B SCYB10, 10 SCYB11, SCYB12, SCYB13, SCYB14, SCYB15, SCYB16, SDF-1-alfa, SDF-1-beta, SR-PSOX, SCYD1, SR-PSOX, TARC, TCA-3, TCA-4, TDCF, TECK, TSC-1 TSG-8, TCF, TCK-1, TLSF-alfa TLSF-beta, TPAR-1, TSG-1, WECHE

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen 15 factores estimulantes de colonia (CSFs) CSFs son citoquinas que estimulan la proliferación de células germinales pluripotentes específicas de la médula ósea en adultos Granulocito-CSF (G-CSF) es específico para efectos proliferativos en células del linaje de granulocito Macrófago-CSF (M-CSF) es específico para 20 células de linaje de macrófago Granulocito-macrófago-CSF (GM-CSF) tiene efectos proliferativos en ambas clases de células linfoides Epo también se considera un CSF así como también un factor de crecimiento, ya que estimula la proliferación de unidades formadoras de colonia de eritrocitos IL-3 (secretado 25 principalmente de células T) también se conoce como multi-CSF,

ya que estimula las células germinales para producir todas las formas de células hematopoyéticas

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen Eritropoyetina (Epo) Epo se sintetiza por el riñón y es el regulador primario de eritropoyesis Epo estimula la proliferación y diferenciación de eritrocitos inmaduros, también estimula el crecimiento de células progenitoras de eritoides (por ejemplo, unidades formadoras de colonia y formadoras de impulsión de eritrocito) e induce la diferenciación de unidades formadoras de columna de eritrocito en proeritroblastos Cuando a los pacientes que padecen de anemia debido a falla de riñón se da Epo, el resultado es un incremento rápido y significativo en conteo de glóbulos rojos

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen Factor I de Crecimiento Similar a Insulina (IGF-I) IGF-I (originalmente llamado somatomedina C) es un factor de crecimiento estructuralmente relacionado con insulina IGF-I es la proteína primaria incluida en la respuesta de células a la hormona de crecimiento (GH) es decir, IGF-I se produce en respuesta a GH e induce entonces las actividades celulares subsiguientes, particularmente en crecimiento óseo Es la actividad de IGF-I en respuesta a GH que da origen al término somatomedina Los estudios subsiguientes han demostrado, sin embargo, que IGF-I tiene actividades de paracrina y autocrina además de las actividades de endocrina inicialmente observadas en hueso El

receptor IGF-1, como el receptor de insulina, tiene actividad de quinasa de tirosina intrínseca. Perteneciente a sus similitudes estructurales IGF-1 puede unirse al receptor de insulina pero lo hace a una afinidad mucho más baja a la que la hace la insulina por si misma

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen Factor I de Crecimiento Similar a Insulina (IGF-II). IGF-II se expresa casi de manera exclusiva en tejidos neonatales y embrionicos. Después del nacimiento, el nivel de proteína IGF-II detectable cae de manera significativa. Por esta razón IGF-II se piensa que es un factor de crecimiento fetal. El receptor IGF-II es idéntico al receptor de manosa-6-fosfato que es responsable de la integración de enzimas lisosomales (que contienen residuos de manosa-6-fosfato) para la lisosomas

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen factor de necrosis de tumor beta. TNF-beta (también llamado linfo toxina) se caracteriza por su habilidad para matar un número de tipos celulares diferentes, así como también la habilidad de inducir diferenciación terminal en otros. Una respuesta no proliferativa significativa a TNF-beta es una inhibición de lipasa de lipoproteína presente en la superficie de células endoteliales vasculares. El sitio predominante de síntesis de TNF-beta es T-linfocitos, en particular la clase especial de células T llamados T-linfocitos citotóxicos (células CTL). La inducción de expresión de TNF-beta resulta de las elevaciones en IL-2 así como también la

interacción de antígeno con receptores de célula T

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen factor de necrosis de tumor alfa (TNF-alfa) TNF-alfa (también llamada linfotoxina B, o caquectina) es una citoquina inflamatoria

5 pleiotrópica y puede causar necrosis de algunos tipos de tumores TNF-alfa comparte solamente 36% de homología de secuencia de aminoácidos con TNF-beta Aun, las estructuras terciarias de las dos proteínas son remarcadamente similares y ambas se unen a los receptores de TNF, TNFR-1 y TNFR-2 TNF-alfa es una

10 proteína trimérica codificada dentro del principal complejo de histocompatibilidad Se identifica primero en su forma secretada 17 kd, pero búsqueda adicional mostró entonces que un precursor 27kd no desdoblado también existe en forma de transmembrana Los macrófagos estimulados producen TNF-alfa 27kd, que pueden

15 ya sea unirse directamente a receptores TNFR-1 y TNFR-2 a través de contacto de célula a célula o experimentan desdoblamiento y se unen en su forma soluble La citoquina se produce por varios tipos de células, pero especialmente por macrófagos Bajos niveles de TNF-alfa promueven el remodelado o reemplazo de tejido senescente o lesionado al estimular el

20 crecimiento de fibroblasto Las funciones benéficas adicionales de TNF-alfa incluyen su papel en la respuesta inmune a invasiones bacterianas, y ciertas fungicas, virales y parásitas así como también su papel en la necrosis de tumores específicos Por

25 ultimo, actua como una clave mediática en la respuesta inmune

inflamatoria local TNF-alfa es una proteína de fase aguda que inicia una cascada de citoquinas e incrementa la permeabilidad vascular, reclutando así el macrófago y neutrófilos a un sitio de infección TNF-alfa secretada por el macrófago causa la

5 coagulación sanguínea que sirve para contener la infección TNF-alfa también muestra efectos crónicos (por ejemplo, en inflamación) y sobreproducción prolongada de TNF-alfa también resulta en una condición conocida como caquexia, que se caracteriza por anorexia, catabolismo neto, pérdida de peso y

10 anemia y que ocurre en enfermedad tal como cáncer y SIDA

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen citoquinas y factores de crecimiento en hematopoyesis, tales como, CD34, CIL (linfoquina inhibiendo la colonia), Daniplestim, GADS (adaptador relacionado con GRB2 aguas abajo de shc),

15 factor de crecimiento de célula Hematopoyética, quinasa de célula Hematopoyética, fosfatasa de célula Hematopoyética, quinasa que carece de tirosina consenso Hematopoyética, factor estimulante de colonia Hematopoyética-309, Hematopoyetina-1, Hematopoyetina-2, péptido Hemoregulador, HIM, Hiwi, HnucC, progenipoyetina,

20 progenipoyetina-1, progenipoyetina-2, progenipoyetina-4, Promegapoyetina, Promegapoyetina-1, Promegapoyetina-1a, y Sintoquina

Otros factores de crecimiento hematopoyético en un sentido amplio incluyen los diversos factores estimulantes de colonia (ver

25 CSF, incluyendo G-CSF, GM-CSF, M-CSF), Epo, SCF (factor de

célula germinal, SCPF (factor de proliferación de célula germinal),
varias Interleuquinas (IL1, IL3, IL4, IL5, IL6, IL11, IL12), LIF, TGF-
beta, MIP-1-alfa, TNF-alfa, también muchos otros factores de peso
molecular bajo, y varias otras citoquinas. Muchas de estas
5 proteínas son multifuncionales. Actúan en etapas de
diferenciación muy tempranas o en etapas posteriores, también
pueden actuar en una manera específica de linaje o pueden
influenciar más de un linaje. La proliferación y maduración de
progenitores comprometidos se controla por los factores
10 específicos de linaje que actúan al último tales como Epo, M-CSF,
G-CSF, e IL5. Los progenitores multipotenciales comenzando la
proliferación celular activa se regulan por varias citoquinas de
recubrimiento, incluyendo IL3, GM-CSF, e IL4. La activación al
ciclar por progenitores primitivos durmientes y mantenimiento de
15 célula B potencial de los progenitores primitivos parece requerir
interacciones de citoquinas de actuación temprana incluyendo IL6,
G-CSF, IL11, IL12, LIF, y SCF. Dependiendo de sus actividades
biológicas se han clasificado las hematopoyetinas en varios
subgrupos.

20 El término hematopoyetinas tipo 1 se utiliza ocasionalmente
para describir estos factores incluidos en la regulación de
hematopoyesis que actúan directamente en algunos tipos
celulares. Este grupo incluye IL3 (multi-CSF) y GM-CSF. Los
factores que sinergizan con factores estimulantes de colonia pero
25 que por ellos mismos no poseen actividad estimulante de colonia

Intrínseca se han referido ocasionalmente como hematopoyetinas tipo 2. Incluyen IL1, IL4, IL5 y IL6. Hematopoyetinas tipo 3 son aquellas modulando el crecimiento hematopoyético al estimular la liberación de factores estimulantes de colonia por sus células productoras respectivas. Incluyen IL1, IL2, TNF-beta e IFN-gamma.

Algunos factores regulan negativamente los procesos de hematopoyesis. Pueden inhibir selectivamente la proliferación de algunos tipos de células hematopoyéticas y pueden aun inducir la muerte celular. El factor de crecimiento de transformación TGF-beta, por ejemplo, actúa predominantemente en células hematopoyéticas primitivas y células linfoides. El factor llamado MIP-1-alfa (proteína inflamatoria de macrófago-1-alfa) muestra actividad similar en células mielopoyéticas primitivas.

Compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen compuestos endógenos incluidos en angiogenesis. Ejemplos de compuestos endógenos incluidos en angiogenesis incluyen, Prolactina 16K, ADAMTS-1, ADAMTS-8, Adrenomedulin, proteína celular migratoria Angio-asociada, Angiogenin, proteína relacionada con angiogenin, Angiomodulin, Angiomotin, Angiopoyetina-1, Angiopoyetina-2, Angiopoyetina-3, Angiopoyetina-4, Angiopoyetina-5, Angiopoyetina-similar a 1, Angiopoyetina-similar a 2, Angiopoyetina-similar a 3, Angiopoyetina-similar a 4, Angiopoyetina-relacionada con proteína-2, Angiostatin, Angiotensin-2, Angiotropin, ARP-2, factor de

motilidad autocrina de melanoma B16-F1, Inhibidor-1 de
 angiogénesis específico de cerebro, inhibidor-2 de angiogénesis
 específico de cerebro 2, inhibidor-3 de angiogénesis específico de
 cerebro C49a, ensayo CAM, factor de anti-tumor derivado de
 5 cartílago, inhibidor derivado de cartílago, CATF, cCAF, CD55, CDI,
 CDT6, inhibidor derivado de condrocito, inhibidor derivado de
 condrocito de angiogénesis y actividad de metaloproteínasa
 Condromodulin-1, factor de crecimiento derivado de
 Condrosarcoma, CLAF de ensayo de membrana corioalantóico,
 10 colágeno tipo 18, factor de crecimiento de tejido conectivo, factor
 angiogénico de luteo hábeas, proteína inhibidora de
 degranulación, EGF, EG-VEGF, factor-1 de angiogénesis derivado
 de riñón embrionario, factor-2 de angiogénesis derivado de riñón
 embrionario, factor de crecimiento endotelial vascular derivado de
 15 glándula endocrina, Endorepellin, endostatin, factor angiogénico
 estimulante de célula endotelial, factor de crecimiento derivado de
 célula endotelial, polipéptido-2 activador de monocito endotelial
 ESAF, f-ECGF, FGF, FGF-4, fragmento E de fibrina, factor de
 crecimiento celular endotelial derivado de Fibroblasto, proteína-12
 20 secretada inducible por fibroblasto, FrzB2, GFB-111, factor
 inhibidor de angiogénesis derivado de glioma, hormona de
 crecimiento, GSM, HAP, Haptoglobin, factor promotor de neurita de
 unión a heparina, factor de crecimiento de hepatocito, HGF, HUAF
 factor angiogénico de humano, factor-1 de angiogénesis de
 25 inhibidor de humano, factor de angiogénesis uterino de humano

IFN-alfa, IFN-gamma, IGF, IGF-1, IGF-BP-7, jagged, KAF,
 kalistatin, K-FGF, factor angiogénico de riñón, quinostatina, factor
 estimulante de migración, proteína/proliferina regulada de
 mitógeno, proteína-4 regulada de mitógeno, Monocito-Angiotropin,
 5 MRP/PLF, MRP-4, Neuroleuquina, Neuropilin-1, NKG5, NLK,
 Notch-1, Notch-4, ORF-74, factor de crecimiento ovárico, PAF,
 proteína relacionada con hormona paratiroidea, PD-ECGF, PDGF
 PDGF-BB, PEDF, PF4, PGI, factor de crecimiento de placenta de
 factor derivado de epitelio de pigmento, factor angiogénico
 10 placentar, factor-4 de plaqueta, factor de crecimiento celular
 endotelial derivado de plaqueta, PIGF, PrGF, Prokineticin-1,
 proteína relacionada con proliferina, factor estimulante de
 Prostaciclina, factor de crecimiento prostático, dominio PRP
 kringle-2 de protrombina, PTHrP, RNASE5, factor Scatter,
 15 semaforin-3, Sprouty, TAF, TAMF, TGF-alfa, TGF-beta, trombina,
 Trombospondina, TIE-1, TIE-2 factor de tejido, TNF-alfa, TNF-
 beta, inductor de apoptosis débil similar a TNF, Transferrina, TSP,
 factor de angiogénesis de tumor, factor de motilidad autocrina de
 tumor, Tumstatin, TWEAK, factor de angiogénesis uterino, factor
 20 de permeabilidad vascular, Vasculotropina, VEGF, VEGF-162,
 VEGF-C, VEGF-D, VEGF-E, VEGI, VPF

Muchos factores de crecimiento diferentes y citoquinas han
 mostrado ejercer actividades quimiotácticas, mitogénicas,
 modulares o inhibitoras en células endoteliales, célula muscular
 25 lisa y fibroblastos y, por lo tanto, puede esperarse que participen

en procesos angiogénicos en una manera u otra El proceso incluye la acción concertada de enzimas proteolíticas, componentes de matriz extracelular, moléculas de adhesión celular, y factores vasoactivos Los factores modulando el

5 crecimiento, conducta quimiotáctica y/o actividades funcionales de células musculares lisas incluyen Activina A, Adrenomedulin, aFGF, ANF, Angiogenin , Angiotensin-2 , Betacelulin, bFGF, CLAF, ECDGF (factor de crecimiento derivado de célula endotelial), ET (Endotelinas), Factor X, Factor Xa, HB-EGF, inhibidor derivado del

10 corazón de proliferación celular vascular, IFN-gamma, IL1, LDGF (factor de crecimiento derivado de Leiomioma), MCP-1, MDGF (factor de crecimiento derivado de macrófago, factor de crecimiento derivado de monocito), NPY, Oncostatina M, PD-ECGF, PDGF, Prolactin, Proteína S, SDGF (factor de crecimiento

15 derivado de célula muscular lisa), SDMF (factor de migración derivado de célula muscular lisa), Taquiquinins, TGF-beta, Trombospondin

Los factores modulando crecimiento, conducta quimiotáctica y/o actividades funcionales de células endoteliales vasculares

20 Incluyen AcSDKP, aFGF, ANF, Angiogenin, angiomodulin, Angiotropin, AtT20-ECGF, B61, bFGF, actividad inducida por bFGF, CAM-RF, ChDI, CLAF, ECGF, ECI, EDMF, EGF, EMAP-2, Neuregulin (ver EMMPRIN), Endostatin, inhibidor del factor de crecimiento endotelial, factor de mantenimiento de viabilidad

25 celular endotelial, Epo, FGF-5, IGF-2 (ver actividad promotora del

crecimiento para células endoteliales vasculares), HBNF, HGF, HUAF, IFN-gamma, IL1, K-FGF, LIF, MD-ECI, MECIF, NPY, Oncostatin M, PD-ECGF, PDGF, PF4, PIGF, Prolactin, TNF-alfa, TNF-beta, Transferrina VEGF Algunos de estos factores son factores de proteína detectados inicialmente debido a algunas otras actividades biológicas y después muestran promover angiogénesis La lista de factores de proteína angiogénicamente activos *in vivo* incluyen factores de crecimiento de fibroblasto (ver FGF), Angiogenin, Angiopoyetina-1, EGF, HGF, NPY, VEGF, TNF-alfa, TGF-beta, PD-ECGF, PDGF, IGF, IL8, Hormona de crecimiento Fragmento E de fibrina se ha mostrado también por tener actividad angiogénica Además hay factores tal como Angiopoyetina-1 que no se comportan como factores de crecimiento clásicos para células endoteliales pero juegan un papel prominente en procesos angiogénicos y vasculogénicos PF4 y un fragmento 16 kDa de Prolactina son inhibidores *in vivo*

Compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen compuestos endógenos incluidos en la formación y mantenimiento de los sistemas nervioso periférico y/o central, tales como factores neurotróficos que mejoran la diferenciación neuronal, inducen proliferación, influyen funciones sinápticas, y promueven la supervivencia de neuronas que se destinan normalmente a morir durante diferentes fases del desarrollo del sistema nervioso periférico y central Ejemplos de tales proteínas incluyen neurotrofinas, tales como BDNF (factor neurotrófico derivado del

cerebro), NGF, NT-3 (neurotrofin-3), NT-4, NT-5, NT-6, NT-7 CNTF (factor neurotrófico ciliar), GDNF (factor neurotrófico derivado de línea celular glial), y Purpurina Factores de crecimiento tales como bFGF o LIF también se encuentran de
5 manera frecuente entre las neurotrofinas debido a sus actividades tróficas en un número de neuronas

BDNF, NGF y NT-3 se refieren algunas veces también colectivamente como la familia de proteína NGF ya que NGF es el miembro fundador de esta familia de proteínas Ha sido posible
10 por combinación de elementos estructurales de NGF, BDNF y NT-3, formar la Pan-Neurotrofin-1 (PNT-1) multifuncional que activa eficientemente todos los receptores trk y despliega múltiples especificidades neurotróficas Otro factor de supervivencia neuronal es NSE (enolasa específica de neurona) Otros factores
15 con actividades neurotróficas normalmente no se clasifican como neurotrofinas y con frecuencia poseyendo un espectro más amplio de funciones son EGF, HBNF (factor promotor de neurita de unión a heparina), IGF-2, aFGF y bFGF, PDGF, NSE (enolasa específica de neurona), y Activina A Para factores de crecimiento
20 antiproliferativos afectando las células neurales ver también proteína antiproliferativa neural, Astrostatina, GGIF (factor de crecimiento inhibidor glial)

Dependiendo de sus bioactividades se hace una distinción entre los factores promotores de neurita (NPFs) y factores de
25 diferenciación neuronal Los factores promotores de neurita no

promueven la supervivencia neuronal o crecimiento general por ellos mismos sino que requieren además uno o más factores neurotróficos para inducir el crecimiento de procesos dendríticos o axonales. Los factores con actividad NPF incluyen NGF, S100, GMF-beta (factor de maduración glial), proteoglicanos, merosin, colágenos, moléculas de adhesión celular, y laminin.

Compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen compuestos endógenos incluidos en la curación de herida. Las plaquetas son una fuente rica de citoquinas y factores de crecimiento localmente activos. Entre otras cosas los factores derivados de plaqueta incluyen dinucleótido de adenosina (que induce la agregación de plaqueta y también estimula la migración y proliferación celular), Beta-Tromboglobulina, bFGF, CTAP-3 (proteína-3 de activación de tejido conector), EGF, polipéptido-1 quimiotáctico de eosinófilo (es decir, RANTES), f-ECGF (factor de crecimiento de célula endotelial derivado de fibroblasto) fibronectina (que sirve como un ligando de matriz temprano para agregación de plaqueta), HCl (inhibidor de colagenasa de humano), HGF (factor de crecimiento de hepatocito), HRF (factores de liberación de histamina), IGF-BP-3, NAP-2 (proteína-2 de activación de neutrófilo), NAP-4 (proteína-4 de activación de neutrófilo), PBP (proteína básica de plaqueta), PD-ECGF (factor de crecimiento de célula endotelial derivada de plaqueta), PDGF, PF4, factor de activación de plaqueta (PAF, incluido también en agregación de plaqueta), serotonin (que induce permeabilidad

vascular y es un quimioatrayente para neutrófilos), Somatostatin, TGF-alfa, TGF-beta, tromboxano A2 (que se incluye en vasoconstricción, agregación de plaqueta, y quimiotaxis), Vitronectin

5 Los leucocitos de sangre periféricos circulantes migran en el espacio de la herida. Las primeras células que aparecen en el área de la herida son neutrófilos. Los números de neutrófilo alcanzan niveles máximos aproximadamente 24 horas después de la lesión. Su migración se estimula por varios factores
10 quimiotácticos y citoquinas, incluyendo factores de complemento, IL1, TNF-alfa, TGF-beta, y quimioquinas tales como IL8, GRO-alfa, PF4, MCP-1, IP-10, mig, y también por polisacáridos bacterianos. Los neutrófilos se adhieren al endotelio por medio de selectinas, que funcionan como receptores de neutrófilo en la superficie de
15 célula endotelial. Los receptores de integrina en las superficies celulares de neutrófilo facilitan la unión de neutrófilos a la matriz extracelular. Los neutrófilos no parecen jugar un papel crítico en la curación de la herida en la ausencia de infecciones a medida que las heridas pueden curarse en animales en los cuales los
20 neutrófilos se eliminan. Los neutrófilos se remueven por macrófagos de tejido cuando no se necesitan más.

 Los monocitos aparecen aproximadamente 24 horas después de la lesión y tienen valores máximos 48 horas después de la lesión. Ya que los monocitos maduran en los macrófagos, pueden
25 considerarse una fuente esencial de citoquinas accionando los

procesos de reparación Los macrófagos y monocitos también se atraen por una variedad de quimioquinas Estas quimioquinas contribuyen a la infiltración espacial y temporalmente diferente de subconjuntos de leucocito y de esta manera integran los procesos

5 reparativos e inflamatorios durante la reparación de la herida

Los macrófagos de tejido son las células que esencialmente controlan y regulan el proceso de curación de la herida y las heridas no pueden curarse sin la participación de estas células como se muestra por los experimentos incluyendo eliminación de

10 macrófagos de herida La diferenciación de macrófagos se inicia por varias citoquinas específicas Muchas citoquinas producidas y secretadas por macrófagos activados favorecen la migración adicional de células inflamatorias en el área de la herida Los macrófagos también controlan la degradación de la matriz

15 extracelular y regulan la remodelación de la matriz de herida Los macrófagos secretan las citoquinas y factores de crecimiento incluyendo TGF-beta, FGF, VEGF, y quimioquinas tal como JE

TGF-beta parece ser el factor principal responsable de la formación de tejido de granulación y la síntesis de proteínas de la

20 matriz extracelular y de esta manera se ha referido como una "hormona de la herida" TGF-beta es un miembro de uno de los grupos más complejos de superfamilias de citoquina, consistiendo de varias isoformas de TGF-beta y otros miembros de la familia por ejemplo, Activina A y BMP La complejidad del proceso de

25 curación de heridas se ilustra por la observación que la

manipulación de las proporciones de miembros de la superfamilia de TGF-beta, particularmente la proporción de TGF-beta-1 en relación a TGF-beta-3, reduce la cicatrización y fibrosis

Re-epitelización se media por factores de crecimiento
5 mitogénicos y quimiotácticos de la familia EGF de factores de crecimiento Leptina se ha mostrado ser un factor de crecimiento potente para queratinocitos durante la curación de la herida

La fase final de la curación de la herida se caracteriza por el reemplazo gradual de los tejidos de granulación por tejido
10 conectivo Este proceso también requiere accionar localmente las citoquinas Sin embargo, poco se conoce acerca de los factores y mecanismos que limitan eventualmente el crecimiento del tejido una vez que el proceso de reparación se ha completado La síntesis de colágeno e inhibidores de proteinasa se estimula, entre
15 otras cosas por TGF-beta y factores relacionados El cierre de la herida y la evolución de una cicatriz se asocia con una disminución de golpe en celularidad, incluyendo desaparición de miofibroblastos típicos Se ha sugerido que la muerte celular por apoptosis es el mecanismo responsable de la evolución de tejido
20 de granulación en una cicatriz

La curación de la herida fetal es sobresaliente por su ausencia de cicatrización Existe alguna evidencia de que los fibroblastos adultos y fetales despliegan diferencias fenotípicas en términos de actividad migratoria, respuesta motogénica a
25 citoquinas y la síntesis de citoquinas motogénicas, factores de

crecimiento y macromoléculas de matriz

Al manipular las acciones del factor de crecimiento y citoquinas, es posible acelerar o modificar la curación de la herida. Los experimentos de animal y también experiencia clínica han demostrado que la administración tópica de varias citoquinas, incluyendo bFGF, EGF, KGF, PDGF, TGF-beta, ya sea solos o en combinación, acelera considerablemente la curación de la herida al estimular la formación de tejido de granulación y mejorar la epitelización.

Los compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen proteínas de fase aguda de inflamación. Los ejemplos adecuados de tales proteínas y sus funciones se proporciona en la Tabla 2.

Tabla 2

Proteína	Función
Glicoproteína de ácido alfa-1	Interacción con promotor de citogénesis de unión de crecimiento de fibroblasto de ciertos esteroides
Antitromboplasmin alfa-1	Inhibidor de proteasa
Antitrombina alfa-1	Inhibidor de proteasa Resolución de coágulos
Antiplasmina alfa-2	Modulación de cascada de coagulación
Macroglobulina alfa-2	Inhibidor de varias proteasas de suero y otras funciones
Antitrombina-3	Modulación de cascada de coagulación
Inhibidor C1	Control negativo de cascada de complemento
C2	Componente complemento
C4	Componente complemento
C4	Componente complemento
Proteína de unión C4	Componente complemento
C8	Componente complemento
C9	Componente complemento
Proteína reactiva C	Unión a complemento de activación complemento de fosforilcolina de membrana e interacción de opsonización con células T y células B
Ceruloplasmina	Depurador de cobre reactivo de proteínas de transporte de cobre
Factor VIII	Formación de coagulación de matriz de fibrina para reparación
Factor B	Componente complemento
Ferritina	Proteína de transporte de hierro
Fibrinógeno	Formación de coagulación de matriz de fibrina para reparación
Fibrinólisis	Formación de coagulación de fibrina
Haptoglobina	Depurador de hemoglobina
Hemo coagulación	Degradación hemo
Hemopexina	Unión hemo y proteínas de transporte
Colágeno-3 de heparina	Inhibidor de proteasa
Kallikreina	Permeabilidad vascular y dilatación
Proteína de unión LPS	Activación de célula de macrófago
Dismutasa de superóxido de manganeso	Formación de proteína de unión a zinc de cobre de especies de oxígeno reactivas
Proteína de unión a manosa	Lectina de suero
Plasminógeno	Activación proteolítica de complemento, coagulación, fibrinolisis
Inhibidor 1 de activador de plasminógeno	Inhibidor de proteasa
Protrombina	Formación de coagulación de matriz de fibrina para reparación
Anticóide A de suero	Colesterol y depurador HDL
Anticóide P de suero	Formación de complejos inmunes IgG
Factor von Willebrand	Proteína de coagulación
IL1ra (antagonista de receptor IL1)	IL1ra

Los inductores principales de proteínas de fase aguda son IL1, IL6, y TNF. Los dos mediadores IL1 y IL6 se han utilizado para clasificar las proteínas de fase aguda en dos subgrupos. Las proteínas de fase aguda tipo 1 son aquellas que requieren la acción sinérgica de IL6 e IL1 para síntesis máxima. Ejemplos de proteínas Tipo 1 son proteína C-reactiva, amiloide de suero A y glicoproteína de ácido alfa-1. Proteínas de fase aguda tipo 2 son aquellos que requieren IL6 solamente para inducción máxima. Ejemplos de proteínas Tipo 2 son cadenas de fibrinógeno, haptoglobina, y alfa-2-Macroglobulina. Expresión de genes codificando proteínas de fase aguda tipo 2 se suprime en lugar de mejorarse frecuentemente por IL1 (Ramadori *et al*, Fey *et al*). Los efectos aditivos, sinérgicos, co-operativos y antagonísticos entre citoquinas y otras sustancias mediadores que influyen la expresión de proteínas de fase aguda ocurren y se han observado en casi todas las combinaciones. Muchas citoquinas también muestran efectos diferenciales, induciendo la síntesis de una o dos proteínas de fase aguda pero no otros. Por ejemplo, Activina A induce un subconjunto de proteínas de fase aguda en células HepG2. Lipopolisacáridos bacterianos y varias citoquinas (principalmente IL1, IL6 y TNF pero también LIF, CNTF, oncostatin M, IL11, y cardiotrofin-1) se incluyen en la inducción de síntesis SAA y algunas de estas citoquinas actúan de manera sinérgica (Benigni *et al*).

IL1 y también IFN-gamma reducen algunos de los efectos de IL6. Algunos de los efectos de IL2 e IL6 se antagonizan por TGF-beta. La acción combinada de dos o aun más citoquinas que puede producir efectos que no tienen factor propio sería capaz de lograrse. En células de hepatoma HepG2 cultivadas, IL1, IL6, TNF-alfa y TGF-beta inducen la síntesis de antitripsina y al mismo tiempo reprime la síntesis de albumina y AFP (alfa-Fetoproteína). La síntesis de fibrinógeno se induce por IL6 y este efecto es, a su vez, suprimida por IL1-alfa, TNF-alfa o TGF-beta-1.

Compuestos objetivo endógenos adecuados incluyen compuestos endógenos incluidos en hemostasis y cascadas de coagulación. Aparte de incluirse en la regulación de permeabilidad capilar y los vasos el endotelio de los vasos sanguíneos juegan un papel decisivo para mantener una superficie no trombogénica al proporcionar activadores e inhibidores de coagulación y fibrinólisis. El endotelio también se incluye en modulación de varios procesos inmunológicos.

