SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
No. 08-121925-A-00010-0000
Fecha: 2015-02-06 15:35:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6
No. 15-024738- -00000-0000
Fecha: 2015-02-06 15:35:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

Delegatura de Propiedad Industrial
División de Nuevas Creaciones

SOLICITUD DIVISIONAL DE PATENTE DE INVENCION PCT ENTRADA EN FASE NACIONAL

21. EXPEDIENTE No. **08.121.925-A**

54. TITULO: **COMPOSICION DE PEPTICUERPOS TERAPEUTICOS QUE COMPRENDEN UN PEPTICUERPO TERAPEUTICO DE SEQ ID No.: 1698**

52. CLASIFICACION INTERNACIONAL:

71. SOLICITANTE: **AMGEN, INC.**

DOMICILIO: **One Amgen Center Drive, Thousand Oaks, California 91320, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA**

74. APODERADO: **Dra. MARGARITA CASTELLANOS A.**

22. BOGOTA, D.C., _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-121925-A-00010-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-024738- -00000-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

MF

DIRECCION DE NUEVAS CREACIONES
CONVERSION, DIVISION Y FUSION DE SOLICITUDES

1. Identificación del Trámite

[ ] **Conversión** [X] **División** [ ] **Fusión**

[X] Patente de Invención

[ ] Patente de Modelo de Utilidad

[ ] Registro de Diseño Industrial

[ ] Esquema de Trazado de Circuitos Integrados

2. Datos del solicitante

Persona Natural [ ] Persona Jurídica [X]

AMGEN, INC.
Nombre o Denominación / Nombre social

Nombre del representante legal

Tipo de empresa Micro [ ] Pequeña [ ] Mediana [ ] Otra [ ]

Documento de identificación: [ ] C.C. [ ] C.E. [ ] NIT [ ] Otro Número _____

Nacionalidad/País de constitución		Dirección del titular	Ciudad
ESTADOS UNIDOS DE AMERICA		**One Amgen Center Drive**	**Thousand Oaks, California 91320**
Dirección electrónica		No. Fax	Número telefónico

[ ] Autorizo expresamente a la Superintendencia de Industria y Comercio para que todas las comunicaciones sean enviadas a través de la direccion de correo electrónico

3. Datos del representante o apoderado

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO — Apellidos y Nombre
39.779.654 de Bogotá — Documento de identificación
70.819 de C.S.J. — T.P. No.

Dirección del representante			Ciudad
Calle 94 A No. 7 A - 09			**Bogotá**
Dirección electrónica		No. Fax	Número telefónico
info@castellanosyco.co		**7 550158**	**7 560770**

En caso de haber presentado poder general para asuntos que se adelanten ante la Delegatura de Propiedad Industrial, sírvase indicar el número de su radicación o protocolo general _____

4. Datos del trámite

CONVERSION	DIVISION	FUSION
Expediente	Expediente 08 121925 A	Expediente
De:	No. de Divisional UNO (1)	De:
A:		A:

5. Comprobante de Pago No. 15- 0015373 **Fecha** Febrero 6 de 2015

6. Anexos

- [X] Comprobante de pago de las tasas
- [X] Poder, si fuere el caso con el que se acredita la representación
- [ ] Número de documento que ordena la comisión o fusión o división
- [ ] Documento que contiene la conversión, división o fusión de la solicitud
- [X] Texto de la descripción, reivindicaciones y resumen
- [ ]

7. Firma

MARGARITA CASTELLANOS ABONDANO
Nombre y Apellidos

Firma

39.779.654 de Bogotá
C.C.

70.819 C.S.J.
T.P.

P3382 - SOLICITUD DIVISIONAL DE LA P2653

6 FEB. 2015

PODER

El (los)
AMGEN, INC.

Domiciliados en

One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks,
California 91320,
Estados Unidos de América

Nombran por el presente a **XIMENA CASTELLANOS A. y/o MARGARITA CASTELLANOS A.** abogadas con oficinas en la Calle 94A No. 7A-09, Bogotá-Colombia para

y para obtener la protección de mi (nuestra) propiedad Industrial y con este fin autorizamos a dichos apoderados para que nos representen ante cualesquiera autoridades o personas de los órdenes administrativo, contencioso –administrativo y judicial en todo lo relacionado con los siguientes actos y gestiones:

a) Obtención de patentes de invención, modelos y dibujos industriales; registro de marcas de fabrica, de servicio, colectivas o defensivas y de denominaciones de origen, depósito de nombres y enseñas comerciales; su renovación, prórroga, inscripción de traspaso y cambio de nombre o domicilio, cancelación voluntaria y el registro de licencias de uso de esos derechos;
b) Para la obtención de registros sanitarios;
c) Acciones de oposición, observación, cancelación, nulidad, medidas cautelares y en general los juicios civiles, penales, administrativos o contencioso - administrativos que promovamos o se nos promuevan.