En células endoteliales IL1 induce, entre otras cosas, la síntesis de varios factores estimulantes de colonia, IL6, TNF-alfa, prostaglandinas, factor de activación de plaqueta (PAF), inhibidor de activador de plasminógeno (PAI). Un regulador endógeno importante de IL1 es PGE2 que inhibe secreción de IL1 y TNF-alfa. TNF-alfa, entre otras cosas, induce la síntesis de tromboplastina de tejido (TPL) que participa en la formación del complejo activador del factor X que cataliza la generación de trombina. El

complejo también activa el factor IX TNF-alfa también induce la síntesis de IL1 por células endoteliales y esta IL1 también puede promover la producción de TPL, por células endoteliales La síntesis de TNF-alfa también puede inducirse por IL1 TNF-alfa e IL1 también inducen la síntesis de antígenos de superficie celular La expresión de moléculas de adhesión incrementa la adhesión de linfocitos y leucocitos en la pared del vaso y facilita de esta manera la migración transendotelial de estas células TNF-alfa e IL1 subregulan el sistema de inactivación de Proteína C al inhibir la síntesis de trombomodulina La trombomodulina compuesta con trombina activa proteína C que puede entonces formar los complejos con proteína S unida por membrana Estos complejos inhiben el factor Va La proteína C activada también neutraliza el inhibidor de activador de plasminógeno (PAI) por composición TNF-alfa y también IL1 de esta manera reducen la inactivación del factor Va

Otros compuestos objetivo endógenos adecuados incluidos en coagulación incluyen Kallikrein, Factor XII, Factor XIb, Factor XI, Factor XIa, Factor IX, Factor IXa, Factor VIII, Factor VIIIa, Factor X, Factor Xa, Factor Va, Factor XIIIa, Protrombina Trombina, Fibrinógeno, Fibrina, Plasminigen, Plasmina

Compuestos objetivo endógenos adecuados también incluyen hormonas, tales como hormonas de tensión (por ejemplo Adrenalina, hormona Adrenocorticotrópica, Corticosterona Epinefrina, Hormona de Crecimiento, Hidrocortisona)

fluido/electrolito y hormonas vasculares (por ejemplo, Aldosterona, Androstenediona, Vasopresina, Bradiquinina, Calcitonina, Neurotensina), hormonas digestivas y de hígado (por ejemplo, Colecistoquinina, Colesterol, VIP), hormonas reproductivas (por ejemplo, Gonadotrophin Crónica, Epogen, Estradiol, Estríol, Estrona, Etiocolanolona, FSH, Hormona Lactogénica, Hormona Luteinizante, Testosterona, Oxitocina, Progesterona, Prolactina, Gonadotrofina), hormonas que manejan azúcar (por ejemplo, Glucagon Insulina), hormonas de tiroides (por ejemplo, T2, T3, T4, Hormona Tirotrópica, factor de liberación Tirotrópico, TSH, Hormona Paratiroidea), hormonas óseas (por ejemplo, CSF-1, RANK1, miembros de la familia de Proteína Morfogénica ósea), y otras hormonas, tales como, hormona estimulante de tiroides (TSH), hormona estimulante de folículo (FSH), hormona luteinizante (LH), Prolactina (PRL), hormona de crecimiento (GH), hormona Adrenocorticotrópica (ACTH), hormona Antidiurética (ADH) (vasopresina), Oxitocina, hormona de liberación de Tirotropina (TRH), hormona de liberación de Gonadotropina (GnRH), hormona de liberación de hormona de crecimiento (GHRH), hormona de liberación de corticotropina (CRH), Somatostatina, Dopamina, Melatonina, Tiroxina (T4), Calcitonina, hormona de paratiroide (PTH), Glucocorticoides (por ejemplo, Cortisol), Mineralocorticoides (por ejemplo, aldosterona), Andrógenos (por ejemplo, testosterona), Adrenalina (epinefrina), Noradrenalina (norepinefrina), Estrógenos (por ejemplo, estradiol), Progesterona,

gonadotropina crónica de humano (HCG), Insulina, Glucagón, Somatostatina, Amilina, Eritropoyetina (EPO), Calcitriol, Calciferol (vitamina D3), péptido Atrial-natriurético (ANP), Gastrina, Secretina, Colecistoquinina (CCK), Somatostatina, Neuropéptido Y, 5 Grelina, PYY3-36, factor de crecimiento-1 similar a insulina (IGF-1), Angiotensinogen, Trombopoyetina, Leptina, Proteína 4 de Unión a Retinol, y Adiponectina Además hormonas adecuadas se enlistan en la Tabla 3

Tabla 3

10	Glándula endócrina	Hormona	Abv	Función(es) principal(es)
	Pineal	Melatonina		Ritmo biológico
	Hipotálamo	Hormona antidiurética	ADH	Actúa en el riñón para conservar el agua y equilibrio de osmolaridad
		Proopiomelanocortina	POMC	Hormona precursora para ACTH y MSH
	Plutaria	Hormona luteinizante	LH	En mujeres esta LH actúa en el ovario para estimular la producción de estrógenos e inducir la ovulación. En hombres esta LH actúa en los testículos para estimular la producción de testosterona
		Hormona estimulante folicular	FSH	En mujeres FSH estimula la maduración de folículos ováricos. En hombres FSH actúa en células Sertoli y participa en la regulación de producción de espermatozoides
15		Hormona adrenocorticotrófica	ACTH	ACTH actúa en la glándula adrenal para estimular la producción de cortisol
		Hormona de crecimiento	GH	GH actúa de varios tejidos para estimular el crecimiento
		Prolactina	Pr	Leche durante la lactación
		Hormona estimulante de melanocitos	MSH	Estimula el tono de la piel
		Hormona estimulante de tiroides	TSH	TSH actúa en la glándula de tiroides para estimular la producción de tiroxina
	Páncreas	Insulina		Regula los niveles de azúcar en la sangre
	Tiroides	Tiroxina y triiodotironina	T3 y T4	Desarrollo del tracto reproductivo y cerebro, y regulación de metabolismo
	Adrenal	Cortisol		Supresión inmune y respuesta a estrés
		Dehidroepiandrosterona	DEA	
	Ovario	Estrógenos (estradiol, estrona, estrón)	E2, E1, E3	Promoción de crecimiento, mantener elasticidad de tejidos conectivos, conservar la masa ósea, y desempeño vascular
20		Progesterona	P4	Mantener endometrio en preparación para el embarazo
		Testosterona	T	Precursor de estrógeno actúa en libido
		Inhibina		Regulación de retroalimentación en secreción FSH de plutaria
	Testículos	Testosterona	T	Crecimiento de características sexuales secundarias del hombre, producción de espermatozoides y libido
		Dihidrotestosterona	DHT	Algunas características sexuales secundarias del hombre
		Inhibina		Regulación de retroalimentación en secreción de FSH de plutaria
	Placenta	Progesterona	P4	Mantener embarazo
		Estrón	E3	

25 Tabla 4 proporciona una lista no exhaustiva de compuestos

objetivo endógenos adecuados y terapéuticos preferidos para tener como objetivo el compuesto endógeno con un ligando como se describe en la presente. La columna de "Identificador Ejemplificativo" proporciona los Numeros de Registro de los Servicios de Resúmenes Químicos (CAS) (publicados por la Sociedad Química Americana) y/o Numeros de Acceso al Banco Genético ((por ejemplo, Locus ID, NP_XXXXX (Proteína de Secuencia de Referencia), y XP_XXXXX (Proteína de Modelo) identificadores disponibles en la página web del Centro Nacional para Información de Biotecnología (NCBI) www.ncbi.nlm.nih.gov) que corresponden a las entradas en el Registro CAS o bases de datos del Banco Genético que contienen una secuencia de aminoácidos del compuesto objetivo endógeno o de un fragmento o variante del compuesto objetivo endógeno. Las páginas de resumen asociadas con cada uno de estos Numeros de Acceso GenSeq y Banco Genético y CAS así como también las publicaciones periódicas citadas (por ejemplo, numero ID PubMed (PMID)) se incorporan cada una para referencia en sus totalidad, particularmente con respecto a las secuencias de aminoácidos descritas en la presente. La columna de "actividad biológica" describe las actividades biológicas asociadas con la molécula objetivo endógena. La columna "Indicación Preferida" describe la enfermedad, desórdenes, y/o condiciones que pueden tratarse, prevenirse, diagnosticarse, o mejorarse por un ligando que comprende una porción que tiene un sitio de unión con

especificidad de unión para el compuesto objetivo endógeno
Indicado

La invención también se refiere a un ligando que comprende una porción teniendo un sitio de unión con especificidad de unión para cualquiera de los compuestos objetivo endógenos enlistados en la Tabla 4 para utilizarse en la fabricación de un medicamento para tratar cualquiera de las indicaciones preferidas correspondientes descritas en la Tabla 4

La invención también se refiere a un método para tratar cualquiera de las indicaciones preferidas enlistadas en la Tabla 4, comprendiendo administrar a un sujeto en necesidad del mismo una cantidad efectiva de un ligando que comprende una porción teniendo un sitio de unión con especificidad de unión para el compuesto objetivo endógeno correspondiente enlistado en la Tabla 4

Tabla 4

Compuesto objetivo endógeno	Identificador	Actividad biológica	Indicación preferida
FGF ácido	LocusID:2246	Se une a las células que expresan el receptor del factor 1 de crecimiento de fibroblastos ácido	Enfermedad vascular
Activina (Activina A)	CAS-	El complejo de activina A, compuesto de un	Fractura postmenopáusicas
EDF inhibina beta A	114848-22-3 LocusID: 3624 NP_002183 XP_004532	Homonólogo de subunidades A beta de inhibina, es un inhibidor de secreción FSH pluriaria, que se ha mostrado que regula la proliferación de células estromal gonadal negativamente y tiene actividad supresora de tumor. Además, los niveles de suero de este complejo se han mostrado por reflejar el tamaño de los tumores de células de granulosa y pueden por lo tanto utilizarse como un marcador para enfermedad primaria así como también recurrente	Osteoporosis, cáncer, infertilidad en hombres, infertilidad en mujeres, anemia de células falciformes
Activina beta c (inhibina beta c)	LocusID: 3626 NP_006538 XP_006661	Subunidad de inhibina beta C es similar a las subunidades de inhibina/activina beta A y beta B y pueden ser parte de una superfamilia beta del factor de crecimiento de transformación	Desordenes neurodegenerativos, curación de heridas, regeneración del hígado
Desaminasa de adenosina	Locus ID:100 NP_000013 XP_006617	Desaminasa de adenosina cataliza la hidrólisis de adenosina en inosina	Deficiencia de desaminasa de adenosina en pacientes con inmunodeficiencia combinada severa (SCID)

5

10

15

20

25

Adiposina	CAB-6035-58-6 Banco Genético 223277 Banco genético: 223281	Adiposina se produce por el desdoblamiento secuencial de la pre- α -melanocortina (POMC) de proteína precursora. Adiposina juega un papel clave en la regulación de toma de alimentación a través de la activación del receptor de melanocortina 4 cerebral	Obesidad, cáncer
Proteína de señal Agouti	Locus ID:434 NP_001863 XP_008478	Proteína de señalización Agouti (ASP), codifica una proteína de 132 aminoácidos, MARN para la cual se expresa en testículos, ovarios, y corión, y a niveles inferiores en hígado, riñón, y piel. ASP interactúa con el gen de extensión (que codifica el receptor de melanocito para hormona estimulante de alfa-melanocito [alfa-MSH]), y expresión de ASP en cultivo celular bloquea la acumulación estimulada por alfa-MSH de cAMP en células de melanoma de ratón	Desórdenes de pigmentación obesidad
Glicosidas alfa (alfa-glucosidasa ácida, Pompea)	Locus ID:2848 NP_000143 XP_012708	Hidrolasa de enlaces alfa 1-6 en glucógeno; enzima de desramificación; degradación de almidón en músculo, hígado y otros tejidos	Enfermedad de Pompe
Alfa-galactosidas	Locus ID:2717	Desdoblamiento hidrolítico de residuos de galactosa	Enfermedad de Fabry
(Isas de arginosuccinato, beta-galactosidas: x-galactosidas A, galactosidas alfa: CC-galactosidas	NP_000180 XP_010108	De galactosilgalactosilglucosaminidasa de glicosilnglicolípido	
Hidrolasa alfa-L (Aluronidas: Luronidas: Luronidas: Luronidas-3-sulfatas)	Locus ID:3428 NP_000184	Hidrolasa es una enzima lisosomal que participa en la degradación de sulfato de dermatan y sulfato de heparan	Mucopolisacaridosis I mucopolisacaridosis II síndrome Hunter síndrome Hunter-Schaller síndrome Hunter
Angiopoietina 1	NP_001137	Angiopoietina 1 es un factor de crecimiento incluido en el control de angiogenesis a través de los receptores Tie	Desórdenes inflamatorios, desórdenes cardiovasculares
Angiopoietina 2	Banco genético: BAA88560	Angiopoietina 2 es un factor de crecimiento incluido en el control de angiogenesis a través de los receptores Tie	Cáncer
Angiotensina (angiotensina)	CAB-6050-06-6 Locus ID:3346 NP_000282 XP_004371	Angiotensina representa un fragmento interno de plasminógeno (conteniendo las primeras cuatro estructuras triptico). Las estructuras triptico combinadas o individuales han mostrado inhibir efectos en proliferación de células endotelial capilar	Tumores sólidos
Proteína-1 morfogénica endodonal (ADMP)	Banco genético: AAC69738 Banco genético: AAD62911	ADMP se relaciona con proteína-3 morfogénica pesa. Sus expresión aumenta durante la gastrulación y resulta en expresión dependiente de dosis de estructuras dorsal y anterior	Cáncer
Ligando APO2 (TRAIL)	Locus ID:3743 NP_003801 XP_003200	Glicoproteína tipo II de la superfamilia del ligando de factor de necrosis de tumor media la muerte celular. TRAIL puede inducir apoptosis e una amplia variedad de estímulos de células transformadas de diversos linajes, pero no parece matar células normales	Cáncer
Arrestan	Banco genético: AF72530	Arrestan funciona como una molécula anti-angiogénica al inhibir proliferación de células endotelial, migración, formación de tubo, y neovascularización Matrigel	Cáncer tumores sólidos
Arilulfatas B (BM102; N-acetilgalactosamina-4-sulfatas de humano recombinante: rhASB)	Locus ID: 411 NP_000037 Banco genético: AAB18068 Banco genético: CAA61272 Banco genético: AAAS1784 Banco genético: AAAS1779	Homodímero B de arilulfatas hidroliza los grupos sulfato de N-Acetil-O-galactosamina, sulfato de condroitina, y sulfato de dermatan. La proteína tiene como objetivo la fucosina. Los defectos en este gen causa síndrome Maroteaux-Lamy	Mucopolisacaridosis VI
Asparaginasa	CAB-130167-89-0 Banco genético: CAA61188	Asparaginasa es la enzima responsable de hidroliza de L-Asparagina	Leucemia linfoblástica aguda
Proteína 21 incrementando la permeabilidad bactericida	Locus ID:671 NP_001716 AAAS1841	Una proteína asociada a membrana similar a LBP, CETP y PLTP con actividad bactericida	Infección ocular fibrótica cáncer, trauma hemorrágico; infecciones intra-abdominales; infección meningococcal; meningococcal; otitis media; hepatocarcinoma leucoplasia
BDNF (factor neurotrófico derivado del cerebro)	Locus ID:627 NP_001700 XP_008027	Factor neurotrófico derivado de cerebro promueve la supervivencia de poblaciones neuronales que se ubican ya sea en el sistema nervioso central o directamente conectado con él	Espasmos labral amiotrófica; neurodegeneración

5

10

15

20

25

B-glucocerebrosidasa	CAS-143003-46-7 CAS-194248-87-2 Locus ID:2829 NP_000148 XP_002181	Glucocerebrosidasa (bata-glucosidasa) cataliza el retro de glucosa de glucosilceramida para formar ceramida	Enfermedad de Gaucher
BMP-2 (proteína morfogénica ósea; proteína relacionada con hueso)	CAS-193808-82-3 Locus ID:2830 NP_001181 XP_000428	BMP2 pertenece a la superfamilia beta de factor de crecimiento de transformación (TGFβ). La proteína morfogénica ósea induce la formación ósea. BMP2 es un gen candidato para la enfermedad dominante autosomal de fibrodysplasia (osteitis) esclerosis progresiva	Regeneración ósea; reparación de tejido y hueso; cáncer
BRCA1 (proteína supresora de tumor BRCA1)	Locus ID:872 NP_000788 XP_007013	BRCA1 un supresor de tumor en células de cáncer de mama de humano, es fosfoproteína nuclear que se asocia con helicasoma de polimerasa II. ARN BRCA1 funciona como un regulador transcripcional y también es una proteína similar a granina que funciona como una proteína inhibidora de crecimiento epitelial	Cáncer: cáncer de mama; cáncer de próstata; cáncer ovárico
BRCA2	Locus ID:878 NP_000850 XP_007138	BRCA2 un supresor de tumor en células de cáncer de mama de humano, es una fosfoproteína nuclear que se asocia con helicasoma de polimerasa II. ARN BRCA2 existe en un complejo dimerico con BRCA1 funciona como un regulador transcripcional y también es una proteína similar a granina que funciona como una proteína inhibidora de crecimiento epitelial	Cáncer: cáncer de mama; cáncer ovárico
Péptido relacionado con gen de calcitonina (CGRP)	CAS-83852-38-2 CAS-83852-38-3 Locus ID:786 Locus ID:787 Locus ID:27287 NP_001732 NP_000718 NP_000283 XP_000208 XP_000018 XP_004788	CGRP es un vasodilatador potente y un regulador de proliferación celular de endotelio y endotelial. Los efectos adicionales de CGRP incluyen secreción gástrica reducida, temperatura corporal incrementada, efectos anorécticos y efectos cronotrópicos e inotrópicos positivos en el corazón	Factores de riesgo: arritmias, falla cardíaca; hipertensión osteoporosis postmenopáusicas; enfermedad de Raynaud; hemorragia subaracnoide
Calreticulina	Locus ID:811 NP_004334 XP_000058 Banco genético: AH02500	Calreticulina es una proteína multifuncional que actúa como una proteína de unión a Ca ²⁺ principal en el lumen del retículo endoplásmico. Calreticulina puede actuar como un modulador importante de la regulación de transcripción genética por receptores de hormona nuclear	Cáncer: curación de herida
CD4	Locus ID:820 NP_000807 XP_000888	CD4 es una glicoproteína de superficie de célula T que juega papeles en interacciones de célula-célula en transducción de señal. CD4 una gp120 de VIH y es un receptor de superficie celular para entrada VIH	Infección de VIH
Ligando CD40	Locus ID:838 NP_000883 XP_010367	CD40-L se expresa en la superficie de células T. Regula la función de la célula B al interactuar CD40 en la superficie de célula B. Un defecto en este gen resulta en incapacidad de cambio de la clase de inmunoglobulina y se asocia con síndrome hiper IgM	Tumores sólidos: epiteliales; cáncer de cabeza y cuello; disordinas de inmunodeficiencia; linfoma de no Hodgkin; cáncer renal; carcinoma de célula renal; tumores sólidos; infecciones víricas
Proteínas de unión a quimioquina (CBP 1 CBP 2)	Locus ID:1238 NP_001287 XP_003138 Locus ID:1241 NP_000743 XP_007314	Proteínas de unión a quimioquina se incluyen en señalización mediada por quimioquina	Rechazo de trasplante; enfermedad cardiovascular; artritis reumatoide; disordenas inflamatorias; disordenas del sistema inmune
Factor neurotrófico ciliar (CNTF)	Locus ID:1270 NP_000808 XP_000012	CNTF promueve la diferenciación y supervivencia de un amplio rango de tipos de célula en el sistema nervioso	Esclerosis lateral amiotrófica; neuropatías diabéticas; enfermedad de Huntington; obesidad; disordenas retinianas; diabetes mellitus tipo 2
Conantostatina	CAS-183858-88-8	Conantostatina es una dinabegina dimerica única que antagoniza las integrinas	Metastasis de cáncer; trombosis; epilepsia
Proteína de unión al factor de liberación de corticotropina	Locus ID:1383 NP_001873 XP_003872 Banco genético: P24387 Banco genético: CAA41088	Factor de liberación de corticotropina (CRF) es un mediador central y periférico de inflamación y respuestas relacionadas con tensión. La proteína de unión a CRF inactiva CRF	Artritis reumatoide; inflamación

5

10

15

20

25

CTLA4	Locus ID:1483 NP_008308 XP_002480	CTLA4 es un receptor de ligando B7 normalmente expresado en células T activadas. CTLA4 lg es un receptor quimérico soluble con actividad antitumoral.	Rechazo de trasplante de órgano; alergias, artritis reumatoide, disordines de injerto contra huésped; psoriasis, diabetes mellitus tipo 1, rechazo de xenotrasplante.
Decorin	Locus ID:1834 NP_012239 XP_001811	Esta miembro de los colágenos especializados y familia BLRP es un proteoglican pequeño que interactúa con colágeno y factores de crecimiento, y se incluye en interacciones epiteliales/mesenchimales durante formación y desarrollo de órgano.	Cáncer neuropático diabético, disordenes inflamatorias, adhesiones después de cirugía, fibrosis pulmonar.
Del-1 (Locus-1 endotelial regulado de manera desarrollada; EDIL3, repeticiones como EGF y dominios similares a discodina 1 3)	Locus ID:10086 Banco genético: U70312 NP_003702 XP_003994	Un nuevo ligando para el receptor de Integrine alfa-beta 3 y puede funcionar para regular morfogenésis vascular o remodelación en desarrollo embrionario.	Isquemia, cáncer renal.
DNASE	CAS-143831 71-4 CAS-0003-08-8 CAS-132083-08-0 Locus ID:1773 NP_006214 XP_008087	Dnase es una endonucleasa que desdoba selectivamente ADN y remueve ADN de antígenos nucleares en sitios de alto cambio de célula.	Enfermedad pulmonar obstructiva crónica, fibrosis cística, nefritis de lupus.
Ectodermas (familia CD39: ectodermas de humano (ectoADPases); CD39-L2; CD39-L4	Locus ID: 983 Locus ID: 984 Locus ID: 986 Locus ID: 988 Locus ID: 987 NP_001787 NP_001237 NP_001238 NP_001239 NP_001240 XP_006712 XP_011771 XP_008438 XP_003286 XP_007435	Meda catabolismo de nucleótidos extracelulares.	Infarto al miocardio; apoplejía.
EGF (factor de crecimiento epidérmico)	CAS-82228-	EGF tiene propiedades reguladoras bifuncionales. Inhibe el crecimiento de varias células de tumor epitelial y estimula el crecimiento de fibroblastos y otros tipos de células.	Úlcera gástrica, curación de la herida, restenosis coronaria, restenosis vascular, cáncer de pulmón de célula no pequeña, psoriasis.
EMAP II (polipéptido II de activación de mancha endotelial)	Locus ID: 9288 Locus ID: 13722 NP_004748 XP_003380	EMAP-II es una citoquina derivada de tumor que inhibe angiogénesis, muestra propiedades de un mediador proinflamatorio, y ejerce efectos potentes en células endoteliales in vitro e in vivo.	Cáncer.
FGF 1	Locus ID:2248 NP_000791	FGF 1 estimula la proliferación y angiogénesis.	Enfermedad vascular periférica, enfermedad oclusiva arterial periférica, isquemia de miembro crítico.
FGF-2 (Factor de crecimiento de Saroblasto 2; fibroblasto)	CAS-131084-18-1 Locus ID:2247 NP_001887 XP_003308	Factor de crecimiento de fibroblasto. Factor de crecimiento angiogénico.	Disordenes coronarias, fractura, enfermedad periodontal, enfermedad vascular periférica, osteoporosis postmenopáusia, úlcera de la piel, apoplejía, enfermedad de arteria periférica, enfermedad de arteria coronaria.
Ugendo FL13	Locus ID:2323 NP_001480 XP_008821	Estimula el crecimiento y supervivencia de células progenitoras hematopoyéticas. Estimula el desarrollo de células dendríticas.	Quimioterapia, disordenes hematológicas, melanoma maligno, mieloidesplasia, síndrome de no Hodgkin, cáncer de próstata, movilización de célula germinal.
Follitropin	CAS-148478-72-3 CAS-88832-30-8 CAS-110908-00-8 CAS-180480-84-8 CAS-87048-13-0 Locus ID: 1081 Locus ID: 2488 NP_000728 NP_000901 XP_011444 XP_008318	Follitropin es una hormona de glicoproteína pluriactiva que estimula osteogénesis a través de una trayectoria cAMP.	Infertilidad femenina, infertilidad masculina.

5

10

15

20

25

GDNF (factor neurotrófico derivado glial: Neurturina)	Cas-185457-51-6 Locus ID:2888 NP_000608 XP_003703	Factor neurotrófico derivado glial (GDNF) es un miembro distante de la superfamilia del factor de crecimiento de transformación-beta (TGF-beta) que actúa de manera intracelular a través de Ret de quinasas de familia de receptor. GDNF es un factor de supervivencia potente para neuronas de dopamina de cerebro medio, motoneuronas, neuronas noradrenérgicas, así como también para neuronas simpáticas, parasimpáticas y sensoriales. Sin embargo, para la mayoría de las poblaciones neuronales, excepto para motoneuronas, TGF-beta es requiere como un cofactor para GDNF. GDNF también tiene funciones distintas fuera del sistema nervioso promoviendo la nutrición ureteral en desarrollo de pulmón y regulación de espermatogénesis.	Esclerosis lateral amiotrófica; enfermedad de Parkinson; enfermedad de Huntington
Gelsolina	Locus ID:2934 NP_000188 Banco genético: CAA38000	Gelsolina es una proteína dependiente de calcio que sirve y cubre filamentos de actina y se ha mostrado que reduce la viscosidad de espesa de fibrina clónica.	Bronquitis; fibrinólisis clónica
Factor de crecimiento glial 2 (GGF-2; Neuregulina 1)	Locus ID:3084 NP_038288 Banco genético: AAB58622	GGF2 es una isoforma de neuregulina 1 conteniendo una secuencia similar a la región más lg y dominios similares a EGF. El receptor GGF2 es un miembro de la familia ERBB de receptores de transmembrana de quinasas de tirosina. A través de la interacción con receptores ERBB, GGF2 juega un papel central en desarrollo glial y neuronal en el sistema nervioso central.	Esclerosis múltiple; neuropatía inducida por quimioterapia; neuropatía de SIDA; neuropatía diabética; neuropatías periféricas
Glucagón	CAB-18841-33-6 CAB-118546-37-4 Locus ID:2841 NP_002045 XP_002210	Glucagón es una hormona de péptido de 29 aminoácidos liberada en las células A de las isletas de Langerhans. Glucagón se produce en respuesta a una caída en la concentración de azúcar en la sangre. Su efecto es elevar glucosa de sangre. En el tratamiento de hipoglucemia severa en diabéticos dependientes de insulina glucagón causa que el hígado libere glucosa al estimular la conversión de glicógeno a glucosa. Glucagón también relaja el músculo liso gastrointestinal permitiendo exámenes radiológicos mejorados.	Hipoglucemia; diagnóstico de tracto gastrointestinal; diabetes mellitus; obesidad; diabetes mellitus tipo 2
HBNF (factor neurotrófico de unión a heparina; PTN; pleiotrofina; factor de crecimiento de unión a heparina 6; factor promotor de crecimiento de neurita 1; NEGF1)	Locus ID:3174 NP_0003816 Banco genético: AAA41311 Banco genético: M88816	HBNF estimula el crecimiento de neurita en neuronas y se expresa en una manera que se regula de manera desarrollada en el cerebro de la rata.	Neuropatías; enfermedades neurológicas
HCG (coriónico humano)	Locus ID: 1081	Gonadotropina coriónica de humano es un	Cáncer de mama; hiposí
Gonadotropina; hormona urinárea de embarazo; coriónica ovárea; APL)	Locus ID: 1082 NP_000726 NP_000728 XP_011444 XP_012803	heterodímero de una cadena alfa común y una cadena beta única (gonadotropina coriónica beta), que contiene especificidad biológica a un número de hormonas de glicopéptido incluyendo tirotrona, lutropina, follitropina y gonadotropina. Rotamente el heterodímero es funcional. Su función normal es estimular los ovarios para sintetizar los esteroides que son esenciales para el mantenimiento de embarazo.	Sarcoma; infertilidad femenina; hipogonadismo; infertilidad masculina
Proteína de choque térmico (HSP; HSP90; gp98)	Locus ID: 3316 Banco genético: M11717 Banco genético: M16432 Banco genético: X18183 Banco genético: M33716	Péptidos antigénicos de chaperona de proteínas de choque térmico en la trayectoria de desarrollo. Gp98 produce una respuesta de muerte específica de tumor cuando se combina con antígeno de tumor antigénico.	Tumores sólidos; cáncer colorrectal; cáncer gástrico; melanoma maligno; linfoma de no Hodgkin; cáncer pancreático; cáncer renal; sarcoma; epilepsia; neuroprotección; apoplejía
IL-1 (interleuquina-1 alfa; interleuquina-1 beta)	Locus ID: 3652 Locus ID: 3653 NP_000888 NP_000887 XP_010780	La interleuquina-1 de alfa (IL-1) produce un conjunto amplio de actividades biológicas que incluyen y promueven la respuesta humoral a lesión o infección, incluyendo fiebre, suero, pérdida de peso, síntesis de proteína de fase aguda, producción de quimioquinas, supresión de regulación de moléculas de adhesión, vasodilatación, el estado de pro-coagulante, hematopoyesis incrementada y producción y liberación de metaloproteínas de matriz y factores de crecimiento.	Infecciones bacterianas; úlcera péptica; rechazo de trasplante; cáncer; melanoma maligno; cáncer de pulmón no pequeño; preleucemia; quimioterapia; radioprotección

5

10

15

20

25

Antagonista del receptor IL 1	CAS-143060-02-0 Locus ID:3557 NP_000568 XP_010756	El antagonista del receptor IL1 es una proteína que se une de manera ávida a receptores IL1 sin activación de las células objetivo e inhibe la unión de IL1-alfa a IL1 beta. Como una consecuencia, la actividad biológica de estas 2 citoquinas se neutraliza en respuestas inflamatorias e inmunes patofisiológicas y fisiológicas	Artritis reumatoide; sarampión; diabetes mellitus; GVHD; desórdenes de intestino inflamatorio; inflamación ocular; psoriasis; choque séptico; trasplante; rechazo; desórdenes inflamatorios; desórdenes reumáticos; osteoporosis; sepsis
IL 10	Locus ID: 3586 NP_000563 XP_001406	IL 10 inhibe la síntesis de un número de citoquinas, incluyendo TN-gamma, IL-2, IL-3, INF y GM-CSF producidas por macrófagos activados y células T ayudantes	Enfermedades de intestino inflamatorio, lesión de pulmón aguda; desórdenes autoinmunes; cáncer; enfermedad de Crohn; desórdenes de injerto contra huésped; desórdenes de crecimiento; fibrosis hepática; hepatitis C; infecciones de virus simple de herpes; tratamiento de infecciones por VIH; leucemia; leucopenia; esclerosis múltiple; miocarditis; psoriasis; artritis reumatoide; sepsis; rechazo de trasplante; diabetes mellitus tipo 1; colitis ulcerativa; artritis reumatoide; enfermedades de intestino inflamatorias
IL 11	CAS-146641-28-0 Locus ID: 3606 NP_000632 XP_006906	Citoquina derivada de célula estromal. Inicialmente se caracteriza como una citoquina hematopoyética con actividad trombopoyética. IL-11 ahora ha mostrado expresarse y muestra acción pleiotrópica en células hematopoyéticas y otros tejidos múltiples, incluyendo cerebro, neuronas de médula espinal, intestino, y testículos	Trombocitopenia; rechazo de trasplante de médula ósea; enfermedad de Crohn; desórdenes de injerto contra huésped; desórdenes inflamatorios; mucositis; artritis reumatoide; síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducido por sepsis
IL 12	LocusID: 3592	IL 12 muestra antitumor antiviral, y	Cáncer; hepatitis C,
Proteína de unión IL18	Locus ID: 10068 NP_000680 XP_000606	Proteína de unión a IL18 inhibe la respuesta de citoquina Th1 temprana es un miembro de la superfamilia de inmunoglobulina	Enfermedad autoinmune; inflamación; artritis reumatoide
IL2	LocusID: 3565	Se une a y activa las células expresando el receptor IL2	Infección por cáncer; artritis reumatoide; cáncer
IL-4	LocusID: 3585	Se une a y activa las células expresando el receptor IL4	Cáncer; inmunodeficiencia aguda
Receptor IL-4	Locus ID:3566 NP_000406 XP_000766	Se une a y puede bloquear la actividad de IL4 que tiene un amplio rango de efectos incluyendo inducir células B para proliferar e inducir producción de citoquinas; inducir la maduración de foliculos, activación de células T maduras; células NK; modula mielopoyesis; mejora de coagulación y generación de célula germinal; proliferación de células endoteliales	Alergia; desórdenes de injerto contra huésped; hipersensibilidad
IL-6 (interleucina-6)	Locus ID:3576 NP_000575 XP_003801	IL-6 interleucina 6 es una citoquina que juega un papel en quimiotaxis y activación de neutrófilos. Tiene similitud a varios factores derivados de plaqueta	Inducción de labor
Interferón gamma	CAS-06060-02-1 Locus ID:3458 NP_000610 XP_006683	Actividades inmunomoduladoras, antivirales y anti-virales	Infecciones serias asociadas con enfermedad granulomatosa crónica; sepsis; osteoporosis maligna; tuberculosis; dermatitis atópica; enfermedad granulomatosa crónica; criptococo; fibrosis cística; quistes; melanoma maligno; infecciones micobacterianas; micosis; cáncer ovárico; fibrosis pulmonar; cáncer renal; cáncer de pulmón de célula pequeña; esclerodermia sistémica; fungos de micosis; cáncer de piel
Interferón omega	Locus ID:3467 NP_002168 XP_005411	Regula defensa antiviral, crecimiento celular y activación inmune, miembro de la familia de proteínas de interferón tipo I	Cáncer; hepatitis C
Proteína 10 Inducible por Interferón	Locus ID:3627 NP_001356 CAA36370	Proteína inducible por IFN-gamma es un miembro de la familia de quimioquina C-X-C, y tiene actividad quimiotáctica y mitogénica	Leucemia
Interleucina 3	CAS-146641-02-5 CAS-181753-30-6 Locus ID:3562 NP_000579 XP_003762	Interleucina-3 (factor estimulante de colonias) es un miembro de una familia de factores de crecimiento que juega un papel en hematopoyesis. Es capaz de soportar un amplio rango de tipos celulares hematopoyéticos	Cáncer; desórdenes hematológicos; enfermedades hematológicas; preleucemia; enfermedad de Hodgkin; leucemia mieloide, linfoma de no Hodgkin; trombocitopenia; quimioterapia; radioterapia

5

10

15

20

25

KGF-1 Factor de crecimiento de queratino 1)	Locus ID: 2252 NP_002000	Factor de crecimiento de queratino 1 (KGF-1) es un mitógeno de humano que es específico para células epiteliales. Tiene las propiedades de un mediador estromal de proliferación de células epiteliales	Quimio protección; Desórdenes de injerto contra huésped; mucositis
Inhibidor de proteasa Kunitz 1 (KPI 1)	Locus ID: 6892 NP_003701 XP_007548	Inhibidor de proteasa Kunitz 1 es un inhibidor potente específico para activador HGF y se piensa que se incluye en regulación de activación proteolítica de HGF en tejidos lesionados	Trombosis, antitromboticos
Lactoferrina (Apolactoferrina)	Locus ID: 4087 NP_002334 XP_010863	Lactoferrina, un miembro de la familia de transferrinas, transporta hierro en fluido extracelular y tiene propiedades antivirales y antibacteriales	Dermatitis de contacto alérgico; Infecciones bacterianas; desórdenes cardiovasculares; desórdenes de coagulación; ojo seco; gastritis; hepatitis C; psoriasis
Leptina	Locus ID: 3882 NP_000221 XP_004826	Secretada por células de grasa. Control de obesidad. Modulación de toma de alimento, reducción de peso corporal, y disminución de nivel de glucosa e insulina	Obesidad; diabetes mellitus tipo 2; desórdenes vasculares; desórdenes inmunológicos; inmunosupresión
Factor inhibidor de leucemia	Locus ID: 3876 NP_002300 XP_008816	Factor inhibidor de leucemia es una citoquina que induce diferenciación de mielocito. LIF actúa junto con BMP2 en células progenitoras neurales fetales primarias para inducir astrocitos	Infertilidad femenina; desórdenes neuromusculares
Plasminógeno Lys troncado (plasminógeno recombinante)	Locus ID: 8340 NP_000282 XP_004371	Una forma truncada más reactiva de plasminógeno. El plasminógeno es el precursor de plasmina, una proteasa de serina que digiere fibrina en coágulos	Trombosis; desórdenes occlusivos arteriales
Maspin	CAS-167687-21 1 Locus ID: 8368 NP_002830 XP_008742	Un inhibidor de proteasa de serina que suprime metástasis de tumor al inhibir angiogénesis	Cáncer; cáncer de mama; cáncer de próstata
Metaloninas	CAS-43616-35-1 Banco genético: AAB03240	Metaloninas cataliza reacciones de eliminación α , gamma de homocisteína y sus derivados sustituidos β así como también reacciones de eliminación α , beta de cisteína y sus derivados. También cataliza las reacciones de intercambio entre el sustituyente en el carbono gamma de sustratos de homocisteína y alaninóides exógenamente agregados, formando las α -glutinhomocisteínas β correspondientes. También cataliza reacciones de intercambio beta similares entre cisteína y alaninóides	Cáncer; cáncer gastrointestinal; cáncer de pulmón de célula no pequeña; cáncer pancreático
Proteína de transferencia microsomal	Locus ID: 4347 NP_000244 XP_003363	MTP codifica la subunidad grande de la proteína de transferencia de triglicérido microsomal heterodimérico. La isomerasa de disulfuro de proteína (PDI) completa la proteína de transferencia de triglicérido microsomal heterodimérica, que se ha mostrado que juega un papel central en ensamblaje de lipoproteína	Desórdenes lipídicos
Quimera de tesina de difuria MSH	Locus ID: 8443 NP_000830 XP_002484 K01722 AAA32182	Se une a y mata células expresando el receptor MSH	Cáncer
Factor de crecimiento de nervio (NGF)	Locus ID: 4803 NP_002487 XP_002122	Un factor de crecimiento con papeles en diferencia neuronal y supervivencia	Neuropatía sensorial asociada a VIH; neuropatía diabética; desórdenes neurodegenerativos
Endopeptidasa neutral (NEP)	CAS-82707-34-8 Locus ID: 4311 NP_000883 NP_008216 NP_008219 NP_008220 NP_003136 NP_003137 NP_003138 XP_003139	Endopeptidasa neutral es una glicoproteína de transmembrana tipo II 100 kD que es particularmente abundante en riñón donde está presente en el borde de los túbulos próximos y en epitelio glomerular. NEP clivaja los péptidos en el lado amino de residuos hidrofóbicos e inactiva varias hormonas de péptido incluyendo glucagón, encefalina, sustancia P, neuropeptina, calcitona, y bradiquinina	Cáncer; migraña; enfermedad de intestino inflamatorio; infección; asma; enfermedad respiratoria; cáncer de pulmón; cáncer de pulmón de célula pequeña
NIF (factor inhibidor de neutrófilo)	Banco genético: AAA27788	NIF es un inhibidor de glicoproteína de un número de funciones de neutrófilo, tal como adhesión a células endoteliales y liberación dependiente de adhesión de peróxido de hidrógeno. Estos efectos funcionales resultaron de su unión específica a α -glutinhista2 pero no a otras integrinas beta2. NIF ha mostrado ser efectivo para atenuar los efectos dañinos de activación de neutrófilo excesiva, tal como daño de tejido y lesión de repartición de leucemia en modelos animales	Apoplejía

5

10

15

20

25

Noggin	Locus ID: 8241 NP_008441 XP_008161	Noggin une e inactiva los miembros de la superfamilia de señalización de la vía del factor-bata de crecimiento de transformación (TGF-beta), tal como una proteína-4 morfológica (BMP-4)	Fibrodiseplasia osificante progresiva; crecimiento óseo anormal; crecimiento óseo patológico
NT-3 (neurotrofina 3)	Locus ID: 4808 NP_002816	NT-3 es un miembro de una familia de factores neurotróficos, neurotrofinas, que controlan la supervivencia y diferenciación de neuronas de miembro. Este gen es relacionado de manera cercana con tanto el factor de crecimiento nervioso como el factor neurotrófico derivado del cerebro. La proteína codificada por este gen puede incluirse en el mantenimiento del sistema nervioso adulto, y afecta al desarrollo de neuronas en el embrión que se expresa en placenta de humano	Neuropatías entéricas; neuropatías diabéticas; trastornos del nervio periférico
Proteína 1 osteogénica (OP-1)	Locus ID: 668 NP_001710 XP_012943	OP-1 es un miembro de la superfamilia de factor-bata de crecimiento de transformación de moléculas reguladoras que señala a través de la serie de receptores/guías de leucina para estimular las respuestas celulares. Sus efectos incluyen expresión VEGF incrementada por células calvarias fetales y crecimiento dendrítico incrementado en neuronas corticales cerebrales	Fracturas agudas; reparación de cartilago; trastornos reproductivos; reconstrucción ortopédica; enfermedad de Parkinson Reparación de tejido periodontal; falta renal; fusión espinal; apoptosis; regeneración de dentina dental; no uniones de hueso largo
Osteoprotegrina (factor inhibidor osteoclastogénico)	Locus ID: 4882 NP_002637 Locus ID: 7941 NP_008076 XP_004462	Osteoprotegrina inhibe osteoclastogénesis y resorción ósea, e induce proliferación de fibroblastos. Factor de activación de plaqueta acilhidrolas inactiva el factor de inhibición de plaqueta y fosfolípidos relacionados	Trastornos de hueso; dolor de cáncer; osteoporosis postmenopáusicas; saram por artritis reumatoide; osteoartritis reumatoide; enterocolitis aguda; síndrome de distensión respiratoria; síndrome alérgico; trastornos de intestino inflamatorio; isquemia/reperfusion; pancreatitis; síndrome de respuesta inflamatoria sistémica inducida por sepsis; conservación de órgano sólido; diabetes mellitus tipo 1
Parchado (receptor hedgehog)	Locus ID: 8727 NP_000266 XP_008574	Parchado, el receptor para hedgehog análogos, es un supresor de tumor que controla la formación y crecimiento de desarrollo	Cáncer celular básico; cáncer cerebral
PDGF (PDGF-β)	CAS-188101-61-6 Locus ID: 6164 Locus ID: 6166 NP_002886 NP_002889 XP_008997	PDGF-β es un mitógeno potente y agente de transformación. Actúa a través de la quinasas de tirosina de receptor PDGF para ejercer sus efectos de transformación y mitogénicos	Úlceras neurotróficas diabéticas de extremidad inferior; úlceras decúbito; úlceras de pie diabético; úlceras de estasis venosa; enfermedad de periodontal; úlcera de la piel
PEDF (factor derivado de epitelio de pigmento)	Locus ID: 6178 NP_002906	Factor derivado de epitelio de pigmento es un miembro no inhibidor de la familia serpin de inhibidores de proteasa de serina. Actúa como un factor promotor de muerte por un mecanismo diferente a la inhibición de proteasa de serina	Eclerema lateral amiotrófico; enfermedades de ojo inflamatorias; enfermedades de ojo vasculares; enfermedades de ojo degenerativas; enfermedades de ojo distroficas; neuropatías
Inhibidor activador de plasminógeno (inhibidor 1 de activador de plasminógeno)	Locus ID: 6064 NP_000883 XP_004828	Inhibidor de activador de plasminógeno 1 regula fibrinolisis al inhibir la conversión de plasminógeno inactivo a plasmina. El inhibidor de activador de plasminógeno 1 es un miembro de la familia serpin de inhibidores de proteasa de serina	Hemorragia
Proseptide	Banco genético: AAG31839 PubMed PMID: 8114088	Proseptide es un péptido neurotrófico (TXLIDNNATEELY donde D igual a O-alanina) derivada de pro-septina	Neuropatía diabética; dolor; trastornos del sistema nervioso central
Relaxina (relaxina humana)	Locus ID: 8013 Locus ID: 8019 NP_008842 NP_006060 XP_011804 XP_006812	Relaxina es una hormona de péptido sintetizada en corpora lutea de ovarios durante el embarazo y se libera en la corriente sanguínea antes del parto. Su efecto biológico principal es remodelar el tracto reproductivo femenino para facilitar el proceso de nacimiento	Eclerodermis; infertilidad; falta audición congénita; trastornos de labor; trastornos de arteria periférica; fibrosis pulmonar; hipertensión pulmonar

5

10

15

20

25

Antígeno B retinal (arrestina retinal)	Banco genético: AAA30378	Antígeno B Retinal es una proteína fotorreceptora que se une a rodopsinas fotorreceptoras y juega un papel en desactivar la cascada de fototransducción	Uveítis
Hormona luteinizante de humano	LocusID: 1581 LocusID: 3872 NP_000728 NP_000886 XP_011444 XP_008418	MLH es un dímero de hormonas plurales constituido de subunidades alfa y beta que se secan no covalentemente. Sus efectos principales son la maduración de ovocitos y la secreción de estrógeno y progesterona por células ováricas	Infertilidad
Serupsina	CAS-88148-86-8 Banco genético: CAA01818	Serupsina es un activador de plasminógeno del tipo uroquinasa recombinante de cadena sencilla sin glucosar	Infarto al miocardio
Receptor complemento soluble tipo 1	Locus ID: 1378 NP_000884 XP_000842	Receptor complemento tipo 1 (receptor C3b/C4b) es el receptor para ligandos revestidos con C3b y C4b. Carece de transmembrana y durante el desarrollo inhibe la actividad de convertase C3 y C5 al unir preferentemente C4b y C3b	Infarto al miocardio; síndrome de distensión respiratorio agudo; síndrome de distensión respiratorio agudo; rechazo de aloinjerto; coagulación intravascular diseminada; rechazo de trasplante de pulmón; esclerosis múltiple; lesión de reparación; artritis reumatoide; lupus sistémico; eritema; rechazo de xenotrasplante
Hedgehog sóico (hedgehog)	Locus ID: 8488 NP_000184 XP_004842	Hedgehog sóico juega un papel central en la formación del embrión. Ocurre como un precursor inactivo que debe desdoblarse de manera proteolítica y modificarse para volverse activo como una molécula de señalización. El receptor para hedgehog sóico se parcha, una proteína de transmembrana de múltiples pasos, y objetivos aguas debajo de hedgehog sóico son factores de transcripción como Gli3	Enfermedad de Parkinson; trastornos neurológicos; alzheimer
Estreptocinas	Banco genético: CAA28622 Banco genético: CAA01338	Estreptocinas es una proteína de dominio único que activa proteolíticamente plasminógeno	Infarto al miocardio; trastornos occlusivos arteriales; apopleja
Factor de célula germinal (ligando de equipo)	CAS-18348-38-4 NP_003888	SCF es substancialmente necesario para supervivencia de célula germinal e induce la proliferación de célula germinal in vitro. En la presencia de SCF las células germinales predominantemente producen citoquinas pro-inflamatorias incluyendo factor de necrosis de tumor (TNF)-alfa, IL-1, IL-6, IL-8, IL-10 e IL-18.	Movilización de células progenitoras antes de PBCT en cáncer de mama; junto con neuropom; movilización de célula germinal; anemia; rechazo de xenotrasplante
Estreptocinas	CAS-8003-01-1 Banco genético: E03308	Estreptocinas es una molécula de dominio 3 (alfa, beta, gamma), que no activa proteolíticamente plasminógeno humano (h) y protege la plasma de inactivación por antiplasmin-alfa2	Infarto al miocardio; coágulos sanguíneos; embolismos pulmonares
Dismutasa de superóxido	CAS-8018-01-7 LocusID: 8847 LocusID: 8848 LocusID: 8849 NP_000448 NP_000627 NP_003083 XP_008723 XP_004342 XP_003678	Dismutasa de superóxido de zinc de cobre es una proteína intracelular que cataliza la dismutación de superóxido a peróxido de hidrógeno y oxígeno	Aster; displasia broncopulmonar prematura; quemaduras; trastornos de ojo; lesiones de cabeza; síndrome de distensión respiratorio de infante; trastornos inflamatorios; trastornos de riñón; infarto al miocardio; trastornos del corazón izquierdo; lesión por reparación; trastornos respiratorios; apopleja; trastornos autoinmunes; lesión de pulmón aguda; tratamiento de infecciones por VIH; esclerosis lateral amiotrófica; virus sincicial respiratorio; cistitis; radioprotección; trastornos reumáticos
Receptor T1/ST2 (receptor T1/ST2)	Banco genético: P14718	T2/ST2 es un miembro de la familia IL-1R, preferentemente expresado en la superficie de células Th2 y juega un papel importante en la activación de células Th2	Aster; alergia
TGF Beta 1 (Factor de crecimiento de transformación-beta)	Locus ID: 7040 NP_000881 XP_008812	Regula la proliferación celular diferenciación y apoptosis en numerosos tipos celulares	Enfermedad de Alzheimer; esclerosis; cáncer; trastornos de piel; lupus sistémico; eritema; rechazo de trasplante

5	TGF Beta 2 (Factor de crecimiento de transformación-beta 2)	Locus ID: 7042 NP_003228 XP_001794	Factor-beta 2 de crecimiento de transformación (TGF-beta 2) se ha encontrado que inhibe síntesis de óxido nítrico inducible (iNOS) de transcripción de gen esp. en células de músculo liso de rat estimulado de beta 1-interleuquina (IL1 beta), y a una dosis que no inhibe NOS constitutivo	Heridas crónicas; mucositis; degeneración muscular relacionada con la edad; enfermedades de autoinmune; cáncer úlcera de pie diabético; enfermedades de ojo; esclerosis múltiple; osteoporosis postmenopáusicas; artritis reumatoide; enfermedades de la piel; rechazo de trasplante
	TGF Beta 3 (Factor de crecimiento de transformación-beta 3)	Locus ID: 7043 NP_003230 XP_007417	Factor-beta 3 de crecimiento de transformación es una citoquina que transmite señales mitogénicas a través de la serie de transmembrana/quinasas de teorina. TGF beta 3 es requiere para desarrollo normal del pulmón y plaqueta	Heridas crónicas; mucositis; artritis; radioprotección
	Trombopoietina	Locus ID: 7068 NP_000481 XP_002816	Trombopoietina se une al receptor c-Mpl y regula el desarrollo de megacariocitos	Termocliperia; quimioterapia
	Tie-2 (Tie, quinasas de célula endotelial interna tónica)	Locus ID: 7010 NP_000460 XP_006480	Tie-2/Tek, la quinasas de tirosina de receptor de angiopoietina media señalización intracelular y respuestas angiogénicas después de la estimulación por angiopoietina	Cáncer
10	Inhibidor de trayectoria de factor de tejido	Locus ID: 7038 NP_008278 XP_002872	Inhibidor de trayectoria de factor de tejido es un inhibidor de coagulación asociado con lipoproteína. Es un inhibidor de proteasa de tipo Kuritz que inhibe la formación de coágulo de fibrina	Sepsis; enfermedades de coagulación; lesión de reparación; arterioesclerosis
	TNFAi1b	Locus ID: 7124 NP_000886 XP_011402	TNF juega un papel central en la fisiología de sepsis. Altos niveles de TNF está en correlación con severidad de enfermedad incrementada en infección bacteriana severa y señalización de TNF está de manera puede conducir a activación de NF kappa B e inducción de apoptosis	Cáncer; cáncer CNS; linfoma; cáncer de piel; cáncer urogenital
	Proteína de unión a TNF	NP_001058	Proteína de unión a TNF inhibe la activación del receptor TNF al competir por la unión a TNF	Artritis reumatoide; lesión de reparación; enfermedades autoinmunes; enfermedad de Crohn; malaria; lesión de reparación; choque séptico
	Receptor TNF soluble	CAS-188343-88-0 LocusID: 7132 LocusID: 7133 NP_001088 NP_001057 XP_006880 XP_001743	Receptor de factor de necrosis de tumor media respuestas celulares proinflamatorias en respuesta a estimulación TNF	Artritis reumatoide; esquizofrenia; enfermedades cardíacas; infecciones de VIH 1; artritis reumatoide juvenil; psoriasis; artritis psoriásica; choque séptico; rechazo de trasplante; sarampión
15	t-PA	CAS-105887-23-8 CAS-171870-23-8 CAS-168816-23-8 CAS-161912-42-4 CAS-133882-38-7 CAS-191888-84-0 Locus ID: 8327 NP_000821 NP_000822 XP_006824	Activador de plasminógeno tipo tejido; proteasa de serina que convierte al plasminógeno inactivo a plasmina	Embolismo; infarto al miocardio; esquizofrenia; trombosis; falla cardíaca congestiva; enfermedades cardíacas isquémicas; reestenosis coronaria
	Interferón de trofoblasto (interferón tau; IFN-tau; trofoblastina)	Banco genético: A63746	Incluido en crecimiento celular placentar y diferenciación, así como proteger el feto en ambientes virales	Tratamiento de infecciones por VIH; esclerosis múltiple
	Troponina I	Locus ID: 7135 NP_003272 XP_001818 LocusID: 7138	Troponina I es una proteína reguladora que previene la interacción de actina y miosina en tejido muscular en reposo. Troponina I una subunidad de inhibidora de troponina	Metástasis de cáncer; retinopatía diabética; enfermedades de ojo; degeneración muscular; tumores sólidos
	Óxido de urea	LocusID: 7377 Banco genético: 884086	Óxido de urea es una enzima que cataliza la oxidación de ácido úrico	Quimioterapia; prevención y tratamiento de uricemia relacionada con quimioterapia; intestino
20	Uroquinasa (pre-uroquinasa)	CAS-9036-63-8 Locus ID: 8328 NP_002849 XP_011881	Uroquinasa actúa como un activador de plasminógeno incluido en regulación de coagulación de sangre. Es una proteasa de serina que desdota al plasminógeno para formar plasmina	Después de catéter; reestenosis coronaria; retinopatía diabética; infarto al miocardio; trombosis; hemorragia vítreas; enfermedades vasculares periféricas; esquizofrenia
	VEGF 1 (VEGF 121)	LocusID: 7422 LocusID: 7423 LocusID: 7424 NP_003387 NP_003388 NP_005420 XP_004612 XP_006638 XP_003488	VEGF 1 es un factor de crecimiento que induce proliferación celular endotelial y permeabilidad vascular	Enfermedad cardiovascular; enfermedades vasculares; tratamiento de fractura
25				

Las listas presentadas de compuestos objetivo endógenos por ningún medio son exhaustivas. Donde un ligando se une a dos epítopos (en los mismos o diferentes antígenos), el(los) antígeno(s) pueden seleccionarse de esta lista. En modalidades

5 particulares, el ligando comprende un dAb que une TNFR1 y un segundo dAb o dominio de unión a epítopo que une cualquiera de estos antígenos. En tales modalidades, el ligando multiespecífico puede comprender cualquier combinación de dominios variables de inmunoglobulina (por ejemplo, V_HV_H , V_HV_L , V_LV_L)

10

Ligandos y monómeros dAb que une albumina de suero

La invención proporciona un ligando o monómero de dAb (por ejemplo, ligando específico dual comprendiendo tal un dAb) que se une a albumina de suero (SA) con K_d de 1 nM a 500 μ M (es decir, x

15 10^9 a 5×10^4), preferentemente 100 nM a 10 μ M. Preferentemente, para un ligando específico dual comprendiendo un primer dAb anti-SA y un segundo dAb a otro objetivo la afinidad (por ejemplo K_d y/o $K_{apagada}$ como se mide por resonancia de plasmón de superficie, por ejemplo utilizando BiaCore) del

20 segundo dAb para su objetivo de 1 a 100000 veces (preferentemente 100 a 100000, más preferentemente 1000 a 100000, o 10000 a 100000 veces) la afinidad del primer dAb para SA. Por ejemplo, el primer dAb une SA con una afinidad de aproximadamente 10 μ M, mientras el segundo dAb une su objetivo

25 con una afinidad de 100 pM. Preferentemente, la albumina de

suero es albumina de suero de humano (HSA) En una modalidad, el primer dAb (o un monómero dAb) une SA (por ejemplo, HSA) con K_d de aproximadamente 50, preferentemente 70, y más preferentemente 100, 150 o 200 nM

- 5 En ciertas modalidades, el monómero de dAb que une SA resiste agregación, se desdobla de manera reversible y/o comprende una región de estructura como se describe arriba para monómeros de dAb que unen TNFR1

10 Formatos de ligando

- Ligandos y monómeros de dAb pueden formatearse como anticuerpos mono o multiespecíficos o fragmentos de anticuerpo o en estructuras sin anticuerpo mono o multiespecíficos Los formatos adecuados incluyen, cualquier estructura de polipéptido adecuada en la cual un dominio variable de anticuerpo o una o más de las CDRs de la misma puede incorporarse para conferir la especificidad de unión para antígeno en la estructura Una variedad de formatos de anticuerpo adecuados se conocen en la materia, tales como, formatos similares a IgG, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos biespecíficos, cadenas de pesada de anticuerpo, cadenas de ligera de anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas de anticuerpo y/o cadenas ligeras, fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de lo anterior (por ejemplo, un fragmento Fv (por
- 15
- 20
- 25

ejemplo, Fv (scFv) de cadena sencilla, Fv unido a disulfuro), un
fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un
dominio variable sencillo (por ejemplo, V_H, V_L, V_{HH}), un dAb, y
versiones modificadas de cualquiera de lo anterior (por ejemplo,
5 modificados por la unión covalente de glicol de polialquileno (por
ejemplo, glicol de polietileno, glicol de polipropileno, glicol de
polibutileno) u otro polímero adecuado) Ver, PCT/GB03/002804,
presentada el 30 de Junio de 2003, que designa los Estados
Unidos, (WO 2004/081026) considerando PEGilados de dominios
10 variables unicos y dAbs, métodos adecuados para preparar los
mismos, incrementa la vida media *in vivo* de los dominios variables
unicos PEGilados y monómeros dAB y multímeros La enseñanza
completa de PCT/GB03/002804 (WO 2004/081026), incluyendo las
porciones referidas arriba, se incorpora en la presente para
15 referencia

El ligando puede formatearse como un dímero, trímero o
polímero de monómeros de dAb deseados, por ejemplo utilizando
un enlazador adecuado como (Gly₄Ser)_n, donde n = de 1 a 8, por
ejemplo 2 3, 4, 5, 6 o 7 Si se desea, ligandos, incluyendo
20 monómeros de dAb, dímeros y trímeros, pueden unirse a un
anticuerpo región Fc, comprendiendo uno o ambos dominios C_H2 y
C_H3, y opcionalmente una región de andamio Por ejemplo, los
vectores que codifican ligandos unidos como una secuencia de
nucleótido única a una región Fc pueden utilizarse para preparar
25 tales polipéptidos

Los ligandos y monómeros de dAB también pueden combinarse y/o formatearse en estructuras de múltiples ligandos de no anticuerpo para formar complejos multivalentes, que unen moléculas objetivo con el mismo antígeno, proporcionando de tal modo avidez superior. Por ejemplo, los receptores bacterianos naturales tales como SpA pueden utilizarse como andamios para el injerto de CDRs para generar ligandos que se unen específicamente a uno o más epítopos. Los detalles de este procedimiento se describen en EE UU 5,831,012. Otros andamios adecuados incluyen aquellos basados en fibronectina y anticuerpos. Los detalles de los procedimientos adecuados se describen en WO 98/58965. Otros andamios adecuados incluyen lipocalina y CTLA4, según se describe en van den Beuken *et al*, *J Mol Biol* 310 591-601 (2001), y los andamios tales como aquellos descritos en WO 00/69907 (Medical Research Council), los cuales se basan por ejemplo en la estructura de anillo de GroEL bacteriano u otros polipéptidos de chaperona. Los andamios de proteína pueden combinarse, por ejemplo, CDRs pueden injertarse sobre un andamio de CTLA4 y utilizarse junto con dominios de inmunoglobulina V_H o V_L para formar un ligando. Del mismo modo, fibronectina, lipocalina y otros andamios pueden combinarse.

Una variedad de métodos adecuados para preparar cualquier formato deseado se conocen en la materia. Por ejemplo, las cadenas de anticuerpo y formatos (por ejemplo, formatos tipo IgG, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos

humanos, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos
bienespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de
anticuerpo, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas de
anticuerpo y/o cadenas ligeras) pueden prepararse por expresión
5 de construcción de expresión adecuada y/o cultivo de células
adecuadas (por ejemplo, hibridomas, heterohibridomas, células
huésped recombinante que contienen construcciones
recombinantes que codifican el formato) Además, los formatos
tales como fragmentos de unión de antígeno de anticuerpos o
10 cadenas de anticuerpo (por ejemplo, un fragmento Fv (por ejemplo
cadena sencilla Fv (scFv), un Fv unido a disulfuro), un fragmento
Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂), pueden prepararse
por expresión de construcciones de expresión adecuadas o por
digestión enzimática de anticuerpos, por ejemplo, utilizando
15 papaína o pepsina

El ligando puede formatearse como un ligando específico
dual o un ligando multi-específico, por ejemplo, según se describe
en WO 03/002609, las enseñanzas completas de las cuales se
incorporan en la presente para referencia Los ligandos
20 específicos duales comprenden dominios variables únicos de
inmunoglobulina que tienen especificidades de unión diferentes
Tales ligandos específicos duales pueden comprender
combinaciones de dominios de cadena ligera y pesada Por
ejemplo, el ligando específico dual puede comprender un dominio
25 V_H y un dominio V_L, los cuales pueden unirse juntos en la forma de

un scFv (por ejemplo, utilizando un enlazador adecuado tal como Gly₄Ser), o formatearse en un anticuerpo biespecífico o fragmento de unión de antígeno del mismo (por ejemplo, fragmento F(ab')₂)

Los ligandos específicos duales no comprenden pares V_H/V_L complementarios que forman un sitio de unión por antígeno de anticuerpo de dos cadenas convencional que une el antígeno o epítopo cooperativamente. A su vez, los ligandos de formato dual comprenden un par complementario V_J/V_L, en donde los dominios V tienen especificidades de unión diferentes

Además, los ligandos específicos duales pueden comprender uno o más dominios C_H o C_L deseados. Un dominio de región de andamio también puede incluirse si se desea. Tales combinaciones de dominios pueden, por ejemplo, imitar anticuerpos naturales, tales como IgG o IgM, o fragmentos del mismo, tales como moléculas Fv, scFv, Fab o F(ab')₂. Otras estructuras, tal como un brazo único de una molécula IgG que comprende dominios V_H, V_L, C_{H1} y C_L, se contemplan. Preferentemente, el ligando específico dual de la invención comprende solamente dos dominios variables a pesar de que varios de tales ligandos pueden incorporarse juntos en la misma proteína, por ejemplo, dos de tales ligandos pueden incorporarse en un IgG o una inmunoglobulina multimérica, tal como IgM. Alternativamente, en otra modalidad una pluralidad de ligandos específicos duales se combinan para formar un multímero. Por ejemplo, dos diferentes ligandos específicos duales se combinan

para crear una molécula tetra-específica. Se apreciará por un experto en la materia que las regiones variables pesadas y ligeras de un ligando específico dual producido de acuerdo al método de la presente invención puede ser sobre la misma cadena de polipéptido, o alternativamente, en diferentes cadenas de polipéptido. En el caso de que las regiones variables se encuentren sobre diferentes cadenas de polipéptido, entonces pueden unirse por medio de un enlazador, generalmente un enlazador flexible (tal como una cadena de polipéptido), un grupo enlazador químico, o cualquier otro método conocido en la materia.

El ligando multiespecífico posee más de una especificidad de unión por epítipo. Generalmente, el ligando multiespecífico comprende dos o más dominios de unión por epítipo, tales como dAbs o dominio de proteína de no anticuerpo comprendiendo un sitio de unión para un epítipo, por ejemplo, un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio clase A de receptor LDL, un dominio EGF, un avímero. Los ligandos multiespecíficos pueden formatearse además según se describe en la presente.