Pudiendo en todos los actos y gestiones arriba mencionados sustituir éste mandato, transigir, desistir, recibir, cancelar, renunciar, aceptar notificaciones y nombrar apoderados judiciales y extrajudiciales.

Finalmente, este poder ratifica la validez de todos los actos y solicitudes que, a nombre de la poderdante hubieren realizado los apoderados en relación con las facultades anteriormente enumeradas, antes de la suscripción del presente poder

Dado y firmado hoy 6 de Agosto de 2008

en Thousand Oaks, Ventura County,
California, ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

por AMGEN, INC.
Stuart L. Watt, Vice Presidente
(El notario debe suscribir el documento en la pagina siguiente)

(Se requiere legalización consular o mediante apostilla)

POWER OF ATTORNEY

I (we) the undersigned
AMGEN, INC.

Of

One Amgen Center Drive,
Thousand Oaks,
California 91320,
United States of America

hereby grant(s) Power of Attorney to **XIMENA CASTELLANOS A. and /or MARGARITA CASTELLANOS** a. attorneys residing at Calle 94A No. 7A-09, Bogotá- Colombia, to

and to obtain the protection of my (our Industrial Property, for which purpose we authorize the said attorneys to represent us before any authorities, or persons, specially those, administrative, contentious and judicial, in all matters concerning the following:

a) Obtainment of patents, ~~models and designs, registration of trademarks, service, collective and defensive marks, and of designations of origin; the deposit of trade names and ensigns;~~ its renewal, extension, recordal of assignments, change of name or domicile, voluntary cancellation, and the registration of licenses of use of the above rights;
b) For the obtainment of Sanitary registrations;
c) Actions of opposition, cancellation, nullity, infringement, granting of licenses; and in general the civil, criminal and administrative suits related to those rights; actions and suits instituted by us or against us;

In all the above matters they may substitute this power of attorney, compromise, desist, cancel, receive, renounce, accept notifications and appoint attorneys in fact, in or out of court.

Finally, this power of attorney ratifies the validity of all acts and applications made by the representatives in the name of the signatory of this power of attorney, with regard to the faculties above given, before the execution of the present power of attorney. Based on PCT/2007/001714

Given and signed this Aug. 6 ,2008

in Thousand Oaks, Ventura county, California USA

by Stuart L. Watt
Stuart L. Watt, Vice President, LAW
(Notary shall execute on the other side)

(Consular legalization or apostille is required)

CASTELLANOS & CO
ABOGADOS COLOMBIA
Calle 94A No. 7A-09- P.O.Box 6349 - Bogotá, Colombia
Tels.: (571) 610 74 20 / - Fax (571) 610 07 06 - e-mail info@castellanosyco.com

SECRETARY OF STATE

For use in Colombia. All other use prohibited.

APOSTILLE

(Convention de La Haye du 5 octobre 1961)

1. *Country: United States of America*
   This public document
2. *has been signed by Christine Vu*
3. *acting in the capacity of Notary Public, State of California*
4. *bears the seal/stamp of Christine Vu, Notary Public, State of California*

CERTIFIED

5. *At Sacramento, California*
6. *the 15th day of August 2008*
7. *by Deputy Secretary of State, State of California*
8. *No. 574241*
9. *Seal/Stamp:*

10. *Signature*

Secretary of State

BY _____

5

CALIFORNIA ALL-PURPOSE ACKNOWLEDGMENT

State of California

County of Ventura

On Aug. 6, 2008 (Date) before me, Christine Vu, Notary Public (Here Insert Name and Title of the Officer)

personally appeared Stuart L. Watt (Name(s) of Signer(s))

who proved to me on the basis of satisfactory evidence to be the person(s) whose name(s) is/are subscribed to the within instrument and acknowledged to me that he/she/they executed the same in his/her/their authorized capacity(ies), and that by his/her/their signature(s) on the instrument the person(s), or the entity upon behalf of which the person(s) acted, executed the instrument.