En algunas modalidades, el ligando es un formato tipo IgG. Tales formatos tienen la estructura de cuatro cadenas convencional de una molécula IgG (2 cadenas pesadas y dos cadenas ligeras), en las cuales una o más de las regiones variables (V_H y o V_L) se han reemplazado con un dAb o dominio variable sencillo de una especificidad deseada. Preferentemente,

cada una de las regiones variables (2 regiones V_H y 2 regiones V_L)
 se reemplaza con un dAb o dominio variable unico Los dAb(s) o
 dominio (s) variable (s) unico (s) que se incluyen en un formato
 tipo IgG pueden tener la misma especificidad o diferentes
 5 especificidades En algunas modalidades, el formato tipo IgG es
 tetravalente y puede tener uno, dos, tres o cuatro especificidades
 Por ejemplo, el formato tipo IgG puede ser monoespecifico y
 comprende 4 dAbs que tienen la misma especificidad,
 biespecificos y comprende 3 dAbs que tienen la misma
 10 especificidad y otro dAb que tiene una diferente especificidad
 biespecifico y comprende dos dAbs que tienen la misma
 especificidad y dos dAbs que tienen la misma especificidad un
 tercer dAbs con una diferente especificidad y un cuarto dAb con
 una diferente especificidad de los dAbs primero, segundo y
 15 tercero, o tetraespecifico y comprende cuatro dAbs que cada uno
 tienen una diferente especificidad Los fragmentos de unión por
 antígeno de los formatos tipo IgG (por ejemplo, Fab, $F(ab')_2$, Fab',
 Fv, scFv) puede prepararse Preferentemente, los formatos tipo
 IgG o fragmentos de unión por antígeno del mismo no degradan
 20 TNFR1

Formatos Extendidos de Vida Media

Los ligandos pueden formatearse para extender *in vivo* la
 vida media de suero La vida medio *in vivo* aumentada es util en
 25 aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, especialmente

anticuerpos y más especialmente fragmentos de anticuerpo de pequeño tamaño tal como dAbs. Tales fragmentos (Fvs, Fvs unido por disulfuro, Fabs, scFvs, dAbs) se aclaran rápidamente del cuerpo, los cuales pueden limitar severamente las aplicaciones

5 clínicas

Un ligando (por ejemplo, un monómero dAb) puede formatearse para tener un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo, por unión de un grupo de polialquilénglicol (por ejemplo grupo polietilénglicol (PEG), grupo polipropilénglicol), albumina de suero, transferina, receptor de transferina o al menos la parte de unión de transferina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o por conjugación a un dominio de anticuerpo. En algunas modalidades el ligando es PEGilado. Preferentemente, el ligando PEGilado une un compuesto objetivo endógeno con sustancialmente la misma afinidad como el mismo ligando que no es PEGilado. Por ejemplo, el ligando puede ser un monómero dAb PEGilado que une un compuesto objetivo endógeno, en donde el monómero dAb PEGilado une dicho compuesto objetivo endógeno con una afinidad que difiere de la afinidad de dAb en forma no PEGilada por no más de un factor de aproximadamente 1000 preferentemente no más de un factor de aproximadamente 100, más preferentemente no más de un factor de aproximadamente 10, o con afinidad sustancialmente afinidad sin cambiar en relación a una forma no PEGilada.

25 Los ligandos pequeños, tal como monómero dAb, pueden

formatearse como un fragmento de unión por antígeno más grande de un anticuerpo o como un anticuerpo (por ejemplo, formatearse como un Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv) El tamaño hidrodinámico de un antagonista (por ejemplo, ligando, monómero dAb) y su vida media de suero puede también aumentarse al
5 conjugarse o unir el antagonista a un dominio de unión (por ejemplo, anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que une un antígeno o epítopo que aumenta la vida media *in vivo*, según se describe en la presente Por ejemplo, el ligando (por ejemplo, monómero dAb)
10 puede conjugarse o unirse a una albumina de anti-suero o receptor Fc anti-neonatal dAb, Fab, Fab' o scFv, o a un anticuerpo de anti-SA o anticuerpo de receptor Fc anti-neonatal

El tamaño hidrodinámico de los ligandos (por ejemplo monómeros dAb y multimeros) de la invención puede determinarse
15 utilizando métodos que se conocen bien en la materia Por ejemplo, la cromatografía de filtración de gel puede utilizarse para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando Las matrices de filtración de gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de ligandos, tal como aglomerantes de agarosa
20 degradada, se conocen bien y fácilmente disponibles

El tamaño de un formato de ligando (por ejemplo, el tamaño de una porción PEG unida a una porción de unidad que tiene un sitio de unión por un compuesto objetivo endógeno, puede variarse dependiendo de la aplicación deseada Por ejemplo, en donde el
25 ligando se pretende que deje la circulación y entre en tejidos

periféricos, es deseable mantener el tamaño hidrodinámico del ligando bajo para facilitar la extravasación de la corriente de sangre. Alternativamente, en donde se desea tener el ligando restante en la circulación sistémica por un período más largo de tiempo el tamaño de ligando puede aumentarse, por ejemplo, al formatear una proteína tipo Ig o por adición de una porción PEG de 30 a 60 kDa

Los ejemplos de albumina adecuada, fragmentos de albumina o variantes de albumina para utilizarse en ligando de acuerdo a la invención se describen en WO 2005/077042A2, la cual se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En particular, la siguiente albumina, fragmentos de albumina o variantes de albumina pueden utilizarse en la presente invención

- SEQ ID NO 1 (como se describe en WO 2005/077042A2, esta secuencia incorporándose explícitamente en la presente descripción para referencia),

- fragmento de albumina o variante comprendiendo o consistiendo de aminoácidos 1-387 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2,

- albumina, o fragmento o variante de la misma, comprendiendo una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo consistiendo de (a) aminoácidos 54 a 61 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (b) aminoácidos 76 a 89 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (c) aminoácidos 92 a 100 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (d) aminoácidos 170 a 176 de SEQ ID

NO 1 en WO 2005/077042A2, (e) aminoácidos 247 a 252 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (f) aminoácidos 266 a 277 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (g) aminoácidos 280 a 288 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (h) aminoácidos 362 a 368
5 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (i) aminoácidos 439 a 447 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2 (j) aminoácidos 462 a 475 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, (k) aminoácidos 478 a 486 de SEQ ID NO 1 en WO 2005/077042A2, y (l) aminoácidos 560 a 566 de SEQ ID NO 1 en WO2005/077042A2

10 Los ejemplos adicionales de albumina adecuada, fragmentos y análogos para utilizarse en un ligando de acuerdo a la invención se describen en WO 03/076567A2, el cual se incorpora en la presente para referencia en su totalidad. En particular, la siguiente albumina, fragmentos o variantes pueden utilizarse en la
15 presente invención

- albumina de suero humana segun se describe en WO 03/076567 A2, por ejemplo, en la figura 3 (esta información de secuencia incorporándose explícitamente en la presente descripción para referencia),
- 20 • albumina de suero humano (HA) consistiendo de una cadena de polipéptido no glicosilado unico de 585 aminoácidos con un peso molecular de fórmula de 66,500 (Véase, Meloun, *et al*, *FEBS Letters* 58 136 (1975), Behrens, *et al*, *Fed Proc* 34 591 (1975), Lawn, *et al*, *Nucleic Acids Research* 9 6102-6114 (1981),
25 Minghetti, *et al*, *J Biol Chem* 261 61 A1 (1986)).

- Una variante polimórfica o análogo o fragmento de albumina segun se describe en Weitkamp, *et al*, *Ann Hum Genet* 37 219 (1973),

- Un fragmento de albumina o variante segun se describ
5 en EP 322094, por ejemplo, HA(I-373 , HA(I-388), HA(I-389), HA(I-369), y HA(1-419) y fragmentos entre 1-369 y 1-419,

- Un fragmento de albumina o variante segun se describe en EP 399666, eg, HA(1-177) y HA(I -200) y fragmentos entre HA(I-X), donde X es cualquier numero de 178 a 199

10 En donde una porción que extiende la vida media (una o más) (por ejemplo, albumina, transferina y fragmentos y análogos del mismo) se utiliza en el ligando de la invención, puede conjugarse utilizando cualquier método adecuado, tal como, por fusión directa a la porción de unión que tiene un sitio de unión
15 para un compuesto objetivo endógeno, por ejemplo, al utilizar una construcción de nucleótido unico que codifica una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión se codifica como una cadena de polipéptido unico con la porción que extiende la vida media ubicada N- o C- terminalmente a la porción de unión TNFR1
20 Alternativamente, la conjugación puede lograrse al utilizar un enlazador de péptido entre las porciones, por ejemplo, un enlazador de péptido segun se describe en WO 03/076567A2 o WO 2004/003019(estas descripciones del enlazador incorporándose para referencia en la presente descripción para proporcionar
25 ejemplos para utilizarse en la presente invención)

Típicamente, un polipéptido que mejora la vida media de suero *in vivo* es un polipéptido que se presenta naturalmente *in vivo* y que resiste la degradación o remoción por mecanismos endógenos que remueven el material no deseado del organismo (por ejemplo, humano). Por ejemplo, un polipéptido que mejora la vida media de suero *in vivo* puede seleccionarse de proteínas del aglomerante extracelular, proteínas encontradas en la sangre, proteínas encontradas en la barrera cerebral de sangre o en tejido neural, proteínas ubicadas hacia el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel o hueso, proteínas de tensión, proteínas específicas de enfermedad, o proteínas incluidas en transporte Fc.

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media de suero *in vivo* incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de agente neurofarmacéutico de ligando específico de receptor, transferina (véase Patente de EE UU No 5,977,307, las enseñanzas de las cuales se incorporan en la presente para referencia), receptor de célula endotelial capilar cerebral, transferina, receptor de transferina (por ejemplo, receptor de transferina soluble), insulina, receptor de factor de crecimiento 1 tipo insulina (IGF 1), receptor de factor de crecimiento 2 tipo insulina (IGF2), receptor de insulina, factor de coagulación de sangre X, α 1-antitripsina y HNF 1 α . Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media de suero también incluyen glicoproteína alfa 1 (orosomucoide, AAG), antitripsina 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
complemento (C3), componente C4 complemento (C4), inhibidor de
esterasa C1 (C1 NHC), proteína de reactivo C (CRP), ferritina
(FER), hemopexina (HPX), lipoproteína (a) (Lp(a)), proteína de
5 unión mannosica (MBP), mioglobina (Myo), prealbumina
(transtiretina, PAL), proteína de unión de retinol (RBP), y factor
reumatoide (RF)

Las proteínas adecuadas del aglomerante extracelular
incluyen, por ejemplo, colágenos, lamininas, integrinas y
10 fibronectina. Los colágenos son las proteínas principales del
aglomerante extracelular. Aproximadamente 15 tipos de moléculas
de colágeno se conocen actualmente, encontradas en diferentes
partes del cuerpo, por ejemplo, colágeno tipo I (contando para
90% de colágeno de cuerpo) encontrado en huesos, piel, tendón,
15 ligamentos, cornea, órganos internos o colágeno tipo II encontrado
en cartilago, disco vertebral, notocordia, y humor vítreo del ojo.

Las proteínas adecuadas de la sangre incluyen, por ejemplo,
proteínas de plasma (por ejemplo, fibrina, macroglobulina α -2,
albumina de suero, fibrinógeno (por ejemplo, fibrinógeno A,
20 fibrinógeno B), proteína A de amiloide de suero, haptoglobina,
profilina, ubiquitina, uteroglobulina y β -2-microglobulina), enzimas
e inhibidores de enzima (por ejemplo, plasminogen, lisozima,
cistatin aC, antitripsina alfa 1 e inhibidor de tripsina pancreática),
proteínas del sistema inmune, tal como proteínas de
25 inmunoglobulina (por ejemplo, IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cadenas

ligeras de inmunoglobulina (kappa/lambda)), proteínas de transporte (por ejemplo, proteína de unión de retinol, microglobulina α -1), defensinas (por ejemplo, beta-defensina 1, defensina 1 neutrófilo, defensina 2 neutrófilo y defensina 3 neutrófilo) y lo similar

Las proteínas adecuadas encontradas en la barrera cerebral de sangre o en el tejido neural incluyen, por ejemplo, receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato, y lo similar

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida medida de suero *in vivo* también incluyen las proteínas localizadas en el riñón (por ejemplo, policistina, colágeno tipo IV, transportador de anión orgánico K1, antígeno de Heymann), proteínas ubicadas en el hígado (por ejemplo, dehidrogenasa de alcohol, G250), proteínas ubicadas en el pulmón (por ejemplo, componente secretador, que une IgA), proteínas ubicadas en el corazón (por ejemplo, HSP 27, el cual se asocia con cardiomiopatía dilatada), proteínas ubicadas a la piel (por ejemplo, queratina), proteínas específicos de hueso tales como proteínas morfogénicas (BMPs), las cuales son un subgrupo de la supefamilia de proteínas de factor de crecimiento β en transformación que demuestran actividad osteogénica (por ejemplo, BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas de tumor (por ejemplo, antígeno de trofoblasto, receptor de herceptina, receptor de oestrogen, catepsinas (por ejemplo, catepsina B, que pueden encontrarse en hígado y bazo))

Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas

incluyen, por ejemplo, antígenos expresados solamente en células T activadas, incluyendo LAG-3 (gen de activación de linfocito), ligando de osteoprotegerina (OPGL, ver *Nature* 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia de receptor TNF, expresado en células T activadas y específicamente reguladas en células productoras (HTLV-1) tipo I del virus de leucemia T humano, véase *Immunol* 165(1) 263-270 (2000)) Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas también incluyen, por ejemplo, metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres)

10 Incluyendo CG6512 *Drosophila*, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humano, ftsH murino, y factores de crecimiento antiogénicos, incluyendo factor de crecimiento de fibroblasto ácido (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblasto básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor α de crecimiento en transformación (TGF α), factor alfa de necrosis tumoral (TNF- α), angiogenina, interleuquina-3 (IL-3), interleuquina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentar (PlGF), factor de crecimiento BB

15 derivado de plaquetas midkine (PDGF), y fractalquina

20

Los polipéptidos adecuados que mejoran la vida media de suero *in vivo* también incluyen proteínas de tensión tales como proteínas de choque térmico (HSPs) HSPs se encuentran normalmente en forma intracelular Cuando se encuentran

25 extracelularmente, es un indicador que una célula ha muerto y

derramado sus contenidos La muerte celular no programada (necrosis) se presenta cuando como un resultado de trauma, enfermedad o lesión, HSPs extracelular activan una respuesta del sistema inmune La unión a HSP extracelular puede dar como resultado la localización de las composiciones de la invención a un sitio de enfermedad

Las proteínas adecuadas incluidas en el transporte Fc incluyen, por ejemplo, receptor Brambell (también conocido como FcRB) Este receptor Fc tiene dos funciones, ambos de los cuales son potencialmente útiles para el suministro Las funciones son (1) el transporte de IgG de madre a niña a través de la protección de placenta (2) de IgG de la degradación prolongado de tal modo su vida media de suero Se considera que los reciclos de receptor IgG de endosomas (Ver, Holliger *et al*, *Nat Biotechnol* 15(7) 632-6 (1997))

Los métodos para análisis farmacocinético y determinación de la vida media de ligando será familiar a aquellos expertos en la materia Los detalles pueden encontrarse en Kenneth, A *et al* Chemical Stability de Pharmaceuticals A Handbook for Pharmacists and in Peters *et al*, Pharmacokinetic analysis A Practical Approach (1996) También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicada por Marcel Dekker, 2nd Rev ex edition (1982), la cual describe parámetros farmacocinéticos tales como vidas media de alfa t y beta t y área bajo la curva (AUC)

Ensayos para Valorar La Función de Compuesto Objetivo Endógeno

Los siguientes ensayos, las variaciones adecuadas de los mismos y otros ensayos adecuados pueden utilizarse para valorar la actividad de compuestos objetivo endógenos, y valorar el si un ligando sustancialmente inhibe la actividad de un compuesto objetivo endógeno al cual se une

La función ABC-1 puede ensayarse al medir el flujo de lípido mediado por polipoproteína de células cultivadas (J Clin Invest 1999Oct, 104(8) R25-31) La función de químera exotoxina de pseudomonas aFGF1 puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de citotoxicidad (Proc Natl Acad Sci USA 1989 Jun, 86(11) 4215-4219) Una actividad de inhibina A puede ensayarse *in vitro* al medir su actividad inductora por diferenciación hacia las células de eritroleucemia Amigo de ratón (MEL) y células K-562 humanas (Proc Natl Acad Sci USA 1988 Apr, 85(8) 2434-2438), o su supresión de la secreción de hormona estimuladora de folículo pituitario (Biol Reprod 2000 Sep, 63(3) 865-871) La actividad de inhibina beta C pueden ensayarse *in vitro* al medir su actividad inductora de diferenciación hacia las células (MEL) de eritroleucemia Amigo de ratón y células K-562 humanas (Proc Natl Acad Sci USA 1988 Apr, 85(8) 2434-2438), o su supresión de la secreción de hormona estimuladora de folículo pituitario (Biol Reprod 2000 Sep, 63(3) 865-871) La actividad de deaminasa de adenosina puede ensayarse *in vitro* al medir el catabolismo de

purina (Mol Cell Biol 1985 Apr, 5(4) 762-767) La función de adiposina puede ensayarse *in vitro* al medir la acumulación de cAMP en células de melanoma de ratón estimuladas por adiposina (Hum Mol Genet 1995 Feb, 4(2) 223-230)

- 5 La función ASP puede ensayarse *in vitro* al medir la inhibición de acumulación de cAMP estimulada por alfa-MSH en células de melanoma de ratón (Hum Mol Genet 1995 Feb, 4(2) 223-230) La mielina puede ensayarse *in vitro* por medición de su fosforilación por quinasa MAP (J Neurochem 1999 Sep, 73(3) 1090-1097), o su efecto en transmisión sináptica entre neuronas (Eur Neurol 1988, 28(2) 57-63) La proteína básica de mielina puede ensayarse *in vitro* por medición de su fosforilación por quinasa MAP (J Neurochem 1999 Sep, 73(3) 1090-1097), o su efecto en transmisión sináptica entre las neuronas (Eur Neurol 15 1988, 28(2) 57-63) La función de colágeno puede medirse utilizando un ensayo de estabilidad de fibrilo de colágeno (Cell Mol Life Sci 2000 May, 57(5) 859-863), o un ensayo de adhesión celular *in vitro* (J Cell Biochem Oct 1, 1997, 67(1) 75-83) La glucosidasa alfa puede ensayarse por hidrólisis de p-Nitrofenil a-d-glucósido de sustrato artificial cromogénico Bergmeyer, H U (ed) Methods de Enzymatic Analysis, Second English Edition, 1, 459 (1974) Alfa-galactosidasa puede ensayarse por hidrólisis de p-Nitrofenil a-D-galactosidasa de sustrato artificial cromogénico a p-Nitrofenil y D-galactosa-Rietra et al, (1975) "Properties of the 20 residual alpha-galactosidase activity in the tissues of a Fabry 25

hemizygote" Clin Chim Acta, 62(3) 401-13 Alfa-L iduronidasa puede ensayarse por hidrólisis del sustrato 4-metilumbeliferil alfa-L-iduronido se sigue en un ensayo fluorométrico (Hopwood *et al* (1979), Clin Chim Acta , 92 257-65), otros ensayos se encuentran
5 en Thompson (1978) "Substratos for the assay of alpha-L-iduronidase" Clin Chim Acta, 89(3) 435-46

La actividad de angiotensina 1 puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de brote capilar (Curr Biol Apr 23, 1998 8(9) 529-532) La actividad de Angiotensina 2 puede ensayarse *in*
10 *vitro* utilizando un ensayo de brote celular (Curr Biol Apr 23 1998, 8(9) 529-532) La angiotensina puede ensayarse en un ensayo de proliferación endotelial (Kringle domains of Human Angiotensin Cao *et al* (1996) J Biol Chem 271 29461-29467 La actividad de ADMP puede ensayarse *in vitro* al medir su
15 habilidad para regular los factores dorsales noggin, goosecoid o follistatin (Development 1995 Dec,121(12) 4293-4301) TRAIL puede ensayarse en un ensayo de apoptosis (TRAIL- R2 a novel apoptosis-mediating receptor for TRAIL, Walczak *et al* (1996) EMBOJ 16 5386-5397) La función de arresto puede ensayarse
20 *in vitro* al medir su habilidad para inhibir la proliferación celular endotelial, migración, formación de tubo, y neovascularización de Matrigel (Cancer Res May 1 2000,60(9) 2520-6) La actividad de arilsulfatasa B puede ensayarse por la medición *in vitro* de hidrólisis de sulfatos de N-Acetil-D-galactosamina (J Biol Chem
25 Feb 25, 1990, 265(6) 3374-3381) La actividad de asparaginasa

puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo enzimático de asparaginasa (Anal Biochem Apr 10, 2000,280(1) 42-45) La actividad de rBPI puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo antibacteriano (J Biol Chem Nov 5, 1987, 262(31) 14891- 14894)

- 5 BDNF puede ensayarse en un crecimiento neuronal y ensayo de actividad sináptica (BDNF mejora el crecimiento neural y actividad sináptica en cultivos de célula hipocampal Bartrupet *et al* (1997) Neuroreport 1, 8(17) 3791-4 Daniels L B, Glew R H, Radin N S, Vunnam R R) B-glucocerebrosidase puede ensayarse
10 utilizando un ensayo fluorométrico para la enfermedad Gaucher utilizando conduritol-beta-epóxido con hígado como la fuente de Beta-glucosidasa (Clin Chim Acta Sep 25, 1980, 106(2) 155-63, Johnson W G, Gal A E, Miranda A F, Pentchev P G El diagnóstico de enfermedad Gaucher adulta uso de un nuevo sustrato
15 cromogénico, 2-hexadecanoilamino-4-nitrofenil-beta-D-glucopiranoside, en fibroblastos de piel cultivados Clin Chim Acta Mar 14, 1980,102(1) 91-7) BMP-2 puede ensayarse según se describe por Wang, E A *et al* Recombinant humanbone morphogenetic proteína induce boneformation Proc NatAcad
20 Sci 87 2220-2224,1990 La función BT-SD puede ensayarse *in vitro* al utilizar un ensayo de dismutasa superóxido (Nucleic Acids Res Mar 25, 1985, 13(6) 2017-34) La actividad de BRCA1 puede ensayarse al medir alteraciones en expresión de p21WAF1/CIP1 (Oncogene Jun 11, 1998,16(23) 3069-82) La actividad de
25 BRCA2 puede ensayarse al medir alteraciones en expresión de

p21 WAF1/CIP1 (Oncogene Jun 11, 1998,16(23) 3069-82) La actividad vasodilatador de CGRP puede ensayarse utilizando el ensayo de vasodilatación de anillo aórtico descrito en Pharmacol Res 1999 Mar, 39(3) 217-20, las actividades de proliferación de
5 célula endotelial y osteoblasto *in vitro* (Eur J Pharmacol Dec 15, 2000, 409(3) 273-8, Proc Natl Acad Sci U S A 1990 May, 87(9) 3299-303)

La actividad de calreticulin puede medirse *in vitro* utilizando ensayos de representación por imágenes de calcio (Cell Sep 8,
10 1995, 82(5) 765-71) La función CD4 puede ensayarse *in vitro* al medir la unión gp120 (Viral Immunol 2000, 13(4) 547-554), o tomocitoquinas de respuestas de monocito siguiendo la unión de gp120 (J Immunol Oct 15, 1998, 161(8) 4309-4317) El ligando CD40 puede ensayarse segun se describe por Hollenbaugh D, et
15 *al* , El antígeno de célula T humana gp39, un miembro de la familia de gen TNF, es un ligando para el receptor CD40 expresión de una forma soluble de gp39 con actividad co-estimuladora de célula B EMBO J 1992 Dec, 11(12) 4313-21 Las proteínas de unión de quimioquina pueden ensayarse utilizando ensayos de unión de
20 receptor (J Biol Chem May 9, 1997, 272(19) 12495-12504) CNTF puede ensayarse *in vitro* utilizando ensayos de supervivencia y proliferación neuronal (EMBO J Apr 2, 2001 , 20(7) 1692-1703) La actividad de contortrostatin puede medirse *in vitro* al medir la unión a integrinas α 5 β 1 y α 5 β 3, inhibición de
25 agregación plaqueta ofn, e inhibición de adhesión de célula

cancerígena a fibronectina y vitronectina (Arch Biochem Biophys Mar 15, 2000,375(2) 278-288) La actividad de proteína de unión CRF puede medirse utilizando un ensayo de unión CRF (Peptides Jan 22, 2001, 22(1) 47-56)

- 5 La actividad de CTLA4 actividad puede medirse utilizando un ensayo de activación de célula T (J Immunol Mar 1, 2001, 166(5) 3143-3150) La función de Decorin puede medirse utilizando un ensayo de estabilidad de fibrilo colágeno *in vitro* (Cell Mol Life Sci 2000 May,57(5) 859-863), o un ensayo de adhesión celular *in vitro*
- 10 (J Cell Biochem Oct 1, 1997,67(1) 75-83) La función de Del-I puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de adhesión de integrina α v β 3 (Genes Dev Jan 1, 1998, 12(1) 21-33) La Desmotiplasa puede ensayarse segun se describe por Wallen, P , Biochemistry de plasminogen In Kline D L , Reddy, K N N , eds
- 15 Fibrinolysis Boca Raton, FL CRC Press,1980 1-25, Saksela, O , Rifkin, D B , Cell-associated plasminogen activation Regulation and physiological functions Annu Rev Cell Biol 1988, 4 93-126, Womack C J, Ivey F M, Gardner A W, Macko R F, Fibrinolytic response to acute exercise in patients with peripheral arterial
- 20 disease Med Sci Sports Exerc 2001 Feb, 33(2) 214-9 La actividad de Dnasa puede medirse utilizando el ensayo de degradación de ADN en J Biochem (Tokyo) 1982 Oct, 92(4) 1297-303 La actividad de Ectoapirasa puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de ectoapirasa (J Biol Chem Sep 18, 1998,
- 25 273(38) 24814-24821) EGF puede ensayarse utilizando un

ensayo de crecimiento celular (J Biol Chem Mar 31, 1995,
 270(13) 7495-500) La actividad de EMAP II puede ensayarse *in*
vitro utilizando un ensayo de brote celular (Curr Biol Apr 23,
 1998, 8(9) 529-532) FGF-I puede ensayarse utilizando un ensayo
 5 de proliferación celular Cell, vol 50, no 5, pp 729-737 (Aug
 1987) Proc Natl Acad Sci U S A, vol 86, no 3, pp 802-806 (1989)
 FGF-2 puede ensayarse utilizando un ensayo de proliferación
 utilizando células NR6R-3T3 (Rizzino 1988 Cancer Res 48
 4266) La actividad de Fibrolase puede ensayarse *in vitro*
 10 utilizando un ensayo fibrinolítico (Thromb Res May 15, 1994,
 74(4) 355-367) FLT3 puede ensayarse en un ensayo de
 proliferación utilizando una estirpe de célula pro B transformada
 Flt-3 (Hannum 1994 Nature 368 643)

La actividad de Follitropina puede ensayarse *in vitro* al medir
 15 la producción de cAMP en células que expresan el receptor FSH (J
 Reprod Immunol 2001 Jan, 49(1) 1-19) La actividad de GDNF
 puede ensayarse *in vitro* al medir aumentos en la fosforilación de
 tirosina Ret en respuesta al tratamiento GDNF (Mol Cell Biol Mar
 15, 1995, (3) 1613-1619) La actividad de Gelsolin puede
 20 ensayarse *in vitro* al medir proteólisis de actina (Nature 1987 Jan
 22-28, 325(6102) 362-364) La actividad de GGF2 puede
 ensayarse *in vitro* al medir la activación de quinasas de tirosina de
 receptor ERBB en células rabdomiosarcoma humana (Int J Cancer
 Jul 1, 2000, 87(1) 29-36)

25 La actividad glucogénica de Glucagon se media por un

receptor de glucagones de alta afinidad La actividad biológica de glucagon recombinante puede valorarse por ensayos de unión directa (Science Mar 12, 1993, 259(5101) 1614-6) La actividad de HBNF puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de sobre
5 crecimiento de neuritas (J Biol Chem Oct 27, 1995, 270(43) 25992-25999) La unión de receptor hCG y la activación puede medirse para valorar la actividad biológica de hCG recombinante (J Biol Chem Oct 5, 1993, 268(28) 20851-4) Las proteínas de choque térmico pueden ensayarse por la administración de
10 complejos de péptido HSP en dos modelos de carcinoma inducida por UV en ratones (US 5,837,251) Interleuquina 1 puede ensayarse al 1) unirse a receptores IL-1 receptores en YT-NCI o células C3H/HeJ (Carter *et al*, *Nature* 344 633-638, 1990), 2) inducción de adhesión de leucocito de célula endotelial (Carter *et*
15 *al*, *Nature* 344 633-638, 1990), 3) ensayos de proliferación en células A375-C6 (Murai T *et al*, J Biol Chem 276 6797-6806, 2001), proliferación D10S Orencole & Dinarello (1989) Cytokine 1, 14-20 IL-1ra puede ensayarse por 1) competencia para la unión de IL-1 a receptores IL-1 en YT-NCI o células C3H/HeJ (Carter *et*
20 *al*, *Nature* 344 633-638, 1990), 2) inhibición de adhesión de leucocito de célula endotelial inducida por IL-1 (Carter *et al*, *Nature* 344 633-638, 1990), 3) ensayos de proliferación en células A375-C6, una estirpe de célula de melanoma humano susceptible a la acción antiproliferativa de IL-1 (Murai T *et al*, J Biol Chem
25 276 6797-6806, 2001) IL-10 puede ensayarse por 1) unión de IL-

10 a células NK (carson WE *et al* , Blood 85 3577-3585, 1995), 2) inhibición de la producción TNF-alfa por macrófagos (Riley J K *et al* , J Biol Chem 274 16513-16521, 1999), 3) inhibición deproliferación de macrófago (O'Farrell A- M *et al* , EMBO 17 5 1006- 1018, 1998), MC-9 proliferation Thompson- Snipes *et al* (1991) J Exp Med 173, 507-510 IL-11 puede ensayarse en ensayo de proliferación de célula hematopoyética «Interleukin-11 enhances humano megakaryocytopoiesis *in vitro* » Blood Jan 15 1992, 79(2) 327-31 "Synergistic effects of stem cell factor and 10 interleukin 6 or interleukin 11 on the expansion of murine hematopoietic progenitors in liquid suspension culture " Stem Cells 1995 Jul, 13(4) 404-13, B9-11 proliferation Lu *et al* (1994) J Immunol Methods 173, 19 IL-12 puede ensayarse en un ensayo de citotoxicidad de célula asesina natural (NK) y ensayo de 15 liberacion de interferona-gamma (IFN- gamma) "Requirement for type 2 NO synthase for IL-12 signaling in Innate immunity" Science 284 951-955, 1999, KIT— 225 proliferation Hori *et al* (1987), Blood 70, 1069-1078

La actividad de proteína de unión IL18 puede ensayarse *in* 20 *vitro* al medir su habilidad para inhibir la temprana respuesta de Th1 (Immunity 1999 Jan, 10(1) 127-136) La función de quimera de toxina de difteria IL2 *in vitro* utilizando un ensayo de citotoxicidad (Exp Hematol 2000 Dec, 28(12) 1390-1400) IL-4 puede ensayarse en un ensayo de citotoxicidad en linfocitos T 25 normales (PMID 8144944), Aumento RAMOS de expresión CD23

Siegel & Mostowski (1990) J Immunol Methods 132, 287-295 La actividad de receptor IL-4 puede medirse por la habilidad para inhibir la proliferación dependiente de IL-4 de células TF-1 (Kitamura, T *et al* , 1989, J Cell PPhysiol 140 323) IL-8 puede
 5 ensayarse en un ensayo que monitorea el reflujo de calcio en células que llevan IL8R (Holmes *et al* (1991)Science 253, 1278-80) Interferona gamma puede medir la actividad en ensayo antiviral utilizando las células Hela infectadas con virus EMC (Meager, A 1987, Lymphokines and Interferons, A Practical Approach,
 10 Clemens, MJ *et al* , eds , IRL Press, p 129), puede medir la modulación de la expresión clase II MHC en estirpe de célula de carcinoma colorectal humano COLO 205 (Gibson y Kramer, 1989, J Immunol Methods, 125 105- 113)

La actividad de interferona-omega puede medirse utilizando
 15 un ensayo antiviral *in vitro* (J Med Microbiol 1998 Nov, 47(11) 1015-8) La actividad de IP-10 puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo de quimiotaxis de célula de musculo liso de arteria de rata (J Biol Chem Sep 27, 1996, 271(39) 24286-24293) La actividad de IL-3 puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo de
 20 diferenciación celular hematopoyética (Science 1985, 228(4701) 810-815) La actividad de KGF- 1 puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de proliferación celular epitelial (Proc Natl Acad Sci U S A 1989 Feb, 86(3) 802-806) La actividad de Kistrin puede ensayarse *in vitro* al ensayar la trombolisis, reoculación, y
 25 sangrado asociado con la administración del activador de

plasminógeno tipo tejido recombinante (rt-PA) en un modelo canino de trombosis de arteria coronaria (Circulation 1991 Mar, 83(3) 1038-1047) La actividad de inhibidor 1 de proteasa Kunitz puede ensayarse *in vitro* al medir la actividad inhibidora hacia el

5 activador HGF (J Biol Chem Mar 7, 1997, 272(10) 6370-6376) La actividad de Lactotransferrina puede medirse utilizando un ensayo de inhibición viral *in vitro* (J Med Microbiol 1998 Nov, 47(11) 1015-8), y ensayos antimicrobianos (J Clin Invest Sep 1, 1998, 102(5) 874-80) La Leptina puede ensayarse por

10 modulación *in vivo* de la toma alimenticia, reducción en peso corporal, y disminución de insulina y niveles de glucosa en ratones ob/ob, radioinmunoensayo (RIA) y activación del receptor de leptina en un ensayo basado en célula Protein Expr Purif 1998 Dec, 14(3) 335-42 La actividad de LIF puede medirse *in vitro*

15 utilizando un ensayo de diferenciación celular hematopoyética (Science 1985, 228(4701) 810-815) La actividad de LFA-3 puede ensayarse *in vitro* al medir su habilidad para inhibir la función de célula T (JExp Med Jul 1, 1993, 178(1) 211-222) La actividad de plasminógeno Lys puede medirse utilizando un ensayo de

20 fibrinólisis *in vitro* (J Biol Chem Dec 25, 1992, 267(36) 26150-6)

La actividad de Maspín puede medirse utilizando ensayos angiogénesis *in vitro* (Nat Med 2000 Feb, 6(2) 196-9) La actividad de Metioninasa puede ensayarse *in vitro* según se describe por Ito *et al* (J Biochem (Tokyo), 1975 Nov, 78(5) 1105-

25 1107) La actividad de MTP puede ensayarse *in vitro* al utilizar un

ensayo de secreción de lipoproteína que contiene apoB (J Biol
 Chem Sep 2, 1994, 269(35) 21951-21954) La actividad de NGF
 puede ensayarse por medición de la activación de factor de
 transcripción CREB en neuronas simpáticas en cultivo (Science
 5 Dec 17, 1999, 286(5448) 2358-2361) La actividad de
 endopeptidasa neutral puede ensayarse *in vitro* al medir proteolisis
 de péptidos tipo bombesina (Proc Natl Acad Sci U S A Dec 1
 1991, 88(23) 10662- 10666) La actividad de NIF puede
 ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de adhesión de leucocito
 10 polimorfonuclear (Mol Pharm 1999 Nov, 56(5) 926-932) La
 actividad de Noggin puede ensayarse al medir las respuestas del
 receptor TNF a la estimulación de TNF de células HeLuna (J Biol
 Chem Feb 28, 1997, 272(9) 5861-5870) La actividad de NT-3
 puede ensayarse *in vitro* al medir su habilidad para proliferar las
 15 células progenitoras NC cultivadas crecidas en un medio definido
 libre de suero (Proc Natl Acad Sci U S A Mar 1, 1992, 89(5)
 1661- 1665) La actividad de OP-I puede ensayarse *in vitro* al
 medir la expresión VEGF en células calvarias de rata fetal (Mol
 Cell Endocrinol Jul 20, 1999, 153(1-2) 113-124) La actividad de
 20 osteoprotegerin puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de
 co-cultivo para osteoclastogenesis, un ensayo de resorción de
 huesos utilizando un sistema de cultivo de órgano de hueso largo
 fetal, un ensayo de resorción dentina, o un ensayo de proliferación
 de fibroblasto (FASEB J 1998, 12 845-854) La actividad de
 25 acetilhidrolasa PAF de plasma puede determinarse por el método

de Stafforini *et al* (Stroke 1997 Dec, 28(12) 2417-20)

La función parchada puede ensayarse *in vitro* al medir la unión de su ligando hedgehog sónico (*Nature* Nov 14, 1996, 384(6605) 129-134) La actividad de PDGF puede ensayarse *in vitro* al medir su habilidad para inducir la fosforilación de tirosina en el receptor PDGF (J Biol Chem May 25, 1989, 264(15) 8905-8912) La función de PEDF puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de sobrecrecimiento de neuritas (J Biol Chem Oct 27, 1995, 270(43) 25992-25999) El inhibidor de activador de plasminógeno puede ensayarse según se describe por Wallen, P , Biochemistry of plasminogen, In Kline D L , Reddy, K N N , eds Fibrinolysis Boca Raton, FL CRC Press, 1980 1-25, Saksela, O , Rifkin, D B , Cell-associated plasminogen activation Regulation and physiological functions Annu Rev Cell Biol 1988, 4 93-126, 15 Womack C J, Ivey F M, Gardner A W, Macko R F, Fibrinolytic response to acute exercise in patients with peripheral arterial disease Med Sci Sports Exerc 2001 Feb, 33(2) 214-9 La actividad de PGP puede ensayarse *in vitro* al medir el agonismo de la quinasa de tirosina 3 y el factor estimulante de colonia de granulocito (Exp Hematol 2001 Jan, 29(1) 41-50) La actividad de PMP puede ensayarse *in vitro* al medir la habilidad para inducir megacariocitopoyesis en células CD43+ purificadas de la médula ósea, células progenitoras de sangre periférica movilizadas, o cordón umbilical (J Hematother 1999 Apr, 8(2) 199-208) La 25 eficacia de prosaptida puede medirse a través de regímenes de

múltiples dosis utilizando ratas diabéticas (Anesthesiology 2000 Nov, 93(5) 1271-8)

La actividad de Ranpirnase *in vitro* puede ensayarse al utilizar ribonucleasa y ensayos de actividad citotóxica (J Mol Biol
 5 Apr 19, 1996, 257(5) 992-1007) La actividad de Relaxin puede ensayarse *in vitro* utilizando una inhibición de ensayo *in vitro* de contracciones uterinas de rata inducidas por KCl (Can J Physiol Pharmacol 1981 May, 59(5) 507-12) La actividad de S-Antígeno Retinal puede ensayarse *in vitro* al medir la actividad canales con
 10 abertura GMP cíclicas en células fotorreceptoras (J Biol Chem Nov 25, 1994, 269(47) 29765-29770) La actividad de RhLH puede ensayarse *in vitro* al medir fluorescencia Fura-2 en células tecaes porcinas aisladas en respuesta a la estimulación RhLH (Endocrinology 2000 Jun, 141(6) 2220-2228) La actividad de
 15 Saruplase puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo de división de plasminógeno (J Biol Chem Jan 18, 2001, epub ahead of print) El receptor tipo 1 complementario puede ensayarse *in vitro* al medir la unión C3b y C4b (J Exp Med Nov 1, 1988, 168(5) 1699-1717)

20 La función de hedgehog sónico puede ensayarse *in vitro* al medir su unión al parchado (Nature 1996 Nov 14, 384(6605) 129-134) La actividad de Estafiloquinasa puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo de división de plasminógeno (J Biol Chem Jan 18, 2001, epub ahead of print) La actividad de SCF puede
 25 ensayarse al medir la supervivencia de célula de mastocito,

proliferación, o producción de citoquinas pro-inflamatorias (Immunol Rev 2001 Feb, 179 57-60) La actividad de estreptoquinasa puede medirse *in vitro* utilizando un ensayo de activación de plasminógeno (J Biol Chem Jan 18, 2001, epub ahead of print) La actividad de dismutasa superóxida puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de dismutasa superóxida (Nucleic Acids Res Mar 25, 1985, 13(6) 2017-34) La función T1/ST2 puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de activación de célula Th2 (J Immunol Mar 1, 2001, 166(5) 3143-3150) La actividad de TGF beta 1 puede ensayarse *in vitro* al medir la inducción de proliferación de fibroblasto renal por la inducción de FGF-2 (Kidney Int 2001 Feb, 59(2) 579-592) La función TGF Beta 2 puede ensayarse *in vitro* al medir la inhibición de la transcripción iNOS (Inflamm Res 1997 Sep, 46(9) 327-331) TGF-beta 3 puede ensayarse para estimulación de producción de prostaglandina E2 (PGE2) y resorción de huesos en calvaria de ratón neonatal en cultivo de órganos (PNAS USA 1985 Jul, 82(13) 4535-4538), o estimulación de la síntesis de colágeno, osteopontina osteonectina, y fosfatasa alcalina, y la habilidad de estimular la duplicación en células tipo osteoblasto (J Biol Chem 1987, 262 2869, J Biol Chem 1988, 263 13916, J Cell Biol 1988, 106 915, J Cell Physiol 1987, 133 426, Endocrinology 1987, 121 212, Endocrinology 1986, 19 2306, y J Cell Biol 1987, 105 457)

Trombopoyetina (TPO) puede ensayarse para determinar la regulación de crecimiento y diferenciación de megacariocitos (Mol

Cell Biol 2001 Apr, 21(8) 2659-2670, Exp Hematol 2001 Jan 29(1) 51-58, Leukemia 2000 Oct, 14(10) 1751-1756) La función de Tie-2/Tek puede ensayarse al medir su fosforilación en respuesta a la estimulación por angiopoyetina (Int Immunol 1998 Aug, 10(8) 1217-1227) El inhibidor de trayectoria de factor de tejido puede ensayarse para la inactivación de factor Xa e inhibición del complejo de factor de tejido VIIa de la trayectoria de coagulación extrínseca (J Biol Chem May 5, 1998, 263(13) 6001-6004, Thromb Haemost 1998, 79(2) 306-309) La actividad de proteína de unión TNF puede ensayarse al medir la inhibición de la activación de PIP5K en respuesta a la estimulación TNF de células HeLuna (J Biol Chem Feb 28, 1997, 272(9) 5861-5870) La actividad de proteína de unión TNF puede ensayarse al medir la inhibición de la activación de PIP5K en respuesta a la estimulación TNF de células HeLuna (J Biol Chem Feb 28, 1997, 272(9) 5861-5870) La actividad de receptor TNF puede ensayarse al medir los aumentos de la activación de PIP5K en respuesta a la estimulación de TNF de células HeLuna (J Biol Chem Feb 28, 1997, 272(9) 5861-5870) t-PA puede ensayarse según se describe en Wallen, P Biochemistry de plasminogen In Kline D L, Reddy, K N N, eds Fibrinolysis Boca Raton, FL CRC Press, 1980 1-25, Saksela, O, Rifkin, D B, Cell-associated plasminogen activation Regulation and physiological functions Annu Rev Cell Biol 1988, 4 93-126, Womack C J, Ivey FM, Gardner A W, Macko R F, Fibrinolytic response to acute exercise In patients with

peripheral arterial disease Med Sci Sports Exerc 2001 Feb, 33(2)
214-9 La actividad de IFN-tau puede ensayarse *in vitro* al medir
la producción inducida por IFN-tau de una proteína 70 kD acida en
explantes cultivados de endometrio preparado de ovejas hembras
5 en el día 13 del ciclo estroso (Mol Endocrinol 1990 Oct, 4(10)
1506-1514)

La actividad de Troponin I puede ensayarse *in vitro*
utilizando un ensayo de unión de miofibrilo (J Muscle Res Cell
Motil 1999 Nov, 20(8) 755-760) La actividad de oxidasa urato
10 puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo para oxidación
catalizada por uricasa de ácido urico (Anal Chem May 15, 1999,
71(10) 1928-1934), o por Inmunoensayo de oxidasa urato
recombinante (J Pharm Sci 1996 Sep, 85(9) 955-959) La
actividad de uroquinasa puede medirse *in vitro* utilizando un
15 ensayo de división de plasminógeno Sazonova *et al* (J Biol Chem
Jan 18, 2001, electronic publication prior to print) La actividad
de VEGF-I puede ensayarse *in vitro* utilizando un ensayo de
proliferación celular endotelial (Proc Natl Acad Sci U S A 1989
Feb, 86(3) 802-806) La actividad de Viscumin puede ensayarse
20 utilizando granulocito y ensayos de activación de neutrófilo
(Anticancer Res 1999 Jul-Aug, 19(4B) 2925-2928, y J Leukoc Biol
2000 Dec, 68(6) 845-853)

Preparación de Ligandos Basados en Inmunoglobulina

25 Los ligandos de unión (por ejemplo, dAbs) como se describe

en la presente de acuerdo a la invención puede prepararse de acuerdo a las técnicas previamente establecidas, utilizadas en el campo de elaboración de anticuerpos, para la preparación de scFv, anticuerpos "fago" y otras moléculas de anticuerpo elaboradas. Las técnicas para la preparación de anticuerpos se describen por ejemplo en las siguientes revisiones y las referencias citadas en la presente Winter & Milstein, (1991) *Nature* 349 293-299, Pluckthun (1992) *Immunological Reviews* 130 151-188, Wright *et al.*, (1992) *Crit Rev Immunol* 12 125-168, Holliger, P & Winter, G (1993) *Curr Op Biotechn* 4, 446-449, Carter *et al* (1995) *J Hematother* 4, 463-470, Chester, K A & Hawkins, R E (1995) *Trends Biotechn* 13, 294-300, Hoogenboom, H R (1997) *Nature Biotechnol* 15, 125-126, Fearon, D (1997) *Nature Biotechnol* 15, 618-619, Pluckthun, A & Pack, P (1997) *Immunotechnology* 3, 83-105, Carter, P & Merchant, A M (1997) *Curr Opin Biotechnol* 8, 449-454, Holliger, P & Winter, G (1997) *Cancer Immunol Immunother* 45, 128-130

Las técnicas adecuadas empleadas para la selección de dominios variables de anticuerpo con una especificidad deseada emplean bibliotecas y procedimientos de selección que se conocen en la materia. Bibliotecas naturales (Marks *et al* (1991) *J Mol Biol*, 222 581, Vaughan *et al* (1996) *Nature Biotech* , 14 309), los cuales utilizan genes V recolocados colectados de células B humanas se conocen bien por aquellos expertos en la materia. Bibliotecas Sintéticas (Hoogenboom & Winter (1992) *J Mol Biol*,

227 381, Barbas *et al* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89
 4457, Nissim *et al* (1994) *EMBO J*, 13 692, Griffiths *et al* (1994)
EMBO J 13 3245, De Krulff *et al* (1995) *J Mol Biol*, 248 97) se
 preparan al clonar los genes V de inmunoglobulina, usualmente
 5 utilizando PCR Los errores en el proceso de PCR pueden
 conducir a un alto grado de selección al azar Las bibliotecas V_H
 y/o V_L pueden seleccionarse contra antígenos o epítopos objetivo
 por separado, en cuyo caso la unión de dominio unico se
 selecciona directamente para, o juntos

10

Sistemas de Vector de Biblioteca

Una variedad de sistemas de selección se conocen en la
 materia que son adecuados para utilizarse en la presente
 invención Los ejemplos de tales sistemas se describen abajo

15

Los sistemas de expresión lambda de bacteriófago pueden
 seleccionarse directamente como placas bacteriófagas o como
 colonias de lisógenos, ambos segun se describe previamente
 (Huse *et al* (1989) *Science*, 246 1275, Caton y Koprowski (1990)
Proc Natl Acad Sci U S A, 87, Mullinax *et al* (1990) *Proc Natl*
 20 *Acad Sci U S A* 87 8095, Persson *et al* (1991) *Proc Natl*
Acad Sci U S A, 88 2432) y son de uso en la invención
 Mientras que tales sistemas de expresión pueden utilizarse para
 seleccionar hasta 10⁶ diferentes miembros de una biblioteca, no se
 adecuan fácilmente para selección de numeros más grandes (más
 25 de 10⁸ miembros) De uso particular en la construcción de

bibliotecas son sistemas de despliegue de selección, los cuales permiten a un ácido nucleico unirse al polipéptido que expresa. Según se utiliza en la presente, un sistema de despliegue de selección es un sistema que permite la selección, por medio de despliegue adecuado, de los miembros individuales de la biblioteca al unir los ligandos genéricos y/u objetivos.

Los protocolos de selección para aislar a los miembros deseados de grandes bibliotecas se conocen en la materia, según se tipifica por las técnicas de despliegue de fago. Tales sistemas, en los cuales diversas secuencias de péptido se despliegan en la superficie de bacteriófago filamentosos (Scott y Smith (1990) *Science*, 249: 386), se han probado útiles para crear bibliotecas de fragmentos de anticuerpo (y las secuencias de nucleótido que las codifican) para la selección *in vitro* y amplificación de fragmentos de anticuerpo específico que unen un antígeno objetivo (McCafferty *et al.*, WO 92/01047). Las secuencias de nucleótido que codifican las regiones variables se unen a fragmentos de gen que codifican las señales líder que dirigen las mismas al espacio periplásmico de *E. coli* y como un resultado los fragmentos de anticuerpo resultante se despliegan en la superficie del bacteriófago típicamente como fusiones a proteínas de cabra bacteriófagas (por ejemplo, pIII o pVIII). Alternativamente, los fragmentos de anticuerpo se despliegan externamente en cápsidas de fago lambda (fagocuerpos). Una ventaja de los sistemas de despliegue basados en fago es que, debido a que son sistemas

biológicos, los miembros de biblioteca seleccionada pueden amplificarse simplemente al crecer el fago que contiene el miembro de biblioteca seleccionada en células bacterianas. Además, ya que la secuencia de nucleótido que codifica el miembro de biblioteca de polipéptido se contiene en un fago o vector fagomido, secuenciación, expresión y manipulación genética subsiguiente es relativamente hacia adelante.

Los métodos para la construcción de bibliotecas de despliegue de anticuerpo bacteriófago y bibliotecas de expresión de fago lambda se conocen bien en la materia (McCafferty *et al* (1990) *Nature*, 348 552, Kang *et al* (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 4363, Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352 624, Lowman *et al* (1991) *Biochemistry*, 30 10832, Burton *et al* (1991) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88 10134, Hoogenboom *et al* (1991) *Nucleic Acids Res*, 19 4133, Chang *et al* (1991) *J Immunol*, 147 3610, Breitling *et al* (1991) *Gene*, 104 147, Marks *et al* (1991) *supra*, Barbas *et al* (1992) *supra*, Hawkins y Winter (1992) *J Immunol*, 22 867, Marks *et al*, 1992, *J Biol Chem*, 267 16007, Lerner *et al* (1992) *Science*, 258 1313, incorporadas en la presente para referencia).

Un procedimiento particularmente ventajoso ha sido el uso de bibliotecas de fago scFv (Huston *et al*, 1988, *Proc Natl Acad Sci U S A*, 85 5879-5883, Chaudhary *et al* (1990) *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87 1066-1070, McCafferty *et al* (1990) *supra*, Clackson *et al* (1991) *Nature*, 352 624, Marks *et al* (1991) *J Mol*

Biol, 222 581, Chiswell *et al* (1992) *Trends Biotech* , 10 80, Marks *et al* (1992) *J Biol Chem* , 267) Varias modalidades de las bibliotecas scFv desplegadas en proteínas de cabra bacteriófaga, se han descrito Los refinamientos de los procedimientos del
5 despliegue de fago también se conocen, por ejemplo segun se describe en WO96/06213 y WO92/01047 (Medical Research Council *et al*) y WO97/08320 (Morphosys), los cuales se incorporan en la presente para referencia

Otros sistemas para generar las bibliotecas de polipéptidos
10 incluyen el uso de maquinaria enzimática libre de célula para la síntesis *in vitro* de los miembros de biblioteca En un método, las moléculas de ARN se seleccionan por rondas alternativas de selección contra un ligando objetivo y amplificación PCR (Tuerk y Gold (1990) *Science*, 249 505, Ellington y Szostak (1990) *Nature*
15 346 818) Una técnica similar puede utilizarse para identificar las secuencias de ADN que se unen al factor de transcripción humano predeterminado (Thiesen y Bach (1990) *Nucleic Acids Res* , 18 3203, Beaudry y Joyce (1992) *Science*, 257 635, WO92/05258 y WO92/14843) En una manera similar, la translación *in vitro* puede
20 utilizarse para sintetizar los polipéptidos como un método para generar las grandes bibliotecas Estos métodos que generalmente comprenden complejos de polisoma establecidos, se describen además en WO88/08453, WO90/05785, WO90/07003 WO91/02076, WO91/05058, y WO92/02536 Los sistemas de
25 despliegue alternos que no se basan en fagos, tales como aquellos

descritos en WO95/22625 y WO95/11922 (Affymax) utilizan los polisomas para desplegar los polipéptidos para la selección

Todavía una categoría adicional de las técnicas incluye la selección de repertorios en compartimientos artificiales, los cuales
5 permiten el enlace de un gen con su producto de gen Por ejemplo, un sistema de selección en el cual los ácidos nucleicos que codifican los productos de gen deseable pueden seleccionarse en microcápsulas formadas por emulsiones de agua en aceite se describe en WO99/02671, WO00/40712 y Tawfik & Griffiths (1998)
10 *Nature Biotechnol* 16(7), 652-6 Los elementos genéticos que codifican un producto de gen teniendo una actividad deseada se dividen en microcápsulas y después se transcriben y/o trasladan para producir sus productos de gen respectivos (ARN o proteína) dentro de las microcápsulas Los elementos genéticos que
15 producen el producto de gen que tiene actividad deseada se eligen subsecuentemente Este procedimiento elige los productos de gen de interés al detectar la actividad deseada por una variedad de medios

20 Construcción de Biblioteca

Las bibliotecas pretendidas para selección, pueden construirse utilizando técnicas conocidas en la materia, por ejemplo según se establece anteriormente, o pueden adquirirse de fuentes comerciales Las bibliotecas que son útiles en la presente
25 invención se describen, por ejemplo, en WO 99/20749 Una vez

que un sistema de vector se elija y una o más secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos de interés se clonan en el vector de biblioteca, uno puede generar diversidad dentro de las moléculas clonadas al tomar la mutagenesis antes de la expresión, 5 alternativamente, las proteínas codificadas pueden expresarse y seleccionarse, según se describe anteriormente, antes de la mutagenesis y rondas adicionales de selección se realizan. La mutagenesis de las secuencias de ácido nucleico que codifican polipéptidos estructuralmente optimizados se lleva a cabo por 10 métodos moleculares estándares. De particular uso se encuentra la reacción en cadena de polimerasa, o PCR, (Mullis y Faloona (1987) *Methods Enzymol*, 155 335, en la presente incorporada para referencia). PCR, el cual utiliza múltiples ciclos de duplicación de ADN catalizada por un termoestable, polimerasa de 15 ADN dependiente de ADN para amplificar la secuencia objetivo de interés, se sabe bien en la materia. La construcción de varias bibliotecas de anticuerpo se han discutido en Winter *et al* (1994) *Ann Rev Immunology* 12, 433-55, y referencias citadas en el mismo.

20 PCR se realiza utilizando ADN templado (al menos 1 fg, más útilmente, 1-1000 ng) y al menos 25 pmol de cebadores de oligonucleótido, puede ser ventajoso para utilizar una cantidad más grande de cebador cuando el grupo cebador es altamente heterogéneo, a medida que tal secuencia se representa por 25 solamente una pequeña fracción de las moléculas del grupo, y las

cantidades llegan a ser limitantes en los últimos ciclos de amplificación. Una mezcla de reacción típica incluye 2 µl de ADN, 25 pmol de cebador oligonucleótido, 2.5 µl de 10X de regulador 1 PCR (Perkin-Elmer, Foster City, CA), 0.4 µl de 1.25 µM de dNTP, 5 0.15 µl (o 2.5 unidades) de polimerasa de ADN Taq (Perkin Elmer, Foster City, CA) y agua desmineralizada a un volumen total de 25 µl. El aceite mineral se sobre recubre y el PCR se realiza utilizando un ciclador térmico programable. La longitud y la temperatura de cada etapa de un ciclo PCR, así como también el 10 número de ciclos, se ajusta de acuerdo a los requisitos de rigurosidad en efecto. La temperatura de amasamiento y sincronización se determinan tanto por la eficiencia con el cual se espera que un cebador se amase para un templado y el grado de desigualdad que se tolerará, obviamente, cuando las moléculas de 15 ácido nucleico se amplifican y mutagenizan simultáneamente, se requiere la desigualdad, al menos en la primera ronda de síntesis. La habilidad de optimizar la rigurosidad de las condiciones de amasamiento de cebador se encuentra bien dentro del conocimiento de un experto en la materia. Una temperatura de 20 amasamiento de entre 30°C y 72°C se utiliza. La desnaturalización inicial de las moléculas templadas normalmente ocurre en entre 92°C y 99°C por 4 minutos, seguido por 20-40 ciclos consistiendo de desnaturalización (94-99° por 15 segundos a 1 minuto), amasamiento (temperatura determinada según se 25 discute anteriormente, 1-2 minutos) y extensión (72°C por 1-5

minutos, dependiendo de la longitud del producto amplificado)

La extensión final generalmente es de 4 minutos a 72°C, y puede seguirse por una etapa infinita (0-24 horas) a 4°C

5 Dominios Variables Unicos en Combinación

Los dominios utiles en la invención, una vez seleccionados, pueden combinarse por una variedad de métodos conocidos en la materia, incluyendo métodos covalentes y no covalentes. Los métodos preferidos incluyen el uso de enlazadores de polipéptido, segun se describe, por ejemplo, en relación con las moléculas scFv (*Bird et al*, (1988) *Science* 242 423-426). SE proporciona la discusión de enlazadores adecuados en *Bird et al* *Science* 242, 423-426, *Hudson et al*, *Journal Immunol Methods* 231 (1999) 177-189, *Hudson et al*, *Proc Nat Acad Sci USA* 85, 5879-5883. Los enlazadores son preferentemente flexibles, permitiendo a los dos dominios unicos interactuar. Un ejemplo enlazador es un enlazador (Gly₄ Ser)_n, donde n=1 a 8, por ejemplo, 2, 3, 4, 5 o 7. Los enlazadores utilizados en anticuerpos, que son menos flexibles, también pueden emplearse (*Holliger et al*, (1993) *PNAS* (USA) 90 6444-6448). En una modalidad, el enlazador empleado no es una región de articulación de Inmunoglobulina.

Los dominios variables pueden combinarse utilizando métodos diferentes a enlazadores. Por ejemplo, el uso de puentes de disulfuro, proporcionados a través de los residuos de cisteína elaborados o que se presentan naturalmente, pueden explotarse

para estabilizar dímeros $V_H'V_H'V_L'V_L$ o $VR-V_L$ (Relter *et al.*, (1994) *Protein Eng* 7 697-704) o al remodelar la interfase entre los dominios variables para mejorar el "ajuste" y de esta manera la estabilidad de interacción (Ridgeway *et al.*, (1996) *Protein Eng* 5 7 617-621, Zhu *et al.*, (1997) *Protein Science* 6 781-788) Otras técnicas para unir o estabilizar los dominios variables de inmunoglobulinas, y en particular dominios de anticuerpo V_H , pueden emplearse como adecuados

10 Caracterización de Ligandos

La unión de un ligando (por ejemplo, monómero dAb, ligando específico dual) a su (s) antígeno (s) específico (s) o epítipo (s) puede (n) probarse por métodos que serán familiares a aquellos expertos en la materia e incluyen ELISA En una modalidad preferida de la invención, la unión se prueba utilizando ELISA fago monoclonal ELISA fago puede realizarse de acuerdo a cualquier procedimiento adecuado un protocolo ejemplar se establece abajo

Las poblaciones de fago producidas en cada ronda de selección pueden seleccionarse para la unión por ELISA al antígeno o epítipo seleccionado, para identificar los anticuerpos de fago "policlonal" El fago de colonias bacterianas infectadas únicas de estas poblaciones puede seleccionarse así por ELISA para identificar los anticuerpos de fago "monoclonal" También es deseable seleccionar los fragmentos de anticuerpo soluble para

unirse a antígeno o epitopo, y esto también puede tomarse por ELISA utilizando reactivos, por ejemplo, contra una etiqueta de terminal N o C (ver por ejemplo Winter *et al* (1994) *Ann Rev Immunology* 12, 433-55 y referencias citadas en la presente

5 La diversidad de los anticuerpos monoclonales de fago seleccionado también pueden valorarse por electroforesis de gel de productos PCR (Marks *et al* 1991, *supra*, Nissim *et al* 1994 *supra*), probando (Tomlinson *et al*, 1992) *J Mol Biol* 227, 776) o al secuencia el vector ADN

10

Estructura de ligandos

En el caso de que los dominios variables se seleccionan de repertorios de gen V seleccionados por ejemplo utilizando tecnología de despliegue según se describe en la presente, entonces estos dominios variables comprenden una región de estructura universal, de tal forma que pueden reconocerse por un ligando genérico específico según se define en la presente. El uso de estructuras universales, los ligandos genéricos y lo similar se describe en WO 99/20749

20 En donde los repertorios de gen V se utilizan, la variación en la secuencia de polipéptido se ubica preferentemente dentro de los ciclos estructurales de los dominios variables. Las secuencias de polipéptido ya sea de dominio variable pueden alterarse por cambio de ADN o por mutación a fin de mejorar la interacción de cada dominio variable con su par complementario. El cambio de

25

ADN se conoce en la materia y se enseña, por ejemplo, por Stemmer, 1994, *Nature* 370 389-391 y Patente de EE UU No 6,297,053, ambos de los cuales se incorporan en la presente para referencia. Otros métodos de mutagenesis se conocen bien por aquellos expertos en la materia.

En general, las moléculas de ácido nucleico y las construcciones de vector requeridas para selección, preparación y formateo de ligandos pueden construirse y manipularse según se establece en manuales de laboratorio estándar, tal como Sambrook *et al* (1989,) *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, USA.

La manipulación de ácidos nucleicos útiles en la presente invención se llevan a cabo típicamente en vectores recombinantes.