CHRISTINE VU
Commission # 1704187
Notary Public - California
Ventura County
My Comm. Expires Nov 11, 2010

I certify under PENALTY OF PERJURY under the laws of the State of California that the foregoing paragraph is true and correct.

WITNESS my hand and official seal.

Signature _____ (Signature of Notary Public)

Place Notary Seal Above

OPTIONAL

Though the information below is not required by law, it may prove valuable to persons relying on the document and could prevent fraudulent removal and reattachment of this form to another document.

Description of Attached Document

Title or Type of Document: Power of Attorney

Document Date: _____ Number of Pages: _____

Signer(s) Other Than Named Above: _____

Capacity(ies) Claimed by Signer(s)

Signer's Name: Stuart L. Watt

- ☐ Individual
- ☑ Corporate Officer — Title(s): VP, Law
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney in Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing: Amgen Inc

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

Signer's Name: _____

- ☐ Individual
- ☐ Corporate Officer — Title(s): _____
- ☐ Partner — ☐ Limited ☐ General
- ☐ Attorney in Fact
- ☐ Trustee
- ☐ Guardian or Conservator
- ☐ Other: _____

Signer Is Representing: _____

RIGHT THUMBPRINT OF SIGNER
Top of thumb here

©2007 National Notary Association • 9350 De Soto Ave., P.O. Box 2402 • Chatsworth, CA 91313-2402 • www.NationalNotary.org Item #5907 Reorder: Call Toll-Free 1-800-876-6827

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 202-08, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY SEPTIEMBRE 22 DEL 2008, EN LA CIUDAD DE BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

DOCUMENTO DE PODER DE AMGEN, INC. ESCRITO EN INGLES Y ESPAÑOL.

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

CALIFORNIA - RECONOCIMIENTO DE TODO PROPÓSITO

ESTADO DE CALIFORNIA

CONDADO DE VENTURA

EN AGOSTO 6, 2008, ANTE MI, CHRISTINE VU, NOTARIO PUBLICO, COMPARECIO: STUART L WATT, QUIEN BASADO EN EVIDENCIA SATISFACTORIA COMPROBÓ QUE LA PERSONA CUYO NOMBRE ESTA SUSCRITO EN EL DOCUMENTO ADJUNTO Y RECONOCIÓ QUE HABIA FIRMADO EL MISMO CON LA AUTORIZACIÓN CORRESPONDIENTE Y QUE POR MEDIO DE SU FIRMA EN EL INSTRUMENTO LA PERSONA O ENTIDAD A NOMBRE DE LA CUAL LA PERSONAS ACTUÓ, EJECUTO EL DOCUMENTO.

CERTIFICO BAJO GRAVEDAD DE JURAMENTO BAJO LAS LEYES DEL ESTADO DE CALIFORNIA QUE EL ANTERIOR PÁRRAFO ES AUTENTICO Y VERDADERO.
EN TESTIMONIO DE LO CUAL, FIRMO Y SELLO

FIRMADO POR NOTARIO PUBLICO.

SELLO QUE REZA:

CHRISTINE VU - COMISIÓN No. 1704187 NOTARIO PUBLICO DE CALIFORNIA CONDADO DE VENTURA. MI COMISIÓN VENCE: NOV. 11, 2010.

OPCIONAL

Sergio Eleuterio Patorre M.
Traductor Interprete Oficial
Resol. No. 2639 Minjusticia 1991

LA INFORMACIÓN A CONTINUACIÓN NO ES REQUERIDA POR LEY. SIN EMBARGO PUEDE PREVENIR EL ANEXO FRAUDULENTO DE ESTE RECONOCIMIENTO A UN DOCUMENTO NO AUTORIZADO.

DESCRIPCIÓN DE DOCUMENTO ADJUNTO

TIPO DE DOCUMENTO: DOCUMENTO DE PODER. FECHA DOCUMENTO: -

EL FIRMANTE REPRESENTA A: AMGEN INC.

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

ESTADO DE CALIFORNIA

SECRETARIO DE ESTADO

APOSTILLE

(CONVENTION DE LA HAYE DU 5 OCTOBRE 1961

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA
   ESTE DOCUMENTO PUBLICO
2. HA SIDO FIRMADO POR: CHRISTINE VU
3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE: NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE CHRISTINE VU, NOTARIO PUBLICO, ESTADO DE CALIFORNIA
   CERTIFICADO
5. EN: SACRAMENTO, CALIFORNIA
6. EL DIA: 15 DE AGOSTO DEL 2008.
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO DELEGADO ESTADO DE CALIFORNIA
8. No. 574241
9. SELLO/ESTAMPILLA
10. FIRMA

GRAN SELLO DORADO

FIRMADO POR:

SECRETARIO DE ESTADO

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2008 SET 22 A 11:46
JEFE DE LEGALIZACIONES BOGOTA D.C.