Según se utiliza en la presente, el vector se refiere a un elemento discreto que se utiliza para introducir ADN heterólogo en células para la expresión y/o duplicación de las mismas. Los métodos por los cuales se selecciona o construye y, por consecuencia, utilizan tales vectores, se conocen bien por un experto en la materia. Los numerosos vectores se encuentran públicamente disponibles, incluyendo plásmidos bacterianos, bacteriófago, cromosomas artificiales y vectores episomales. Tales vectores pueden utilizarse para simple clonación y mutagenesis, se emplea alternativamente el vector de expresión de gen. Un vector para utilizarse de acuerdo a la invención puede seleccionarse para acomodar una secuencia codificadora de

polipéptido de un tamaño deseado, típicamente de 0.25 kilobase (kb) a 40 kb o más en célula huésped adecuada de longitud. A se transforma con el vector después de las manipulaciones de clonación *in vitro*. Cada vector contiene varios componentes
5 funcionales, que generalmente incluyen un sitio de clonación (o "polienlazador"), un origen de duplicación y al menos un gen marcador elegible. Si el vector dado es un vector de expresión, adicionalmente posee uno o más de los siguientes elementos: reforzador, promotor, terminación de transcripción y secuencias de
10 señal, cada uno colocado en la proximidad del sitio de clonación, de tal forma que se unen operativamente al gen que codifica un ligando de acuerdo a la invención.

Tanto los vectores de clonación como expresión generalmente contienen secuencias de ácido nucleico que
15 permiten al vector duplicarse en una o más células huésped seleccionada. Típicamente en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector duplicarse independientemente del ADN cromosómico huésped e incluye
20 orígenes de duplicación o secuencias de duplicación autónoma. Tales secuencias se conocen bien en la materia por una variedad de bacteria, levadura y virus. El origen de duplicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de la bacteria de gramo negativo, el origen plásmido de 2 micras es adecuado para levadura, y varios orígenes virales (por ejemplo, SV 40,
25 adenovirus) son útiles para los vectores de clonación en células de

mamífero. Generalmente, el origen de duplicación no es necesario para los vectores de expresión de mamífero al menos que estos se utilicen en células de mamífero capaces de duplicar niveles altos de ADN, tales como células COS.

5 Ventajosamente, un vector de expresión o clonación puede contener un gen de selección también referido como un marcador elegible. Este gen codifica una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células huésped transformadas
10 crecidas en un medio de cultivo selectivo. Las células huésped no transformadas con el vector que contienen el gen de selección por lo tanto no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típica codifican las proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, deficiencias auxotróficas
15 complementarias, o suministro de nutrientes crítico no disponible en el medio de crecimiento.

Ya que la duplicación de vectores que codifican un ligando de acuerdo a la presente invención se realiza más preferentemente en *E. coli*, un marcador elegible *E. coli*, por ejemplo, el gen β -
20 lactamasa que confiere resistencia a la ampicilina antibiótica, es de uso. Estos pueden obtenerse de plásmidos *E. coli*, tales como pBR322 o un plásmido pUC tal como pUC18 o pUC19.

Los vectores de expresión usualmente contienen un promotor que se reconoce por el organismo huésped y se une
25 operativamente a la secuencia codificadora de interés. Tal

promotor puede ser inducible o constitutiva El término "operativamente enlazada" se refiere a una yuxtaposición en donde los componentes descritos se encuentran en una relación que les permite funcionar en su manera pretendida Una secuencia de control "operativamente enlazada" a una secuencia de codificación se liga de tal manera que la expresión de la secuencia de codificación se logra bajo condiciones compatibles con las secuencias de control

Los promotores adecuados para utilizarse con huéspedes procarlióticos incluyen, por ejemplo, los sistemas de promotor de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema de promotor triptofan (trp) y promotores híbridos tales como el promotor tac Los promotores para utilizarse en sistemas bacterianos también generalmente contendrán una secuencia Shine-Delgarno operativamente unida a la secuencia de codificación

Los vectores preferidos son vectores de expresión que permite la expresión de una secuencia de nucleótido correspondiente a un miembro de biblioteca de polipéptido De esta manera la selección con el primer y/o segundo antígeno o epítipo puede realizarse por propagación separada y expresión de un clon único que expresa el miembro de biblioteca de polipéptido o por uso de cualquier sistema de despliegue de selección Según se describe anteriormente el sistema de despliegue de selección preferido es el despliegue de bacteriófago De esta manera, los vectores fago o fagomido pueden utilizarse, por ejemplo, pIT1 o

pIT2 Las secuencias líder útiles en la invención incluyen *pe1B*, *stII*, *ompA*, *phoA*, *bla* y *paiA*. Un ejemplo son vectores de fagomido que tienen un origen de duplicación *E. coli* (para duplicación de doble filamento) y también un origen fago de duplicación (para la producción de ADN de filamento único). La manipulación y expresión de tales vectores se conoce bien en la materia (Hoogenboom y Winter (1992) *supra*, Nissim *et al.* (1994) *supra*). En resumen, el vector contiene un gen β -lactamasa para conferir selectividad en el fagomido y un promotor *lac* río arriba de un casete de expresión que consiste (terminal N o C) de una secuencia líder *pe1B* (que dirige el polipéptido expresado al espacio periplasmico), un sitio de clonación múltiple (para clonación de la versión de nucleótido del miembro de biblioteca), opcionalmente, uno o más etiquetas de péptido (para detección) opcionalmente uno o más de codón de detención TAG y la proteína fago pIII. De esta manera, utilizando varias cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, iso-propilo tio- β -D-galactosido (IPTG) o un fago auxiliar, tal como VCS M13, el vector es capaz de duplicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro de biblioteca de polipéptido solamente o producir fago, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido pIII en su superficie.

La construcción de vectores que codifican los ligandos de acuerdo a la invención emplea técnicas de ligación

convencionales Los vectores aislados o fragmentos de ADN se dividen, cortan, y vuelven a ligar en la forma deseada para generar el vector requerido Si se desea, el análisis para confirmar que las secuencias correctas se presentan en el vector construido pueden realizarse en una forma conocida Los métodos adecuados para construcción de vectores de expresión, preparar las transcripciones *in vitro*, introducir el ADN en células huésped, y realizar análisis para valorar la expresión y función se conocen por aquellos expertos en la materia La presencia de una secuencia de gen en una muestra se detecta, o su amplificación y/o expresión cuantificada por métodos convencionales, tal como análisis southern o Northern, Western blotting, dot blotting de ADN, ARN o proteína, hibridización *in situ*, inmunocitoquímica o análisis de secuencia de ácido nucleico o moléculas de proteína Aquellos expertos en la materia fácilmente contemplarán como estos métodos pueden modificarse, si se desea

Estructuras

Las estructuras pueden basarse en moléculas de inmoglobulina o pueden ser de no inmoglobulina en origen según se establece anteriormente Las estructuras de inmoglobulina preferidas según se definen en la presente incluye cualquiera de uno o más de aquellos seleccionados de lo siguiente una molécula de inmoglobulina comprendiendo al menos (i) la CL (subclase kappa o lambda) dominio de un

anticuerpo, o (ii) el dominio CH1 de una cadena pesada de anticuerpo, una molécula de inmunoglobulina comprendiendo los dominios CH1 y CH2 de una cadena pesada de anticuerpo, una molécula de inmunoglobulina comprendiendo los dominios CH1, CH2 y CH3 de una cadena pesada de anticuerpo, o cualquiera del subgrupo (ii) junto con el dominio CL (subclase kappa o lambda) de un anticuerpo. Un dominio de región de articulación puede también incluirse. Tales combinaciones de dominios, por ejemplo, pueden imitar los anticuerpos naturales, tales como IgG o IgM, o fragmentos de los mismos, tales como moléculas Fv, scFv, Fab o F(ab')₂. Aquellos expertos en la materia estarán concientes de que esta lista no se presenta que sea exhaustiva.

Andamios de Proteína

Cada dominio de unión de epítipo comprende un andamio de proteína y uno o más CDRs que se incluyen en la interacción específica del dominio con uno o más epítopos. Ventajosamente, un dominio de unión de epítipo de acuerdo a la presente invención comprende tres CDRs. Los andamios de proteína adecuados incluyen cualquiera de aquellos seleccionados del grupo que consiste de lo siguiente: aquellos basados en dominios de inmunoglobulina, aquellos basados en fibronectina, aquellos basados de anticuerpos, aquellos basados en CTLA4, aquellos basados en chaperonas tales como GroEL, aquellos basados en lipocalina y aquellos basados en receptores Fc bacterianos SpA y

SpD Aquellos expertos en la materia aprecian que esta lista no sea pretende que sea exhaustiva

Andamios para utilizarse en los Ligandos en Construcción

5 Selección de la Conformación de cadena principal

Los miembros de la superfamilia de inmunoglobulina todos comparten un pliegue similar para su cadena de polipéptido. Por ejemplo, a pesar de que los anticuerpos son altamente diversos en términos de su secuencia primaria, la comparación de secuencias y estructuras cristalográficas ha revelado que, contrario a la expectativa, cinco de los seis ciclos de unión de antígeno de anticuerpos (H1, H2, L1, L2, L3) adoptan un número limitado de conformaciones de cadena principal, o estructuras canónicas (Chothia y Lesk (1987) *J Mol Biol*, 196 901, Chothia et al (1989) *Nature*, 342 877). El análisis de longitudes de ciclo y residuos clave han permitido por lo tanto la mayoría de anticuerpos humanos (Chothia et al (1992) *J Mol Biol*, 227 799, Tomlinson et al (1995) *EMSO J*, 14 4628, Williams et al (1996) *J Mol Biol* 264 220). A pesar de que la región H3 es mucho más diversa en términos de secuencia, la longitud y estructura (debido al uso de segmentos D) también forma un número limitado de conformaciones de cadena principal para longitudes de ciclo corto que dependen de la longitud y la presencia de residuos particulares, o tipos de residuo, en posiciones clave en el ciclo y la estructura de anticuerpo (Martin et al (1996) *J Mol Biol*, 263

800, Shirai *et al* (1996) FEBS Letters, 399 1)

Las bibliotecas de ligandos y/o dominios pueden diseñarse en los cuales ciertas longitudes de ciclo y residuos clave se han elegido para asegurar que la conformación de cadena principal de los miembros se conoce. Ventajosamente, estos son conformaciones reales de las moléculas de superfamilia de inmunoglobulina encontradas en naturaleza, para minimizar los cambios que no son funcionales, según se discute anteriormente. Los segmentos de gen de línea de germen V sirven como una estructura básica adecuada para construir el anticuerpo o bibliotecas de receptor de célula T, otras secuencias también son de uso. Las variaciones pueden presentarse a una baja frecuencia, de tal forma que un pequeño número de miembros funcionales puede poseer una conformación de cadena principal alterada, lo cual no afecta su función.

La teoría de estructura canónica es también de uso para valorar el número de diferentes conformaciones de cadena principal codificadas por ligandos, para pronosticar la conformación de cadena principal en base a las secuencias de ligando y para elegir los residuos para la diversificación que no afectan la estructura canónica. Se sabe que, en el dominio V_K humano, el ciclo L1 puede adoptar una de cuatro estructuras canónicas, el ciclo L2 tiene una estructura canónica única y que 90% de los dominios V_K humanos adoptan una de cuatro o cinco estructuras canónicas para el ciclo L3 (Tomlinson *et al* (1995).

supra), de esta manera en el dominio V_K solo, diferentes estructuras canónicas pueden combinarse para crear un rango de diferentes conformaciones de cadena principal. Dado que el dominio V_L codifica un diferente rango de estructuras canónicas para los ciclos L1, L2 y L3 y que los dominios V_K y V_L pueden emparejarse con cualquier dominio V_H que puede codificar varias estructuras canónicas para los ciclo H1 y H2, el numero de combinaciones de estructura canónica observadas para estos cinco ciclos es muy grande. Esto implica que la generación de diversidad en la conformación de cadena principal puede ser esencial para la producción de un amplio rango de especificidades de unión. Sin embargo, al construir una biblioteca de anticuerpo en una conformación de cadena principal conocida unica se ha encontrado, contrario a la expectación, que la diversidad en la conformación de cadena principal no se requiere para generar suficiente diversidad para tener como objetivo sustancialmente todos los antígenos. Aun más sorprendentemente, la conformación de cadena principal unica no necesita ser una estructura consenso – una conformación que se presenta naturalmente unica puede utilizarse como la base para una biblioteca entera. De esta manera, en un aspecto preferido, los ligandos especificos duales de la invención poseen una conformación de cadena principal conocida unica.

La conformación de cadena principal unica que se elige es preferentemente de lugar comun entre las moléculas del tipo de

superfamilia de inmunoglobulina en cuestión. Una conformación es de lugar común cuando un significativo número de moléculas que se presentan naturalmente son observadas para adoptarla. De acuerdo con lo anterior, en un aspecto preferido de la invención, la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada ciclo de unión de un dominio de inmunoglobulina se consideran por separado y después un dominio variable que se presenta naturalmente se elige, el cual posee la combinación deseada de conformaciones de cadena principal para los diferentes ciclos. Si ninguno está disponible, el equivalente más cercano puede elegirse. Es preferible que la combinación deseada de conformaciones de cadena principal para los diferentes ciclos se crea al seleccionar los segmentos de gen de línea germinal que codifican las conformaciones de cadena principal deseada. Es más preferible, que los segmentos de gen de línea germinal seleccionados se expresan frecuentemente en naturaleza, y más preferentemente que son los más frecuentemente expresados de todos los segmentos de gen de línea germinal naturales.

En el diseño de ligandos (por ejemplo, dAbs) o bibliotecas de los mismos la incidencia de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada uno de los seis ciclos de unión de antígeno pueden considerarse por separado. Para H1, H2, L1, L2 y L3, una conformación dada que se adopta por entre 20% y 100% de los ciclos de unión de antígeno de moléculas que se presentan

naturalmente se elige. Típicamente, su incidencia observada es arriba de 35% (es decir, entre 35% y 100%) e, idealmente, arriba de 50% o aun arriba de 65%. Ya que la mayoría vasta de ciclos H3 no tienen estructuras canónicas, es preferible elegir una conformación de cadena principal que sea de lugar comun entre aquellos ciclos que no despliegan las estructuras canónicas. Para cada uno de los ciclos, la conformación que se observa más frecuentemente en el repertorio natural se selecciona por lo tanto. En anticuerpos humanos, las estructuras canónicas más populares (CS) para cada ciclo son como sigue: H1 - CS 1 (79% del repertorio expresado), H2 - CS 3 (46%), LI - CS 2 de V_{λ} (39%), L2 - CS 1 (100%), L3 - CS 1 de V_{λ} (36%) (cálculo asume una relación κ/λ ratio de 70/30, Hood et al (1967) Cold Spring Harbor Symp Quant Biol 48: 133). Para los ciclos H3 que tienen estructuras canónicas, una longitud de CDR3 (Kabat et al (1991) *Sequences of proteins of immunological interest*, U S Department de Health y Human Services) de siete residuos con un puente de sal de residuo 94 a residuo 101 parece que es el más comun. Existen al menos 16 secuencias de anticuerpo humano en la biblioteca de datos EMBL con la longitud H3 requerida y los residuos clave para formar esta conformación y al menos dos estructuras cristalográficas en el banco de datos de proteina que pueden utilizarse como una base para el moldeado de anticuerpo (2 cgr y 1tet). Los segmentos de gen de línea germinal más frecuentemente expresada que esta combinación de estructuras

canónicas son el segmento V_H 3-23 (DP-47), el segmento J_H JH4b, el segmento V_κ 02/012 (DPK9) y el segmento J_κ J_κ1. Los segmentos V_H DP45 y DP38 también son adecuados. Estos segmentos pueden por lo tanto utilizarse en combinación como una base para construir una biblioteca con la conformación de cadena principal única.

Alternativamente, en lugar de elegir la conformación de cadena principal única en base a la ocurrencia natural de las diferentes conformaciones de cadena principal para cada uno de los ciclos de unión en aislamiento, la ocurrencia natural de combinaciones de conformaciones de cadena principal se utiliza como la base para elegir la conformación de cadena principal única. En el caso de anticuerpos, por ejemplo, la ocurrencia natural de combinaciones de estructura canónica por cualquiera de dos, tres, cuatro, cinco o todos los seis de los ciclos de unión de antígeno pueden determinarse. Aquí, es preferible que la conformación elegida sea de lugar común en anticuerpos que se presentan naturalmente y más preferentemente que se observa más frecuentemente en el repertorio natural. De esta manera, en anticuerpos humanos, por ejemplo, cuando las combinaciones naturales de los cinco ciclos de unión por antígeno, H1, H2, L1, L2 y L3, se consideran la combinación más frecuente de las estructuras canónicas se determina y después se combina con la conformación más popular para el ciclo H3, como una base para elegir la conformación de cadena principal única.

Diversificación de la Secuencia Canónica

Habiendo seleccionado varias conformaciones de cadena principal conocidas o, preferentemente una conformación de cadena principal conocida única los ligandos (por ejemplo, dAbs) o bibliotecas para utilizarse en la invención pueden construirse al variar el sitio de unión de la molécula a fin de generar un repertorio con diversidad estructural y/o funcional. Esto significa que las variantes se generan de tal forma que poseen suficiente diversidad en su estructura y/o su función de tal forma que son capaces de proporcionar un rango de actividades.

La diversidad deseada se genera típicamente al variar la molécula seleccionada en una o más posiciones. Las posiciones a cambiar pueden elegirse al azar o se seleccionan preferentemente. La variación puede lograrse así ya sea por selección al azar, durante la cual el aminoácido residente se reemplaza por un aminoácido o análogo del mismo, natural o sintético, produciendo un muy gran número de variantes o al reemplazar el aminoácido residente con uno o más de un subgrupo de aminoácidos definido, produciendo un número más limitado de variantes.

Varios métodos se han reportado para introducir tal diversidad. El PCR propenso al error (Hawkins *et al* (1992) *J Mol Biol*, 226 889), mutagenesis química (Deng *et al* (1994) *J Biol Chem* 269 9533) o cepas de mutador bacteriano (Low *et al* (1996) *J Mol Biol*, 260 359) pueden utilizarse para introducir las mutaciones al azar en los genes que codifican la molécula. Los

métodos para mutar las posiciones seleccionadas también se conocen bien en la materia e incluyen el uso de oligonucleótidos desiguales o degenerar los oligonucleótidos, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, varias bibliotecas de anticuerpo sintético se han creado al tener como objetivo mutaciones a los ciclos de unión de antígeno. La región H3 de Fab de unión por toxoide tetano humano se ha seleccionado al azar para crear un rango de nuevas especificidades de unión (Barbas *et al* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 4457). Las regiones H3 y L3 al azar o semi-azar se han anexado a los segmentos de gen V de línea germinal para producir grandes bibliotecas con regiones de estructura no mutadas (Hoogenboom & Winter (1992) *J Mol Biol*, 227 381, Barbas *et al* (1992) *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 4457, Nissim *et al* (1994) *EMBO J*, 13 692, Griffiths *et al* (1994) *EMBO J*, 13 3245, De Kruif *et al* (1995) *J Mol Biol* 248 97). Tal diversificación se ha extendido para incluir ciertos o todos los otros ciclos de unión de antígeno (Cramer *et al* (1996) *Nature Med*, 2 100, Riechmann *et al* (1995) *Bio/Technology*, 13 475, Morphosys, WO97/08320, *supra*).

Ya que la selección al azar del ciclo tiene el potencial de crear aproximadamente más de 10^{15} estructuras para H3 solo y un de igual forma un gran número de variantes para los otros cinco ciclos, no es fácil utilizar la tecnología de transformación de corriente o aun utilizar los sistemas libres de célula para reducir una biblioteca que representa todas las combinaciones posibles

Por ejemplo, en una de las bibliotecas más grandes construidas a la fecha, 6×10^{10} diferentes anticuerpos, lo cual es solamente una fracción de la diversidad potencial para una biblioteca de su diseño, se generaron (Griffiths *et al* (1994) *supra*)

- 5 Preferentemente, solamente los residuos que se incluyen directamente en la creación o modificación de la función deseada de la molécula, se diversifican. Para varias moléculas, la función será unirse a un objetivo y por lo tanto la diversidad deberá concentrarse en el sitio de unión objetivo, mientras que se evita
- 10 cambiar los residuos que son cruciales al envasado global de la molécula o a mantener la conformación de cadena principal elegida

- Diversificación de la Secuencia Canónica a medida que aplica a
- 15 los Dominios de Anticuerpo

- En el caso de ligandos basados en anticuerpo (por ejemplo dAbs), el sitio de unión para el objetivo es más frecuente el sitio de unión de antígeno. De esta manera, preferentemente solamente aquellos residuos en el sitio de unión de antígeno se
- 20 varían. Estos residuos son extremadamente diversos en el repertorio de anticuerpo humano y se conocen por hacer contactos en complejos de anticuerpo/antígeno de alta resolución. Por ejemplo, en L2 se sabe que las posiciones 50 y 53 son diversas en anticuerpos que se presentan naturalmente y se observan para
- 25 hacer contacto con el antígeno. En contraste, el procedimiento

convencional pudiera haber sido diversificar todos los residuos en la Región Determinadora de Complementariedad (CDR1) correspondiente segun se define por Kabat *et al* (1991, supra, algunos siete residuos en comparación a los dos diversificados en la biblioteca para utilizarse de acuerdo a la invención. Esto representa una mejora importante en términos de la diversidad funcional requerida para crear un rango de especificidades de unión de antígeno.

En naturaleza, la diversidad de anticuerpo es el resultado de dos procesos: recombinación somática de los segmentos de gen V, D y J de línea germinal para crear un repertorio primario natural (tan llamado diversidad en conjunto y línea germinal) e hipermutación somática de los genes V relocalizados resultantes. El análisis de las secuencias de anticuerpo humano ha mostrado que la diversidad en el repertorio primario se enfoca en el centro del sitio de unión de antígeno mientras que la hipermutación somática esparce la diversidad a las regiones en la periferia del sitio de unión de antígeno que son altamente conservadas en el repertorio primario (ver Tomlinson *et al* (1996) *J Mol Biol*, 256 813). Esta complementariedad se ha producido probablemente como una estrategia eficiente para buscar el espacio de secuencia y, a pesar de ser aparentemente única a los anticuerpos, puede aplicarse fácilmente a otros repertorios de polipéptido. Los residuos que se varían son un subgrupo de aquellos que forman el sitio de unión para el objetivo. Los diferentes subgrupos

(incluyendo recubrimiento) de residuos en el sitio de unión objetivo se diversifican en diferentes etapas durante la selección, si se desea

En el caso de un repertorio de anticuerpo, un repertorio "natural" inicial puede crearse en donde ciertos, pero no todos, los residuos en el sitio de unión de antígeno se diversifican. Según se utiliza en la presente en este contexto, el término "natural" se refiere a moléculas de anticuerpo que tienen objetivo no predeterminado. Estas moléculas se asemejan a aquellas que se codifican por los genes inmunoglobulina de un individuo quien no ha superado la diversificación inmune, como es el caso con individuos recién nacidos y fetales, cuyos sistemas inmunes no se han cambiado aun por una amplia variedad de estímulos antigénicos. Este repertorio se selecciona así contra un rango de antígenos o epitopos. Si se requiere, la diversidad adicional puede introducirse así fuera de la región diversificada en el repertorio inicial. Este repertorio maduro puede seleccionarse para la función modificada, especificidad o afinidad.

Los repertorios naturales de los dominios de unión para la construcción de ligandos en los cuales algunos o todos los residuos en el sitio de unión de antígeno se varían, se conocen en la materia (Ver, WO 2004/058821 WO 2004/003019, y WO 03/002609). La biblioteca "primaria" imita el repertorio primario natural, con diversidad restringida a residuos en el centro del sitio de antígeno de unión que son diversos en los segmentos de gen V

de línea germinal (diversidad de línea germinal) o diversificarse durante el proceso de recombinación (diversidad conjuncional) Aquellos residuos que se diversifican incluyen, pero no se limitan a, H50, H52, H52a, H53, H55, H56, H58, H95, H96, H97, H98, L50, 5 L53, L91, L92, L93, L94 y L96 En la biblioteca "somática", la diversidad se restringe a residuos que se diversifican durante el proceso de recombinación (diversidad de unión) o se mutan altamente de manera somática Aquellos residuos que se diversifican incluyen, pero no se limitan a H31, H33, H35, H95 10 H96, H97, H98 L30, L31, L32, L34 y L96 Todos los residuos anteriormente listados como adecuados para la diversificación en estas bibliotecas se conocen por hacer contactos en uno o más complejos de anticuerpo-antígeno Ya que en ambas bibliotecas, no todos los residuos en el sitio de unión de antígeno se varían, la 15 diversidad adicional se incorpora durante la selección al variar los residuos restantes, si se desea hacerlo así Deberá ser aparente para aquellos expertos en la materia que cualquier subgrupo de cualquiera de estos residuos (o residuos adicionales que comprenden el sitio de unión de antígeno) pueden utilizarse para 20 la diversificación inicial y/o subsecuente del sitio de unión de antígeno

En la construcción de bibliotecas para utilizarse en la invención, la diversificación de las posiciones elegidas se logra típicamente en el nivel de ácido nucleico, al alterar la secuencia 25 codificadora que especifica la secuencia del polipéptido de tal

forma que un numero de posibles aminoácidos (todos 20 o un subgrupo de los mismos) pueden incorporarse en esa posición Utilizando la nomenclatura IUPAC el codón más versátil es NNK el cual codifica todos los aminoácidos así como también el codón de detención TAG El codón NNK se utiliza preferentemente a fin de introducir la diversidad requerida Otros codones que logran los mismos extremos son también de uso, incluyendo el codón NNN, el cual conduce a la producción de los codones de detención adicionales TGA y TAA

10 Una característica de la diversidad de cadena lateral en el sitio de unión de antígeno de anticuerpos humanos es una derivación pronunciada que favorece ciertos residuos de aminoácido Si la composición de aminoácido de las diez posiciones más diversas en cada una de las regiones V_H , V_K y V_L se suman, más de 76% de la diversidad de cadena sencilla llega a ser de solamente siete diferentes residuos, estos siendo, serina (24%), tirosina (14%), asparagina (11%), glicina (9%), alanina (7%), aspartato (6%) y treonina (6%) Esta derivación hacia los residuos hidrofílicos y los pequeños residuos que pueden proporcionar la flexibilidad de cadena principal probablemente refleja la evolución de las superficies que se predisponen a la unión de un amplio rango de antígenos o epítopos y pueden ayudar a explicar la promiscuidad requerida de anticuerpos en el repertorio primario

25 Ya que es preferible imitar esta distribución de aminoácidos,

la distribución de aminoácidos en las posiciones a variar preferentemente imita aquella observada en el sitio de unión de antígeno de anticuerpos. Tal derivación en la sustitución de aminoácidos que permite la selección de ciertos polipéptidos (no sólo polipéptidos de anticuerpo) contra un rango de antígenos objetivo se aplica fácilmente a cualquier repertorio de polipéptido. Existen varios métodos para derivar la distribución de aminoácido en la posición a variar (incluyendo el uso de mutagenesis de trinucleótido, ver WO 97/08320), de los cuales el método preferido, debido a la facilidad de síntesis, es el uso de codones degenerados convencionales. Al comparar el perfil de aminoácido codificado por todas las combinaciones de codones degenerados (con degeneración única, doble, triple y cuádruplo en relaciones iguales en cada posición) con el uso de aminoácido natural es posible calcular el codón más representativo. Los codones (AGT)(AGC)T, (AGT)(AGC)C y (AGT)(AGC)(CT) – es decir, DVT, DVC y DVY, respectivamente utilizando nomenclatura IUPAC- son aquellos más cercanos al perfil de aminoácido deseado codifican 22% de serina y 11% de tirosina, asparagina, glicina, alanina, aspartato, treonina y cisteína. Preferentemente, por lo tanto, las bibliotecas se construyen utilizando el codón DVT, DVC o DVY en cada una de las posiciones diversificadas.

Ensayo de Citotoxicidad L929

Los antagonistas de TNFR1 (por ejemplo, ligandos,

monómeros dAb) pueden identificarse por la habilidad para inhibir la citotoxicidad inducida por TNF en fibroblastos de ratón L929 (Evans, T (2000) Molecular Biotechnology 15, 243-248) En resumen, las células L929 laminadas en placas de microconcentración se incuban durante la noche con antagonista de TNFR1 100 pg/ml de TNF y 1 mg/ml de actinomicina D (Sigma, Poole, UK) Entonces la viabilidad celular se mide al leer la absorción a 490 nm siguiendo una incubación con 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4-sulfofenil)-2-H-tetrazolio (Promega, Madison, USA) Los antagonistas de TNFR1 inhibirán la citotoxicidad y por lo tanto producen un aumento en la absorción en comparación con TNF solamente control

Ensayo HeLa IL-8

Los antagonistas de TNFR1 (por ejemplo, monómeros dAb) pueden identificarse por la habilidad para inhibir la secreción inducida por TNF de IL-8 por células HeLa humanas (método adaptado de aquel de Akesson, L et al (1996) Journal de Biological Chemistry 271, 30517-30523, que describe la inducción de IL-8 por IL-1 en HUVEC, aquí observamos en inducción por alfa TNF humano y utilizamos células HeLa en lugar de estirpe de célula HUVEC) En resumen, las células HeLa pueden laminarse en placas de microconcentración se incubaron durante la noche con el antagonista de TNFR1 y 300 pg/ml de TNF Post-incubación, el sobrenadante se aspira de las células y la

concentración IL-8 se mide utilizando un ELISA intercalado (R&D Systems), u otro método adecuado. Los antagonistas de TNFR1 inhiben la secreción de IL-8, y menos IL-8 se detecta en el sobrenadante en comparación con el control de solamente TNF.

5

Ejemplos

Ejemplo 1. Extensión de la vida media de suero de factor de necrosis tumoral (TNF)

Los ratones transgénicos para TNF humano (Tg197) se administraron en grupos de 10 animales con dosis intraperitoneales semanales de dAbs anti-TNF que se habían reformateado como dímeros con un PEG ramificado 40k (denominado PEG TAR1-5-19) o como una fusión con un dAb de albumina de anti-suero (denominado trímero TAR1-5-19/MSA). La administración de salina se utilizó como un control. Después de 7 semanas de administración de fármaco, el suero de los animales se analizó para circular los niveles TNF utilizando un equipo ELISA intercalado anti-TNF. Los animales administrados con salina tuvieron un nivel de TNF circulante de 25.6 pg/ml mientras que los animales que reciben trímero TAR1-5-19/MSA tuvieron niveles elevados a 2315pg/ml. Esto demuestra claramente que los dAbs con una vida media de suero extendida puede aumentar los niveles circulantes de una molécula con una vida media de suero corto tal como una citoquina y por lo tanto aumentar los niveles de suero.

25

Ejemplo 2. Extensión de la vida media de suero del receptor 1 de factor de necrosis tumoral soluble (sTNFR1).

A los ratones CD1 se les administró una dosis intravenosa única 1 mg/kg de un dAb TNFR1 anti-ratón que se había reformateado (formatos de vida media extendidos) con ya sea un PEG ramificado 40k (denominado PEG anti-TNFR1 dAb) o como una fusión con un dAb de albumina de anti-suero (denominado dímero anti-TNFR1/anti-SA). El suero se evaluó en diferentes puntos de tiempo para niveles de TNFR1 soluble utilizando un ELISA intercalado anti-TNFR1 según se detalla abajo.

Medición de TNFR1

Las inmunoplaquetas de parte inferior plana de 96 cavidades Maxisorp F96 (Nunc, No de Catálogo 439454) se revistieron con anticuerpo sTNF R1/TNFRSF1A anti-ratón (50 µl por cavidad a 1 µg/ml en PBS). Las placas se incubaron por 1 hr a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS. La unión no específica se bloqueó con 3% de BSA/PBS por 1 hr a temperatura ambiente. Las placas se lavaron tres veces con 200 µl de PBS/0.05% de Tween-20.

Las diluciones de sTNF R1 de ratón recombinante (R&D Systems, # cat 4254-R1) se prepararon en PBS/1% de BSA a 5000 ng/ml¹, 500 ng/ml¹, 50 ng/ml¹ y 5 ng/ml¹ y 50 µl agregados a la cavidad. Alternativamente, el suero de ratones inmunizados con PEG ramificado TAR2m-21-23/40K se preparó a 1/5, 1/50, 1/500 y

1/5000 diluciones en PBS/1% de BSA y 50ul agregados a la cavidad Las placas se incubaron a 1 hora, temperatura ambiente Las placas se lavaron tres veces con 200 ul de PBS/0.05% de Tween-20

5 El anticuerpo sTNF R1 de anti-ratón biotinilado (R&D Systems, # cat AHFOI) se preparó en 1 ug/ml y 50ul agregados a la cavidad Las placas se incubaron por 1 hora, temperatura ambiente Las placas se lavaron tres veces con 200ul de PBS/0.05% de Tween-20

10 La anti-biotina de ratón monoclonal de fracción IgG conjugada por peroxidasa (Stratech, No Cat 200-032-096) se preparó a 160ng ml⁻¹ y 50 ul agregados a la cavidad Las placas se incubaron por 1 hora, temperatura ambiente Las placas se lavaron tres veces con 200ul de PBS/0.05% de Tween-20 después
15 tres veces con PBS

El sustrato de peroxidasa de microcavidad de componente TMB-1 SureBlue (KPL, No Cat 52-00-00) se agregó a todas las cavidades La placa se incubó a temperatura ambiente por 15 minutos y la reacción se detuvo con 1M de HCl La absorción se
20 leyó a 450 nM

Todas las muestras se ensayaron en duplicado Las cavidades sin muestra se incluyeron

Los resultados OD para las diluciones 1/5 de suero de los ratones dosificados con el dAb anti-TNFR1 PEG se diagramaron
25 contra el tiempo (Figura 1) Los resultados claramente muestran

los niveles crecientes de TNFR1 en el suero antes de caer de regreso a los niveles basicos siguiendo la autorización del dAb

Ejemplo 3

5 dAbs que unen las Moléculas de Receptor pero no Unen el Sitio de Unión.

Este ejemplo ilustra un método para identificar dAbs que unen una molécula receptora deseada pero no unen el sitio activo del receptor. El procedimiento se ilustra utilizando el receptor de factor de necrosis tumoral 1 (TNFR1), y es generalmente aplicable a las moléculas receptoras.

Las moléculas receptoras quiméricas hechas de diferentes dominios TNFR1 murino y dominios TNFR1 humano (Banner DW, *et al* Cell, 75(3) 431-45 (1993)) de tal forma que la molécula contiene los cuatro dominios extracelulares definidos de TNFR1 pero que estos varían en origen entre proteínas TNFR1 humana y de ratón, se produjeron. Los receptores quiméricos producidos compartieron propiedades tanto de TNFR1 humano como TNFR1 de ratón de acuerdo a los diferentes papeles de dominio y funcionalidad. Las moléculas proporcionaron un medio para la valoración de la especificidad de dominio de dAbs, anticuerpos y fragmentos de unión de antígeno del mismo y otras moléculas (por ejemplo, dominios de proteína tales como anticuerpos, dominios de receptor LDL, o dominios EGF) que unen TNFR1 humano o de ratón.

Métodos

Las secuencias TNFR1 de ratón y humanas se clonaron previamente en el vector de expresión *Pichia* pPicZalpha (Invitrogen) por medio de los sitios de endonucleasa de restricción EcoRI y NotI. El ADN de TNFR1 de ratón templado (y por consecuencia, las construcciones de receptor quimérico que terminan con un dominio 4 murino) contuvieron una etiqueta 3' 6x histidina. TNFR1 humano (y por consecuencia las construcciones de receptor quimérico que terminan con un dominio humano 4) contuvieron tanto etiquetas Myc como 6x Histidina en secuencia en el extremo 3'.

Los PCRs iniciales se realizaron de acuerdo a las condiciones de PCR estándares utilizando polimerasa de ADN RubyTaq (USB Corporation, Cleveland, Ohio). 100 ng de ADN templado (comprendiendo el templado minipreparado de ADN relevante ya sea de longitud completa mTNFR1 o ADN hTNFR1).

Las reacciones de PCR típicas se establecieron como sigue: 25 µl de 10X regulador PCR RubyTaq que contiene polimerasa, 2 µl de primer cebador (de 10 µM base), 2 µl de segundo cebador (de 10 µM base), 1 µl (100 ng) de ADN templado de longitud completa TNFR1, 20 µl de dH₂O (a un volumen final de 50 µl). Las reacciones se fijaron en tubos de pared delgada y se colocaron en un termociclador en donde la reacción se realizó de acuerdo a los siguientes parámetros.

25

Desnaturalización inicial	3 minutos	94°C
Desnaturalización	30 segundos	94°C
Anneamiento (25 ciclos)	30 segundos	85°C
Extensión	1 minuto	72°C
Extensión Final	10 minutos	72°C

Resumen de las reacciones PCR Iniciales utilizadas en la

5 generación de construcciones quiméricas

Construcción	Número PCR-cebadores utilizados	Templado
MHMH	PCR 1-1 y 12	Ratón
	PCR 2-2 y 3	Humano
HMHH	PCR 1-1 y 8	Humano
	PCR 2-6 y 13	Ratón
	PCR 3-2 y 4	Humano
	PCR 1-1 y 10	Humano
HHMH	PCR 2-7 y 14	Ratón
	PCR 3-2 y 3	Humano
	PCR 1-1 y 11	Humano
HHM	PCR 2-2 y 8	Ratón
	PCR 1-1 y 8	Humano
HMHM	PCR 2-2 y 8	Ratón

10

*Anotación H=dominio Humano, M=dominio de ratón, por ejemplo, MHMH=Dominio 1 de ratón, dominios humanos 2-4

Los productos PCR generaron estos PCRs iniciales, se cortaron de 1% de gel de agarosa y se purificaron utilizando un

15 equipo de purificación de gel (Qiagen) antes de la elución en 50 µl de dH₂O

Cebadores utilizados para la generación de construcción de TNFR1 Quimérico

20

Número de cebador	Secuencia de cebador
Cebador 1	GCCAGCATTGCTGCTAAAGAA (SEQ ID NO: 6)
Cebador 2	GGTCACAGCCGCTATTTCAG (SEQ ID NO: 6)
Cebador 3	CTGCAGGAACTGTGAGAGCGGC (SEQ ID NO: 7)
Cebador 4	GTGTGTGGCTGCAGGAAGAAC (SEQ ID NO: 6)
Cebador 5	CTGCCATGCAGGTTTCTTTC (SEQ ID NO: 8)
Cebador 6	CTGCAGGCAGTGTGAAAAGGG (SEQ ID NO: 10)
Cebador 7	GTGTGTGGCTGTAAAGGAGAAC (SEQ ID NO: 11)
Cebador 8	CTGCCATGCAGGTTTCTTTC (SEQ ID NO: 12)
Cebador 9	TCACACTCCCTGCAGTCCG (SEQ ID NO: 13)
Cebador 10	CAGCCACACAGGTTGTCCCG (SEQ ID NO: 14)
Cebador 11	CCTGCATGGCAGGTGCACACGG (SEQ ID NO: 15)
Cebador 12	TCACACTCCCTGCAGACTG (SEQ ID NO: 6)
Cebador 13	CAGCCACACAGGTTGTCTTG (SEQ ID NO: 7)
Cebador 14	CCTGCATGGCAGTTACACACGG (SEQ ID NO: 16)

25 PCR SOE

El ensamble de PCR (también conocido como "halar a través de" o División por Extensión de Recubrimiento SOE véase *Gene*, 15 77(1) 61-8 (1989)) permite a los productos de PCR primarios traerse junto con digestión o ligación, haciendo uso de los

5 extremos complementarios de productos de PCR primarios Durante este proceso los productos primarios se traen junto y se desnaturalizan antes de que se sus extremos complementarios se permitan amasar juntos en la presencia de polimerasa de ADN Taq y dNTPs Los diversos ciclos de amasamiento y extensión dan

10 como resultado un relleno en los filamentos complementarios y la producción de un templado de longitud completa Los cebadores que flanquean ahora el casete de construcción de longitud completa se agregan y un PCR convencional se ejecutó para amplificar el producto instalado Los PCRs de SOE se realizaron a

15 fin de aminorar juntos y amplificar los diversos dominios de TNFR1 derivados de los PCRs iniciales anteriormente descritos Los PCRs de SOE instalados se fijaron como sigue 40 μ l 10x regulador PCR conteniendo $MgCl_2$, ~ 2 μ l (100 ng) de producto limpio de PCR 1 inicial, ~ 2 μ l (100 ng) de producto limpio de PCR

20 2, 36 μ l de dH_2O (a volumen final de 80 μ l) La mezcla de cebador SOE se agregó después de la etapa de instalación como sigue 2 μ l de cebador de flanqueo 5' (Cebador 1), 2 μ l de cebador de flanqueo 3' (Cebador 2), 10 μ l 10x regulador PCR, 6 μ l de dH_2O (a volumen final 20 μ l)

25 Las reacciones PCR se realizaron utilizando el programa

anteriormente descrito Los ciclos de instalación iniciales requirieron aproximadamente 45 minutos de los cuales el termociclador se fijo a pausa a 94°C 20 µl de mezcla de cebador se agregó a cada reacción y se mezcló

5 **Condiciones de Instalación**

Desnaturalización inicial	5 minutos	94°C
Desnaturalización	1 minuto	94°C
Anneamiento (15 ciclos)	1 minuto	85°C
Extensión	1 minuto	72°C

Condiciones de amplificación (Pausa a 94°C, mezcla de cebadores agregada después)

10

Desnaturalización	1 minuto	94°C
Anneamiento (15 ciclos)	1 minuto	85°C
Extensión	1 minuto	72°C

Los productos PCR se revisaron al ejecutar 3-5 µl de cada reacción en un 1% de gel de agarosa

15

Clonación de quimeras TNFR1 instaladas en el vector de expresión *Pichia*

El vector pPicZalpha (Invitrogen) se ingirió secuencialmente con enzimas EcoRI y NotI antes de la purificación de columna de filtración de gel Chromaspin TE-1000 (Clontech, Mountain View, CA)

20

Transformación de construcciones quiméricas de TNFR1 en *E coli*

Las construcciones quiméricas ligadas se transformaron en células *E coli* electrocompetentes HB2151 y se recuperaron por

25

una hora en medio LB bajo para laminarse en ágar LB bajo en sal con 0.25 µg/ml de ZEOCIN, formulación de antibiótico que contiene Pleomicina D (Cayla, Toulouse, Francia) por 24 hrs a 37°C Las colonias individuales se verificaron así por secuencia para asegurar la secuencia correcta de la construcción quimérica dentro del vector de expresión y las preparaciones de plásmido Maxiprep a gran escala hechas de cada vector de construcción quimérica

Las secuencias de nucleótido de construcciones quiméricas preparadas se presentan abajo Las construcciones quiméricas se nombraron de acuerdo al origen de sus dominios (ejecutándose de Dominio 1 en la izquierda a Dominio 4 en el derecho) Por ejemplo, HMMM contiene Dominio 1 humano y Dominios 2-4 de ratón Las proteínas quiméricas que contienen dominio 4 de ratón tienen solamente etiquetas Hag y carecen de la región separadora entre la región de transmembrana y Dominio 4

HMMM

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTGCTGTACCAAGT
GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
GGAGTGTGAAAAGGGCACCTTTACGGCTTCCAGAAATTACCTCAGGCAGTGCCTCAGTTGC
AAGACATGTCGGAAGAAATGTCCAGGTGGAGATCTCTCCTTGCCAAGCTGACAAGGACA
CGGTGTGTGGCTGTAAGGAGAACCAGTTCCAACGCTACCTGAGTGAGACACTTCCAGTG
CGTGGACTGCAGCCCCTGCTTCAACGGCACCGTGACAATCCCCTGTAAGGAGACTCAGAAC
ACCGTGTGTAAGTGCATGCAGGGTTCTTTCTGAGAGAAAGTGAGTGCGTCCCTTGAGCC
ACTGCAAGAAAATGAGGAGTGTATGAAGTTGTGCCTAAGCGCTCATCATCATCATCA
TTAATGA (SEQ ID NO 19)

HHHM

AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTGCTGTACCAAGT
GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTCAGCTGC
TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGACAGTGGACCGGGACA
CCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTG
CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGGTTCTTTCTGAGAGAAAGTGAGTGCGTCCCTTGAGCC
ACTGCAAGAAAATGAGGAGTGTATGAAGTTGTGCCTAAGCGCTCATCATCATCATCA
TTAATGA (SEQ ID NO 20)

5 HHMH
 AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGT
 GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
 GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTCAGCTGC
 TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTTGACAGTGGACCGGGACA
 CCGTGTGTGGCTGTAAGGAGAACCAGTTCCAACGCTACCTGAGTGAGACACACTTCCAGTG
 CGTGGACTGCAGCCCCCTGCTTCAACGGCACCGTGACAATCCCCTGTAAGGAGACTCAGAAC
 ACCGTGTGTAAGTGCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTAAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (SEQ ID NO 21)

10 HHMH
 AGTGTGTGTCCCCAAGGAAAATATATCCACCCTCAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGT
 GCCACAAAGGAACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAG
 GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTCAGCTGC
 AAGACATGTCGAAAGAAATGTCCAGGTGGAGATCTCTCCTTGCCAAAGCTGACAAGGACA
 CCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTG
 CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
 ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTAAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (SEQ ID NO 22)

15 HHMH
 AGCTTGTGTCCCCAAGGAAAGTATGTCCATTCTAAGAACAATTCCATCTGCTGCACCAAGT
 GCCACAAAGGAACCTACTTGGTGAGTGACTGTCCGAGCCCAGGGCGGGATACAGTCTGCAG
 GGAGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACTCAGACACTGCCTCAGCTGC
 TCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTGAGGTGGAGATCTCTTCTTGACAGTGGACCGGGACA
 CCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGGAGTGAAAACCTTTTCCAGTG
 CTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTGACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAAC
 ACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTCTTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTA
 ACTGTAAGAAAAGCCTGGAGTGCACGAAGTTGTGCCTACCCAGATTGAGAATGTAAAGGG
 CACTGAGGACTCAGGCACCACAGCGGCCGCCAGCTTTCTAGAACAAAACTCATCTCAGAA
 GAGGATCTGAATAGCGCCGTCGACCATCATCATCATCATCATTGA (SEQ ID NO 23)

15

Preparación de construcción quimérica TNFR1 y transformación en *Pichia pastoris*

El ADN plásmido generado por cada maxiprep se ingirió con la endonucleasa de restricción de corte infrecuente PmeI a fin de
 20 linearizar el ADN antes de la transformación *pichia* El ADN
 linearizado se limpió subsecuentemente por la extracción de
 fenol/cloroformo y precipitación de etanol, antes de la
 resuspensión en 30 µl de dH₂O 10 µl de la solución de ADN
 linearizada se mezcló con 80 µl de células *Pichia* KM71H electro-
 25 competentes por 5 minutos antes de la electroporación a 1 5kV

200 ω , 25 μ F Las células se recuperaron inmediatamente con YPDS y se incubaron por 2 horas a 30°C antes del laminado en placas ágar YPDS conteniendo 100 μ g/ml de ZEOCIN, formulación antibiótica que contiene Flomycin D (Cayla, Toulouse, Francia),
5 por 2 días

Expresión de construcciones en *Pichia*

Una colonia de transformante individual para cada construcción se colectó en 5 ml de BMGY como un cultivo iniciador
10 y creció por 24 hrs a 30°C Este cultivo se utilizó para inocular 500 ml de medio BMGY que creció por 24 hrs a 30°C antes de que las células se colectaran por centrifugación a 1500-3000 g por 5 minutos a temp ambiente Las células se volvieron a suspender en 100 ml de BMMY y crecieron por 4 días con aumentos
15 graduados en concentración de metanol (0.5% día 1, 1% día 2, 1.5% día 3 y 2% día 4) Después el sobrenadante de expresión se recubrió después de la centrifugación de los cultivos de 3300 g por 15 minutos

20 **Purificación de construcciones quiméricas TNFR1 utilizando resina Níquel**

Los sobrenadantes de cultivo se regularon inicialmente a través de la adición de 10 mM de concentración final de imidazol y 2x PBS La proteína con etiqueta His se absorbió por grupo por 4
25 horas (agitación) a temperatura ambiente a través de la adición de

251

resina Niquel-NTA La mezcla de sobrenadante/resina se fluyó así en una columna poli-prep (Biorad) La resina se lavó así con 10 volúmenes de columna de 2xPBS antes de la elución utilizando 250 mM de imidazol 1x PBS Después del intercambio de regulador la expresión de construcción quimérica se deglicosiló utilizando la deglicosilasa EndoH antes de la verificación por SDS-PAGE

Secuencias de ADN templado utilizadas durante PCR

10 TNFR1 Humano (*Homo sapiens*) (región extracelular acceso Genbank 33991418)

CTGGTCCCTCACCTAGGGGACAGGGAGAAGAGAGATAGTGTGTGTCCCAAGG
AAAATATATCCACCCTCAAAATAATTGATTTGCTGTACCAAGTGCCACAAAGG
AACCTACTTGTACAATGACTGTCCAGGCCCGGGGCAGGATACGGACTGCAGGG
AGTGTGAGAGCGGCTCCTTCACCGCTTCAGAAAACCACCTCAGACACTGCCTCA
GCTGCTCCAAATGCCGAAAGGAAATGGGTCAGGTGGAGATCTCTTCTTGCACAG
TGGACCGGGACACCGTGTGTGGCTGCAGGAAGAACCAGTACCGGCATTATTGG
AGTGAAAACCTTTTCCAGTGCTTCAATTGCAGCCTCTGCCTCAATGGGACCGTG
CACCTCTCCTGCCAGGAGAAACAGAACACCGTGTGCACCTGCCATGCAGGTTTC
15 TTTCTAAGAGAAAACGAGTGTGTCTCCTGTAGTAACTGTAAGAAAAGCCTGGAG
TGCACGAAGTTGTGCCTACCCCAGATTGAGAATGTTAAGGGCACTGAGGACTCA
GGCACCACA (SEQ ID NO 1)

La región extracelular codificada de TNFR1 humano tiene la siguiente secuencia de aminoácido

LVPHLGDREKRDSVCPQGKYIHPQNNSICCTKCHKGTYLYNDCPGPGQDTCRECE
SGSFTASENHLRHCLSCSKCRKEMGQVEISSCTVDRTVCGCRKNQYRHYWSENLF
QCFNCSLCLNGTVHLSCQEKQNTVCTCHAGFFLRENECVSCSNCKKSLECTK1CLP
20 QIENVKGTEDSGTT (SEQ ID NO 2)

Murino (*Mus musculus*) TNFR1 (región extracelular acceso Genbank 31560798)

251

5 CTAGTCCCTTCTCTTGGTGACCGGGAGAAGAGGGATAGCTTGTGTCCCAAGGA
AAGTATGTCCATTCTAAGAACAATTCCATCTGCTGCACCAAGTGCCACAAAGGA
ACCTACTTGGTGAGTGACTGTCCGAGCCCAGGGCGGGATACAGTCTGCAGGGA
GTGTGAAAAGGGCACCTTTACGGCTTCCCAGAATTACCTCAGGCAGTGTCTCAG
TTGCAAGACATGTCGGAAGAAATGTCCCAGGTGGAGATCTCTCCTTGCCAAGC
TGACAAGGACACGGTGTGTGGCTGTAAGGAGAACCAGTTCCAACGCTACCTGA
GTGAGACACACTTCCAGTGCGTGGACTGCAGCCCCTGCTTCAACGGCACCGTGA
CAATCCCCTGTAAGGAGACTCAGAACACCGTGTGTAACTGCCATGCAGGGTTCT
TTCTGAGAGAAAGTGAGTGCGTCCCTTGCAAGCACTGCAAGAAAAATGAGGAG
TGTATGAAGTTGTGCCTACCTCCTCCGCTTGCAAATGTCACAAACCCCCAGGAC
TCAGGTACTGCG (SEQ ID NO 3)

La región extracelular codificada de murino (*Mus musculus*)

TNFR1 tiene la siguiente secuencia de aminoácido

10 LVP5LGDREKRDSLCPQGKYVHSKNNSICCTKCHKGTYLV8DCPSPGRDTVCRJECE
KGFTASQNYLRQCLSKTCRKEMSQVEISPCQADKDTVCGCKENQFQRYLSETHF
QCVDCSPCFNGTVTIPCKETQNTVCNCHAGFFLRESECVPCSHCKKNEECMK1CLP
PPLANVTNPQDSGTA (SEQ ID NO 4)

Especificidad de Dominio de dAbs anti-TNFR1

La especificidad de dominio de dAbs anti-TNFR1 se determinó utilizando la resonancia de plasmón de superficie (SPR)

15 ('Detection de immuno-complex formation via resonancia de plasmón de superficie on gold-coated diffraction gratings ' Biosensors 1987- 88,3(4) 211-25) para determinar la habilidad de anticuerpos para unir TNFR1 biotinilado de ratón o completamente humano que se inmovilizó en una superficie de

20 chip SPR, despues de que los anticuerpos se habían incubado y equilibrado con un exceso de los receptores quiméricos anteriormente descritos En este ensayo, el flujo de un dAb anti-TNFR1 sobre la superficie TNFR1 genera una señal SPR indicadora de la cantidad de dAb que une el TNFR1 inmovilizado

25 sobre el chip SPR Si el dAb se pre-incuba y equilibra con una

molécula quimérica que comprende el (los) dominio (s) de TNFR1 que el dAb particular une, entonces el flujo de esta mezcla sobre la superficie de TNFR1 producirá una señal SPR más pequeña en relación al dAb solo Sin embargo, si el dAb se pre-incuba y se equilibra con una molécula quimérica que no comprende el (los) dominio (s) de TNFR1 que el dAb particular une, entonces el flujo de esta mezcla sobre la superficie de TNFR1 producirá una señal SPR que es aproximadamente la misma que la señal obtenida durante el dAb solo

10

Método

Generación de una superficie TNFR1 de chip SPR

La elección de superficie de TNFR1 se determina por la especificidad de especie del dAb anti-TNFR1 a probar Por lo tanto, los dAbs de TNFR1 anti-humano se evaluaron utilizando una superficie revestida TNFR1 humano y los dAbs TNFR1 de anti-ratón se evaluaron utilizando un chip revestido con TNFR1 de ratón

El TNFR1 biotinilado se diluyó en el regulador SPR adecuado y se ejecuta a través de un chip sensor de estreptavidina (SA) en un instrumento SPR BIACORE 3000 (Biacore International AB Uppsala, Suiza) Una velocidad de bajo flujo (5-10 µl/minuto) se utilizó a fin de maximizar el tiempo de contacto entre el TNFR1 biotinilado y la superficie de estreptavidina El flujo continuo hasta que la superficie de estreptavidina se saturó con material

25

biotinilado, a fin de generar un chip con superficie de TNFR1 máximo. El chip típicamente unió varias cientos a varios miles de unidades de respuesta de SPR del material biotinilado.

5 Concentración de una respuesta anti-TNFR1 en el chip SPR

Un experimento de competencia exitosa requiere la optimización inicial de la concentración de dAb anti-TNFR1 de tal forma que la cantidad mínima de dAb se fluye sobre la superficie que da una señal de SPR importante. Dentro de un cierto rango de concentración, el dAb unirá la superficie en una manera dependiente de dosis de tal forma que el número de RUs de dAb unido reflejan la concentración de dAb fluido a través de la superficie de chip.

A fin de lograr el rango de concentración de esta dependencia de dosis, los dAbs anti-TNFR1 se concentraron en una serie de dilución de 10 veces de regulador Biacore variando de 1 en 10 dilución a 1 en 1,000,000 de dilución. Las diluciones se inyectaron así individualmente y secuencialmente a través de la superficie de chip de TNFR1, comenzando con la muestra más diluida. El número máximo de RUs logrado en cada dilución se midieron. Después de cada inyección la superficie de TNFR1 se regeneró para remover el dAb anti-TNFR1 unido en donde era necesario utilizando un regulador de regeneración de SPR adecuado. Utilizando este método la concentración máxima de dAb anti-TNFR1 requerido para generar una señal que representa

aproximadamente 100RU se determinó

Pre-equilibrio de dAbs/quiméricos anti-TNFR1

Una vez que la concentración de dAb anti-TNFR1 óptimo se determinó, las mezclas de TNFR1 de dAb/quimérico anti-TNFR1 se fijaron. Las mezclas se fijaron de tal forma que la concentración final de dAb anti-TNFR1 fue idéntica a la concentración óptima determinada previamente. Las reacciones se fijaron típicamente en 100 μ l volúmenes que contienen 50 microlitros de un concentrado 2 x de dAb anti-TNFR1, 40 microlitros de regulador biacor y 10 microlitros de proteína quimérica purificada neta. Las concentraciones típicas para la mezcla final fueron aproximadamente 10-100 μ M de proteína quimérica y aproximadamente 10-100 nM de dAb anti-TNFR1. Las mezclas de dejaron equilibrar por 30 minutos a temperatura ambiente.

15

Experimento Biacore de Competencia

Después del equilibrio, cada mezcla de TNFR1 dAb anti-TNFR1/quimérico se ejecutó secuencialmente sobre la superficie SPR de TNFR1 y el número de unidades de respuesta se midió. Después de que cada mezcla se inyectó, la superficie se regeneró para remover el dAb anti-TNFR1 unido antes de que se inyectara la siguiente mezcla. Las diferentes respuestas generadas utilizando los diferentes quiméricos permitieron la determinación de los dominios TNFR1 unidos por dAbs particular.

25 Estos estudios revelaron que TAR2m-21-23 une el Dominio 1

de TNFR1 de ratón, y que TAR2h-205 une el Dominio 1 de TNFR1 humano

TAR2m-21-23

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFN RYSMG WLRQAPGKGLEWVS—RID
SYGRGTYIEDPVKG RFSISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK ISQFG
SNAFDY WGQGTQVTVSS (SEQ ID NO 24)

5

TAR2h-205

EVQLLES GGGGLVQP GGS LRLSCAASGFTFV—KYSMG—WVRQAPGKGLEWVS—QIS
NTGGHTYYADSVKG—RFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAK YTGRW
EPFDY WGQGT LVTVSS (SEQ ID NO 25)

En las secuencias de aminoácido de TAR2M-21-23 y TAR2h-205 CDR1 se flanquea por ~, CDR2 se flanquea por ~~, y CDR3 se
10 flanquea por ~ — Las secuencias de aminoácidos presentadas son continuas sin aberturas

Ejemplo 4. Métodos de Selección

Las proteínas de receptor quimérico tales como proteínas
15 TNFR1 quimérico descritas en la presente pueden utilizarse en ensayos o selecciones para aislar agentes (por ejemplo, anticuerpos, dAbs) que se unen a dominios particulares dentro de un receptor deseado Utilizando TNFR1 como un modelo para una proteína de receptor deseado, estos métodos describen la adición
20 de proteínas quiméricas a preparaciones de anticuerpo crudos antes de su selección para la unión de receptor ya sea por ELISA o resonancia de plasmón de superficie Adicionalmente, describen el uso de proteínas quiméricas revestidas sobre una superficie (por ejemplo, placa ELISA o chip SPR) y la selección de
25 anticuerpos a través de prueba de su unión a proteínas quiméricas

en esta superficie Los métodos similares pueden utilizarse para identificar los agentes (por ejemplo, anticuerpos, dAbs) que se unen a dominios deseados (por ejemplo, fuera del sitio activo) de otros receptores

5

Selección de ELISA Soluble

Este método puede utilizarse para aislar rápidamente los anticuerpos o fragmentos de anticuerpo (por ejemplo, dAbs) que unen dominios específicos de TNFR1 de un gran repertorio de anticuerpos o fragmentos de anticuerpo de especificidad desconocida

Una placa de ensayo de 96 cavidades se revestirá durante la noche a 4°C con 100 µl por cavidad de TNFR1 quimérico Las cavidades se lavaron 3 veces con 0.1% de TPBS (salina regulada por fosfato conteniendo Tween-20 a una concentración de 0.1%) 200 µl por cavidad de 1% de TPBS se agregará para bloquear la placa, y la placa se incubó 1-2 horas a temperatura ambiente Las cavidades se lavarán así 3 veces con PBS antes de la adición de 50 µl de sobrenadante bacteriano o periprep, conteniendo el anticuerpo soluble o fragmento de anticuerpo (que contienen la etiqueta de epítipo c-Myc), en 50 µl de 0.2% de TPBS La placa se incubará así por 1 hora a temperatura ambiente Después de que esta placa se lavará 5 veces con 0.1% de TPBS (0.1% de Tween-20 en PBS) 100 µl de un monoclonal de ratón anti-c-Myc primario se agregará así en 0.1% de TPBS a cada cavidad y la

placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de anticuerpo primaria se descartará y la placa se lavará así 5 veces con 0.1% de TPBS. 100 µl de conjugado HRP de IgG de anti-ratón prediluido (específico Fc) de cabra se agregará así
5 (Sigma No. De Cat. A0168) y la placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se descartará así y la placa se lavará 6 veces con 0.1% de TPBS seguido por 2 lavados con PBS. 50 µl de solución de peroxidasa de TMB se agregará así a cada cavidad y la placa se dejará así a temperatura
10 ambiente por 2-60 minutos. La reacción se detectará por la adición de 50 µl de 1M de ácido hidroclicórico. La OD a 450 nm de la placa se leerá en un lector de placas de 96 cavidades dentro de 30 minutos de adición ácida. Aquellos anticuerpos presentes en sobrenadante bacteriano crudo o peripreps que unen los dominios
15 de TNFR1 presentes dentro de la proteína quimérica darán una señal ELISA más fuerte que aquellas que no.

Ensayo ELISA Competitiva

Este método puede utilizarse para seleccionar rápidamente
20 un grupo diverso de anticuerpo crudo o preparaciones de fragmento de anticuerpo que unen TNFR1 a fin de determinar su especificidad de unión de dominio.