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

821333

Sergio Eleuterio Gatorre Mendez
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 1839 Minjusticia 1991

Delaware

The First State

I, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARY OF STATE OF THE STATE OF DELAWARE, DO HEREBY CERTIFY "AMGEN INC." IS DULY INCORPORATED UNDER THE LAWS OF THE STATE OF DELAWARE AND IS IN GOOD STANDING AND HAS A LEGAL CORPORATE EXISTENCE SO FAR AS THE RECORDS OF THIS OFFICE SHOW, AS OF THE NINTH DAY OF SEPTEMBER, A.D. 2008.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE SAID "AMGEN INC." WAS INCORPORATED ON THE THIRTY-FIRST DAY OF OCTOBER, A.D. 1986.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE FRANCHISE TAXES HAVE BEEN PAID TO DATE.

AND I DO HEREBY FURTHER CERTIFY THAT THE ANNUAL REPORTS HAVE BEEN FILED TO DATE.



Harriet Smith Windsor

Harriet Smith Windsor, Secretary of State

2106150 8300

AUTHENTICATION: 6838898

080938427

DATE: 09-09-08

You may verify this certificate online at corp.delaware.gov/authver.shtml

Apostille

(Convention de La Haye du 5 Octobre 1961)

1. *Country: United States of America*

This public document:

2. *has been signed by Harriet Smith Windsor*

3. *acting in the capacity of Secretary of State of Delaware*

4. *bears the seal/stamp of Office of Secretary of State*

Certified

5. *at Dover, Delaware*

6. *the ninth day of September, A.D. 2008*

7. *by Secretary of State, Delaware Department of State*

8. *No. 0363581*

9. *Seal/Stamp:*



10. *Signature:*

Harriet Smith Windsor

Secretary of State

TRADUCCIÓN OFICIAL No. 202-08, DE UN DOCUMENTO ESCRITO EN INGLES, SELLADO CON EL SELLO DEL SUSCRITO TRADUCTOR OFICIAL, HOY SEPTIEMBRE 22 DEL 2008, EN LA CIUDAD DE BOGOTA D.C., REPUBLICA DE COLOMBIA.

DELAWARE

OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO

YO, HARRIET SMITH WINDSOR, SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE, POR MEDIO DEL PRESENTE CERTIFICO QUE "AMGEN INC.", ESTA DEBIDAMENTE ESTABLECIDA BAJO LAS LEYES DE DELAWARE Y SE ENCUENTRA EN BUENA POSICION Y TIENE EXISTENCIA SOCIAL LEGAL SEGÚN DEMUESTRAN LOS REGISTROS DE ESTA OFICINA, A SEPTIEMBRE NUEVE DEL 2008.

Y ADEMÁS CERTIFICO POR MEDIO DEL PRESENTE QUE ESTE "AMGEN INC." FUE ESTABLECIDA EL DÍA TREINTA Y UNO DE OCTUBRE DE 1986.

Y ADEMÁS CERTIFICO QUE LOS IMPUESTOS DE FRANQUICIA HAN SIDO PAGADOS HASTA EL PRESENTE.

Y ADEMÁS CERTIFICO QUE LOS INFORMES ANUALES HAN SIDO REGISTRADOS HASTA LA FECHA ACTUAL.

FIRMADO POR

HARRIET SMITH WINDSOR

SECRETARIO DE ESTADO

Sergio Eleuterio Patorre Mesa
Traductor Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 1991

GRAN SELLO DE LA OFICINA DEL SECRETARIO

2106150 8300 AUTENTICACION: 6838898

080938427 FECHA: 09-09-08

ADJUNTO AL DOCUMENTO SE ENCUENTRA LO SIGUIENTE:

APOSTILLE

(CONVENCION DE LA HAYE DE 5 OCTOBRE 1961)