Una placa de ensayo de 96 cavidades se revestirá durante la noche a 4°C con 100 µl por cavidad de TNFR1 humano o murino
25 (ya sea humano o de ratón). Las cavidades se lavarán 3 veces

con 0.1% de TPBS (salina regulada por fosfato que contiene Tween 20 a una concentración de 0.1%) 200 µl por cavidad de 1% de TPBS (1% de Tween-20 en PBS) se agregará para bloquear la placa, y la placa se incubó por 1-2 horas a temperatura ambiente. Las cavidades se lavaran así 3 veces con PBS. Al mismo tiempo los sobrenadantes bacterianos o peripreps se pre-equilibrarán con una concentración pre-optimizada de proteína TNFR1 quimérica en solución. 50 µl de esta preparación bacteriana cruda/mezcla de proteína quimérica, conteniendo el anticuerpo soluble o fragmento de anticuerpo se agregará así a la placa ELISA. La placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. Después, la placa se lavará 5 veces con 0.1% de TPBS (0.1% de Tween-20 en PBS), y 100 µl de un anticuerpo de detección primaria (o Proteína A-HRP o Proteína L HRP) se agregará en 0.1% de TPBS, a cada cavidad y la placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de anticuerpo primaria se descartará y la placa se lavará 5 veces con 0.1% de TPBS. Si se requiere 100 µl de un conjugado HRP/anticuerpo secundario prediluido de cabra se agregará así, y la placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. El anticuerpo secundario se descartará así y la placa se lavará 6 veces con 0.1% de TPBS seguido por 2 lavados con PBS. 50 µl de solución de peroxidasa TMB se agregará a cada cavidad y la placa se dejara a temperatura ambiente por 2-60 minutos. La reacción se detendrá por la adición de 50 µl de 1M de ácido clorhídrico. La

OD a 450 nm de la placa se leerá en un lector de placas de 96 cavidades dentro de 30 minutos de adición ácida. Una reducción en señal ELISA será indicadora de la unión de anticuerpo de los dominios de TNFR1 quimérico en lugar de TNFR1 completo
5 revestidos en la placa, y por lo tanto, que el anticuerpo una de los dominios dentro de la proteína quimérica

**Ensayo De ELISA Competitiva Para Anticuerpos Y Fragmentos De Anticuerpo Que Compiten Con Un Anticuerpo De Referencia O
10 Fragmento De Anticuerpo Para Unión A TNFR1**

Este método puede utilizarse para seleccionar rápidamente diversos grupos de anticuerpo crudo o preparaciones de fragmento de anticuerpo que unen TNFR1 para aquellos anticuerpos o fragmentos de anticuerpo que compiten con un anticuerpo de
15 referencia o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, TAR2m-21-23) para unirse a TNFR1 o unir un dominio deseado de TNFR1 (por ejemplo, dominio 1). El método utiliza un anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo y anticuerpo de prueba o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, una población de anticuerpos a
20 seleccionar) que contienen diferentes etiquetas detectables (etiquetas epítomos)

Una placa de ensayo de 96 cavidades se revestirá durante la noche a 4°C con 100 µl por cavidad de TNFR1 humano o murino. Las cavidades se lavarán 3 veces con 0.1% de TPBS (salina
25 regulada por fosfato que contiene Tween 20 a una concentración

de 0.1%) 200 µl por cavidad de 1% de TPBS (1% de Tween-20 en PBS) se agregará para bloquear la placa, y la placa se incubó por 1-2 horas a temperatura ambiente. Las cavidades se lavarán así 3 veces con PBS. Al mismo tiempo las preparaciones de anticuerpo crudo a probar se mezclarán con una concentración pre-optimizada de anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo (por ejemplo, anticuerpo de unión de dominio 1, TAR2m-21-23) en solución. Según ya se establece es importante que este anticuerpo no incluya las mismas etiquetas de detección como presentes en los anticuerpos se seleccionan para la especificidad de unión de dominio. 50 µl de esta preparación bacteriana cruda/mezcla de proteína quimérica, se agregará así a la placa ELISA. La placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. Después, la placa se lavará 5 veces con 0.1% de TPBS, 100 µl de un anticuerpo de detección primaria (que une la etiqueta presente solamente en la población de anticuerpo que se selecciona) se agregará en 0.1% de TPBS a cada cavidad y la placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. Esta solución de anticuerpo primaria se descartará y la placa se lavará 5 veces con 0.1% de TPBS. 100 µl de un conjugado HRP/anticuerpo secundario que reconoce el anticuerpo de detección primaria se agregará así, y la placa se incubará por 1 hora a temperatura ambiente. La solución de anticuerpo secundario se descartará así y la placa se lavará 6 veces con 0.1% de TPBS seguido por 2 lavados con PBS. 50 µl de solución de peroxidasa TMB se agregará a cada cavidad y la placa

se dejara a temperatura ambiente por 2-60 minutos La reacción se detendrá por la adición de 50 μ l de 1M de ácido clorhídrico La OD a 450 nm de la placa se leerá en un lector de placas de 96 cavidades dentro de 30 minutos de adición ácida Un ELISA
5 preparado y separado utilizando este método pero sin la adición del anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo deberá hacerse en paralelo Una reducción en señal de ELISA en la presencia de anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo, en comparación a la señal ELISA para la misma preparación de
10 anticuerpo sin competir el anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo, será indicadora de que el anticuerpo particular o fragmento de anticuerpo compete con el anticuerpo de referencia o fragmento de anticuerpo para unirse a TNFR1 y une el mismo dominio de TNFR1 como el anticuerpo de referencia o fragmento
15 de anticuerpo

Selección SPR

Los métodos ELISA anteriormente descritos pueden adaptarse fácilmente a un formato que utiliza la resonancia de
20 plasmón de superficie, por ejemplo, utilizando un instrumento SPR BIACORE 3000 (Biacore International AB, Uppsala, Suiza) Generalmente, la proteína quimérica se equilibrará con sobrenadante bacteriano crudo contenido anticuerpos anti-TNFR1 o fragmentos de anticuerpo, y la mezcla resultante fluyó sobre un
25 chip SPR revestido con TNFR1 humano de longitud completa o

TNFR1 murino

Ejemplo 5 PEGilación de dAbs

Los efectos de PEGilación de dAbs en la habilidad de los
 5 dAbs para unir TNFR1 en un ensayo de unión de receptor libre de
 célula y para inhibir la función de TNFR1 en la superficie de
 células en un ensayo basado en célula se estudió

Ensayo de célula

10 Ensayo de liberación IL-8 MRC-5

Las actividades de ciertos dAbs que unen TNFR1 humano se
 valoraron en el siguiente ensayo de célula MRC-5 El ensayo se
 basa en la inducción de secreción IL-8 por TNF en células MRC-5
 y se adapta del método descrito en Alceson, L *et al Journal of*
 15 *Biological Chemistry* 277 30517-30523 (1996), que describe la
 inducción de IL-8 por IL-1 en HUVEC La actividad de los dAbs se
 ensayó al valorar la inducción de IL-8 por TNFa humano utilizando
 células MRC-5 en lugar de la estirpe de célula HUVEC En
 resumen, las células MRC-5 se laminaron en placas de
 20 microconcentración y las placas se incubaron durante la noche con
 dAb y TNFa humano (300 pg/ml) Siguiendo la incubación, el
 sobrenadante de cultivo se aspiró y la concentración de IL-8 en el
 sobrenadante se midió por medio de un ELISA Intercalado (R&D
 Systems) La actividad de dAb anti-TNFR1 dio como resultado una
 25 reducción en la secreción de IL-8 en el sobrenadante en

comparación con las cavidades de control que se incubaron con TNFa solo

Ensayo de Unión de Receptor

- 5 Los dAbs de anti-TNF se probaron para la habilidad para unir la unión de TNF a receptor de TNF recombinante 1 (p55) En resumen, las placas de Maxisorp se incubaron durante la noche con 30 mg/ml de anticuerpo monoclonal de ratón Fc anti-humano (Zymed, San Francisco, USA) Las cavidades se lavaron con
- 10 salina regulada por fosfato (PBS) conteniendo 0.05% de Tween-20 y después se bloquearon con 1% de BSA en PBS antes de incubarse con 100 ng/ml de receptor TNF 1 proteína de fusión Fc (R&D Systems, Minneapolis, USA) El dAb anti-TNF se mezcló con
- 15 TNF que se agregó a las cavidades lavadas a una concentración final de 10 ng/ml La unión de TNF se detectó con 0.2 mg/ml de anticuerpo anti-TNF biotinilado ((HyCult biotechnology, Uben, Países Bajos) seguido por 1 en 500 de dilución de estreptavidina marcada con peroxidasa de rábano picante (Amersham Biosciences, UK) y después la incubación con sustrato TMB (KPL,
- 20 Gaithersburg, USA) La reacción se detuvo por la adición de HCl y la absorción se leyó a 450 nm La actividad de dAb anti-TNF condujo a una reducción en unión de TNF y por lo tanto una reducción en absorción en comparación con el control unico de TNF
- 25 Los efectos comparativos de dAbs PEGilación en TNFR1 de

superficie de célula se ilustran en los datos presentados en la
Tabla 5

Tabla 5

5

Formato dAb	RBA IC50 (nM)	Ensayo de célula ND50 (nM)
dAb anti TNFR (no PEG)	3	30
5 K PEG	3	200
20 K PEG	8	800
2x10 K PEG	10	1000
30 K PEG	10	800
2x20 K PEG	10	1000

El ensayo de unión de receptor (RBA), que utiliza una forma recombinante de receptor, conteniendo solamente la parte
10 extracelular del receptor en un formato de ensayo basado en no célula, se muestra en la izquierda, y en donde los efectos de PEGilación son mínimos y en el caso de 5K PEG, no se observó diferencia en la unión

En contraste, según se observa en los datos obtenidos en el
15 ensayo de célula, PEGilación de dAbs sustancialmente redujo la efectividad de los dAbs en el ensayo En algunos casos la efectividad con reducción hasta a un factor de 33 veces Los datos colectados en el ensayo de cultivo basado en célula en donde se basó en la habilidad de los dAbs para bloquear la
20 actividad de receptor a la superficie celular

Los resultados del estudio muestran que la PEGilación de dAs tuvieron un efecto mucho más grande en la habilidad de los dAbs para inhibir la función de TNFR1 sobre la superficie celular que en la habilidad para unir TNFR1 en un ensayo libre de célula

25

Ejemplo 6 dAbs Que Unen Las Moléculas Combatientes Endógenas Pero No Unen El Sitio De Unión

Este ejemplo ilustra un método para identificar los dAbs que unen una molécula combatiente endógena deseada pero no unen el sitio activo del combatiente endógeno. El procedimiento se ilustra utilizando eritropoyetina (epo), y es generalmente aplicables los combatientes endógenos.

Los anticuerpos de dominio que unen EPO pueden identificarse y aislarse utilizando cualquier método de selección adecuado. Una estirpe de célula que expresa el receptor EPO recombinante y que es dependiente de los factores hemoatopoyéticos para crecimiento puede utilizarse en un ensayo para identificar los dAbs que unen EPO pero no se unen en el sitio activo, y por lo tanto no previenen la unión de EPO al receptor de EPO. Por ejemplo, las células Ba/F3, que es una estirpe de célula dependiente de IL-3 murino que se ha transfectado con receptor de EPO humano y supera el crecimiento epo-dependiente, puede utilizarse (D'Andrea *et al* , Blood 82 46-52 (1993)). Las células Ba/F3 pueden cultivarse en un plato de cultivo adecuado, tal como PBS. Las células pueden cultivarse así por aproximadamente 48 horas en medio de cultivo que contiene EPO. Los anticuerpos de dominio a ensayar pueden agregarse a cultivos individuales (por ejemplo, cavidades individuales de una placa de ensayo de cultivo celular adecuado). Después de aproximadamente 48 horas, la proliferación celular puede ensayarse utilizando cualquier método

adecuado, tal como el ensayo de reducción de bromuro de difenil-tetrazolio dimetiltiazol (MTT) Una falta de inhibición de proliferación de célula es de cavidades que contienen un dAb en relación a las cavidades de control que contienen medio de cultivo
5 pero ningun dAb indicará que el dAb no une el sitio activo de epo

Todas las publicaciones mencionadas en la presente especificación, y las referencias citadas en dichas publicaciones, se incorporan en la presente para referencia Varias modificaciones y variaciones de los métodos y sistema de la
10 invención descritos serán aparentes para aquellos expertos en la materia sin alejarse del alcance y espíritu de la invención A pesar de que la invención se ha descrito en relación con las modalidades preferidas específicas, deberá entenderse que la invención segun se reivindica no deberá limitarse indebidamente a
15 tales modalidades específicas A su vez, varias modificaciones de los modos para llevar a cabo la invención, descritos, los cuales son obvios para aquellos expertos en la biología molecular o campos relacionados se pretende que se encuentren dentro del alcance de las siguientes reivindicaciones

20

REIVINDICACIONES

1 Uso de un ligando comprendiendo una porción que
tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para
la fabricación de un medicamento para incrementar la cantidad de
5 dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto, en donde dicho
ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y no inhibe
substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo
endógeno

2 Uso de un ligando comprendiendo una porción que
10 tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para
la fabricación de un medicamento para incrementar la
biodisponibilidad dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto,
en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y
no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto
15 objetivo endógeno

3 Uso de un ligando comprendiendo una porción que
tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para
la fabricación de un medicamento para incrementar la vida media
in vivo de dicho compuesto objetivo endógeno, en donde dicho
20 ligando une dicho compuesto objetivo endógeno, y no inhibe
substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo
endógeno

4 Uso de un ligando comprendiendo una porción que
tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para
25 la fabricación de un medicamento para administración local que

incrementa la cantidad de dicho compuesto objetivo endógeno en el sitio de administración, en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno, y no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

5 5 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 4 en donde la cantidad de ligando objetivo endógeno en dicho sujeto aproximadamente 4 horas después de la administración de dicho medicamento se incrementa por al menos 1.5 veces, en relación a la cantidad antes de la administración de dicho medicamento

10 6 El uso de la reivindicación 5 en donde la cantidad de ligando objetivo endógeno en dicho sujeto aproximadamente 4 horas después de la administración de dicho medicamento se incrementa por al menos 10 veces, en relación a la cantidad antes de la administración de dicho medicamento

15 7 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno e incrementa la vida media *in vivo* de dicho compuesto objetivo endógeno por al menos 1.5 veces

 8 El uso de la reivindicación 7 en donde dicho ligando
20 une dicho compuesto objetivo endógeno e incrementa la vida media *in vivo* de dicho compuesto objetivo endógeno por al menos 10 veces

 9 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6 en donde dicho ligando inhibe la actividad de dicho compuesto
25 objetivo endógeno por no más de aproximadamente 10%

10 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6
en donde la concentración inhibidora 50 (IC50) de dicho ligando es
al menos 1 micromolar

11 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10
5 en donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno
pero no se une al sitio activo de dicho compuesto objetivo
endógeno

12 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11
en donde dicho ligando comprende dos o más copias de dicha
10 porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno

13 El uso de la reivindicación 12 en donde dicho ligando
es un dímero de dicha porción que tiene un sitio de unión para un
objetivo endógeno

14 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1-13 en
15 donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto
objetivo endógeno se selecciona del grupo consistiendo de un
anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor
LDL, un dominio EGF, y un avimero

15 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1-14 en
20 donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto
objetivo endógeno es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo

16 El uso de la reivindicación 15 en donde dicha porción
que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno
es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo
25 consistiendo de un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena

sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab' un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

17 El uso de la reivindicación 16 en donde dicha porción
5 que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

18 El uso de la reivindicación 17 en donde dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina se selecciona del grupo
consistiendo de un V_H de humano, y un V_L de humano

10 19 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1 a 18 en donde dicho ligando comprende además una porción que extiende la vida media

20 El uso de la reivindicación 19 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción de glicol de
15 polialquileo, albumina de suero o un fragmento del mismo, receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

21 El uso de la reivindicación 20 en donde dicha porción
20 que extiende la vida media es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

22 El uso de la reivindicación 21 en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un dAb

25

23 El uso de la reivindicación 20 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* seleccionado del grupo consistiendo de un aficuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avímero

24 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 21 a 23 en donde el polipéptido que mejora la vida media *in vivo* es albumina de suero o receptor Fc neonatal

10 25 El uso de la reivindicación 20, en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción de glicol de polietileno

26 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 25 en donde dicho medicamento es substancialmente no inmunogénico

15 27 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 26 en donde dicho medicamento es una formulación de depósito

28 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27 en donde dicho compuesto objetivo endógeno se selecciona del grupo consistiendo de un receptor de citoquina soluble, un antagonista de receptor endógeno, una enzima, una citoquina, un factor de crecimiento, y una hormona

29 El uso de la reivindicación 28 en donde dicho compuesto objetivo endógeno es un receptor de citoquina soluble

20 30 El uso de la reivindicación 28 en donde dicho receptor de citoquina soluble es TNFR1 soluble

25

31 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1-30 en donde la porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno une dicho compuesto objetivo endógeno con K_d de 1×10^{-7} M o menos

5 32 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1-30 en donde el ligando une dicho compuesto objetivo endógeno con K_d de 1×10^{-7} M o menos

33 Uso de un ligando comprendiendo una porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para
10 la fabricación de un medicamento para incrementar la actividad de dicho objetivo endógeno, en donde dicho ligando une dicho objetivo endógeno y no inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

34 El uso de la reivindicación 33 en donde dicho ligando
15 no se une al sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno

35 El uso de la reivindicación 33 o reivindicación 34 en donde dicho ligando inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno por no más de aproximadamente 10%

36 El uso de la reivindicación 33 o reivindicación 34 en
20 donde la concentración inhibidora 50 (IC50) de dicho ligando es al menos 1 micromolar

37 Uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-36 en donde dicho ligando comprende dos o más porciones que tienen un sitio de unión para dicho objetivo endógeno

38 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-36 en donde dicho ligando comprende dos o más copias de dicha porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno

39 El uso de la reivindicación 38 en donde dicho ligando es un dímero de dicha porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno

40 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-39 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno se selecciona del grupo consistiendo de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avimero

41 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-40 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo

42 El uso de la reivindicación 41 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo consistiendo de un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂, un diacuerpo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

43 El uso de la reivindicación 42 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

44 El uso de la reivindicación 43 en donde dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina se selecciona del grupo consistiendo de un V_H de humano, y un V_L de humano

45 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 33 a 44
5 en donde dicho ligando comprende además una porción que extiende la vida media

46 El uso de la reivindicación 45 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción de glicol de polialquileno, albumina de suero o un fragmento del mismo,
10 receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

47 El uso de la reivindicación 46 en donde dicha porción que extiende la vida media es un anticuerpo o fragmento de
15 anticuerpo que tiene un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

48 El uso de la reivindicación 47 en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un dAb

49 El uso de la reivindicación 46 en donde dicha porción
20 que extiende la vida media es una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* seleccionado del grupo consistiendo de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avimero

50 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 47 a 49
en donde el polipéptido que mejora la vida media *in vivo* es
albumina de suero o receptor Fc neonatal

51 El uso de la reivindicación 46 en donde dicha porción
5 que extiende la vida media es una porción de glicol de polietileno

52 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33 a 51
en donde dicho medicamento es substancialmente no
inmunogénico

53 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 1 a 27
10 en donde dicho medicamento es una formulación de depósito

54 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33 a 53
en donde dicho compuesto objetivo endógeno se selecciona del
grupo consistiendo de un receptor de citoquina soluble, un
antagonista de receptor endógeno, una enzima, una citoquina, un
15 factor de crecimiento, y una hormona

55 El uso de la reivindicación 54 en donde dicho
compuesto objetivo endógeno es un receptor de citoquina soluble

56 El uso de la reivindicación 55 en donde dicho receptor
de citoquina soluble es TNFR1 soluble

20 57 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-56
en donde la porción que tiene un sitio de unión para un compuesto
objetivo endógeno une dicho compuesto objetivo endógeno con Kd
de 1×10^{-7} M o menos

58 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 33-56
25 en donde el ligando une dicho compuesto objetivo endógeno con

Kd de 1×10^{-7} M o menos

59 Uso de un ligando comprendiendo dos o más porciones que tienen un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno para la fabricación de un medicamento para incrementar la actividad de unión de dicho compuesto objetivo endógeno, en donde dicho ligando une dicho objetivo endógeno, no une el sitio activo de dicho objetivo endógeno, y no inhibe substancialmente la actividad de unión de dicho compuesto objetivo endógeno

60 El uso de la reivindicación 59 en donde dicho ligando comprende dos copias de una porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno

61 El uso de la reivindicación 61 en donde dicho ligando es un dímero de dicha porción que tiene un sitio de unión para un objetivo endógeno

62 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 59-61 en donde dicha actividad de unión se incrementa por al menos un factor de 10

63 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 59-63 en donde dicho compuesto objetivo endógeno es un receptor de citoquina soluble

64 El uso de la reivindicación 64 en donde dicho receptor de citoquina soluble es TNFR1 soluble, y dichas porciones que tienen un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno independientemente unen un dominio de TNFR1 seleccionado del grupo consistiendo de Dominio 1 y Dominio 4

65 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 59-64 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno se selecciona del grupo consistiendo de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avimero

66 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 59-64 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo

10 67 El uso de la reivindicación 66 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un fragmento de anticuerpo seleccionado del grupo consistiendo de un fragmento Fv, un fragmento Fv de cadena sencilla, un fragmento Fv unido a disulfuro, un fragmento Fab, un
15 fragmento Fab', un fragmento F(ab')₂ un diacuerpo, un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

68 El uso de la reivindicación 67 en donde dicha porción que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno es un dominio variable sencillo de inmunoglobulina

20 69 El uso de la reivindicación 68 en donde dicho dominio variable sencillo de inmunoglobulina se selecciona del grupo consistiendo de un V_H de humano, y un V_L de humano

70 El uso segun cualquiera de las reivindicaciones 59 a 69 en donde dicho ligando comprende además una porción que
25 extiende la vida media

71 El uso de la reivindicación 70 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción de glicol de polialquileno, albumina de suero o un fragmento del mismo, receptor de transferrina o una porción de unión a transferrina del mismo, o una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

72 El uso de la reivindicación 71 en donde dicha porción que extiende la vida media es un anticuerpo o fragmento de anticuerpo que tiene un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo*

73 El uso de la reivindicación 72 en donde dicho anticuerpo o fragmento de anticuerpo es un dAb

74 El uso de la reivindicación 71 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción comprendiendo un sitio de unión para un polipéptido que mejora la vida media *in vivo* seleccionado del grupo consistiendo de un anticuerpo, un dominio SpA, un dominio de clase A del receptor LDL, un dominio EGF, y un avímero

75 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 72 a 74 en donde el polipéptido que mejora la vida media *in vivo* es albumina de suero o receptor Fc neonatal

76 El uso de la reivindicación 71 en donde dicha porción que extiende la vida media es una porción de glicol de polietileno

77 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 59 a 76 en donde dicho medicamento es substancialmente no

inmunogénico

78 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 59 a 77
en donde dicho medicamento es una formulación de depósito

79 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 59-78
5 en donde la porción que tiene un sitio de unión para un compuesto
objetivo endógeno une dicho compuesto objetivo endógeno con K_d
de 1×10^{-7} M o menos

80 El uso según cualquiera de las reivindicaciones 59-78
en donde el ligando une dicho compuesto objetivo endógeno con
10 K_d de 1×10^{-7} M o menos

81 Un ligando que une un compuesto objetivo endógeno
teniendo actividad adecuada para tratar una enfermedad en un
sujeto, en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho
compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la
15 actividad de dicho compuesto objetivo endógeno, para uso en
terapia de una enfermedad apta para tratamiento con dicho
compuesto objetivo endógeno

82 El ligando de la reivindicación 81 en donde dicho
ligando incrementa la vida media *in vivo* de dicho compuesto
20 objetivo endógeno

83 El ligando de la reivindicación 81 o reivindicación 82 en
donde dicho ligando incrementa la cantidad de dicho compuesto
objetivo endógeno en un sujeto

84 El ligando según cualquiera de las reivindicaciones 81-
25 83 en donde dicho ligando incrementa la biodisponibilidad de dicho

compuesto objetivo endógeno

85 El ligando segun cualquiera de las reivindicaciones 81-84 en donde dicho ligando incrementa la actividad de unión de dicho compuesto endógeno

5 86 El ligando segun cualquiera de las reivindicaciones 81-85 en donde dicho ligando es como se describe en cualquiera de de las reivindicaciones 1-80

87 Una composición farmacéutica comprendiendo un ligando que une un compuesto objetivo endógeno teniendo
10 actividad adecuada para tratar una enfermedad en un sujeto y un vehículo fisiológicamente aceptable, en donde dicho ligando no une el sitio activo de dicho compuesto objetivo endógeno o substancialmente inhibe la actividad de dicho compuesto objetivo endógeno

15 88 La composición farmacéutica de la reivindicación 87 en donde dicho ligando incrementa la vida media *in vivo* de dicho compuesto objetivo endógeno

89 La composición farmacéutica de la reivindicación 87 o reivindicación 88 en donde dicho ligando incrementa la cantidad de
20 dicho compuesto objetivo endógeno en un sujeto

90 La composición farmacéutica segun cualquiera de las reivindicaciones 87-89 en donde dicho ligando incrementa la biodisponibilidad de dicho compuesto objetivo endógeno

91 La composición farmacéutica segun cualquiera de las
25 reivindicaciones 87-90 en donde dicho ligando incrementa la

actividad de unión de dicho compuesto endógeno

92 La composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 87-91 en donde dicho ligando es cualquiera de las reivindicaciones 1-80

5 93 Un dispositivo de suministro de fármaco comprendiendo una composición farmacéutica según cualquiera de las reivindicaciones 87-92

94 El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 93 en donde dicho dispositivo de suministro de fármaco se selecciona del grupo consistiendo de un dispositivo de suministro parenteral, dispositivo de suministro intravenoso, dispositivo de suministro intramuscular, dispositivo de suministro intraperitoneal, dispositivo de suministro transdérmico, dispositivo de suministro pulmonar, dispositivo de suministro intraarterial
10 dispositivo de suministro intratecal, dispositivo de suministro intraarticular, dispositivo de suministro subcutáneo, dispositivo de suministro intranasal, dispositivo de suministro vaginal, y dispositivo de suministro rectal
15

95 El dispositivo de suministro de fármaco de la reivindicación 94 en donde dicho dispositivo se selecciona del grupo consistiendo de una jeringa, un dispositivo de suministro transdérmico, una cápsula, una tableta, un nebulizador, un inhalador, un atomizador, un aerosolizador, un vaporizador, un inhalador de polvo seco, un inhalador de dosis medida, un rociador
20 de dosis medida, un vaporizador de dosis medida, un atomizador
25

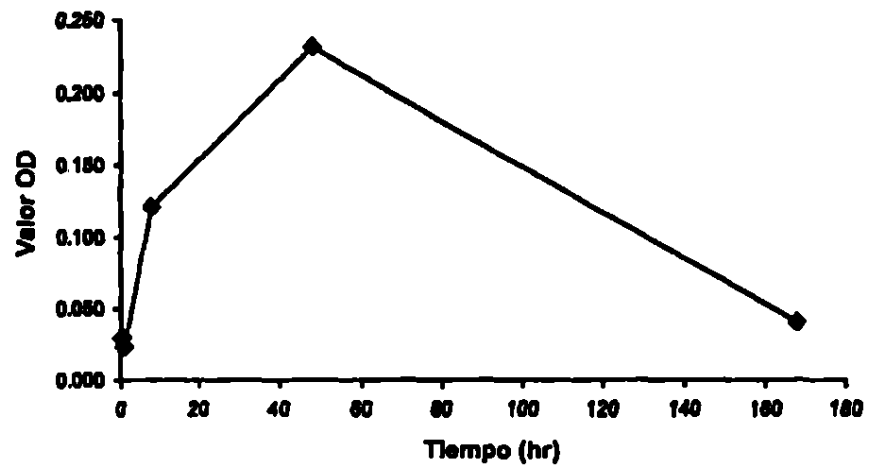
de dosis medida, un catéter

96 Uso de un ligando comprendiendo una porción de unión
que tiene un sitio de unión para un compuesto objetivo endógeno
para incrementar la vida media, biodisponibilidad o actividad de
5 dicho compuesto endógeno en donde dicha porción de unión que
tiene un sitio de unión para un compuesto endógeno es dicho
compuesto endógeno o una porción o variante del mismo, y en
donde dicho ligando une dicho compuesto objetivo endógeno y no
inhibe substancialmente la actividad de dicho compuesto objetivo
10 endógeno

97 El uso de la reivindicación 96 en donde dicho
compuesto endógeno es un receptor soluble que es un miembro de
la superfamilia de receptor TNF

98 Uso de un ligando comprendiendo una porción de unión
15 que tiene un sitio de unión para un miembro de la superfamilia de
receptor TNF para incrementar la vida media, biodisponibilidad o
actividad de dicho miembro de la superfamilia de receptor TNF, en
donde dicho ligando une dicho miembro de la superfamilia de
receptor TNF y no inhibe substancialmente la actividad de dicho
20 miembro de la superfamilia de receptor TNF, y en donde dicha
porción de unión que tiene un sitio de unión para un miembro de la
superfamilia de receptor TNF es un dominio de ensamble de pre-
ligando (PLAD) o una variante del mismo

Figura 1



SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO



No 07-052700 -00000-0000

Fecha 2007-05-25 16 57 52 Dep. 2020 NUECREACIONE
 Trá 11 PATENTEIYII Eje 378 FASENACIONALI
 Act 411 PRESENTACION Folios 284



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] 32 ✓
- ◆ Dibujos de ser estos pertinentes [x] 284 ✓
- ◆ 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 []

Abudiam Nava
 Firma Responsable

Fecha _____

Carrera 13 No 27-00 Piso 5 7 y 10
 Conmutador 3 82 08 40
 Fax 350 52 20
 E-mail info@sic.gov.co
www.sic.gov.co
 Bogotá D C , Colombia

286

REPUBLICA DE COLOMBIA
SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

Bogotá,
2020

Doctor(a)
LLOREDA RICAURTE ALICIA

REFERENCIA	Radicación No.	7 52700
	Solicitud internacional	PCT/GB2005/004319
	Fecha inicio fase nacional	10/06/2007
	Trámite	11
	Evento	378
	Actuación	430
	Oficio No.	055 7336

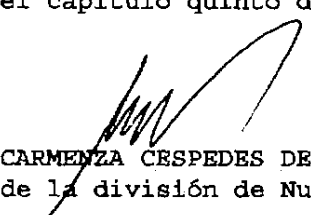
Como resultado del examen de forma, realizado con fundamento en el artículo 38 de la Decisión 486 de la Comisión de la Comunidad Andina, artículo 27 del Tratado de Cooperación en Materia de Patentes (PCT), regla 51 bis del Reglamento y Circular Única de la Superintendencia de Industria y Comercio, se le comunica que:

1. La solicitud no contiene la copia del documento, en que consta la cesión del derecho a la patente del inventor al solicitante o a su causante. (Art. 26-k) Decisión 486.

2. La solicitud no contiene el poder debidamente otorgado, con el lleno de los requisitos exigidos por los artículos 63 y subsiguientes del Código de Procedimiento Civil. Adicionalmente, deberá presentar el documento que acredita la existencia y representación legal de la sociedad solicitante, cuando ésta fuere persona jurídica.

En cumplimiento de lo dispuesto por el artículo 39 de la Decisión 486, se le requiere para que dentro del término de dos meses siguientes a la fecha de notificación del presente oficio, complete los requisitos anteriormente enunciados. En caso de no dar cumplimiento al presente requerimiento, la solicitud se considerará abandonada y perderá su prelación.

Notifíquese el presente oficio conforme a lo dispuesto en el numeral 5.2, literal e), del capítulo quinto del título primero de la Circular Unica No.10 de 2001.


ALIX CARMENZA CESPEDES DE VERGEL
Jefe de la división de Nuevas Creaciones

El anterior requerimiento fue notificado por fijación en lista de fecha 15 JUN. 2007
adpa11