1. PAIS: ESTADOS UNIDOS DE AMERICA

   ESTE DOCUMENTO PUBLICO

2. HA SIDO FIRMADO POR: HARRIET SMITH WINDSOR

3. ACTUANDO EN CAPACIDAD DE: SECRETARIO DE ESTADO DEL ESTADO DE DELAWARE

4. LLEVA EL SELLO/ESTAMPILLA DE LA OFICINA DEL SECRETARIO DE ESTADO

CERTIFICADO

5. EN: DOVER, DELAWARE
6. EL DÍA NUEVE DE SEPTIEMBRE, A.D. DEL 2008
7. POR: EL SECRETARIO DE ESTADO, DEPARTAMENTO DE ESTADO DE DELAWARE
8. CERTIFICADO No. 0363581
9. SELLO/ESTAMPILLA 10. FIRMA

FIRMADO POR: HARRIET SMITH WINDSOR

SECRETARIO DE ESTADO

SELLO DEL ESTADO DE DELAWARE

MINISTERIO DE RELACIONES EXTERIORES
2008 SET 22 A 11:45
JEFE DE LEGALIZACIONES
BOGOTA D.C.

8213332

NO SE ASUME RESPONSABILIDAD DEL TEXTO

Sergio Eleuterio Latorre Mesa
Traductor e Interprete Oficial
Resol. No. 2839 Minjusticia 199

COMPOSICION DE PEPTICUERPOS TERAPEUTICOS QUE COMPRENDEN UN PEPTICUERPO TERAPEUTICO DE SEQ ID No.: 1698

CAMPO DE LA INVENCIÓN

En términos generales, la invención se refiere a formulaciones de cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados y a métodos para la preparación de una composición liofilizada que comprende cuerpos peptídicos terapéuticos.

ANTECEDENTES DE LA INVENCIÓN

Las proteínas recombinantes son una clase emergente de agentes terapéuticos. Dichos agentes terapéuticos recombinantes han generado avances en la formulación de proteínas y en la modificación química. Se han identificado modificaciones que pueden proteger las proteínas terapéuticas, principalmente al bloquear su exposición a enzimas proteolíticas. Las modificaciones de proteínas también pueden aumentar la estabilidad, tiempo de circulación y actividad biológica de la proteína terapéutica. Un artículo de revisión que describe la modificación de proteínas y las proteínas de fusión es Francis (1992), Focus on Growth Factors 3:4-10 (Mediscript, Londres), el cual se incorpora a la presente por referencia.

Una modificación útil es la combinación de un polipéptido con un dominio "Fc" de un anticuerpo. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes: un dominio variable conocido como "Fab", el cual se enlaza al antígeno; y un dominio constante conocido como "Fc", el cual se enlaza a funciones efectoras tales como activación complementaria y ataque por parte de las células fagocíticas. Un Fc tiene una larga semivida sérica, mientras que un Fab tiene vida corta. Capon y colaboradores, (1989), Nature 337: 525-31. Véase también, por ejemplo, la patente estadounidense número 5.428.130. Cuando se construye junto con una proteína o cuerpo peptídico terapéutico, un dominio Fc puede proporcionar una semivida más prolongada o incorporar funciones tales como enlace del receptor Fc, enlace de proteína A, fijación de complementos y tal vez incluso transferencia placentaria. Ya mencionado. La Tabla 1 resume el uso de las fusiones de Fc con las proteínas terapéuticas conocidas en la técnica.

Tabla 1 – Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma de Fc	Molécula de fusión	Implicaciones terapéuticas	Referencia
IgG1	Extremo N terminal de CD30-L	Enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplásico; leucemia de linfocitos T	Patente estadounidense número 5.480.981
Fcγ2a Murina	IL-10	Anti-inflamatoria; rechazo de transplante	Zheng y otros (1995), J. Immunol. 154:5590-600
IgG1	Receptor TNF	Choque séptico	Fisher y otros (1996), N. Engl. J. Med. 334:1697-1702; Van Zee, K. y otros (1996), J. Immunol. 156:2221-30
IgG, IgA, IgM, ó IgE (excluyendo el primer dominio)	Receptor TNF	Inflamación, trastornos auto inmunológicos	Patente estadounidense número 5.808.029, emitida el 15 de setiembre de 1998
IgG1	Receptor CD4	SIDA	Capon y otros (1989), Nature 337:525-31
IgG1, IgG3	Extremo N terminal de IL-2	Antitumoral, antiviral	Harvill y otros (1995), Immunotech. 1:95-105
IgG1	Extremo C terminal de OPG	Osteoartritis; densidad ósea	WO 97/23614, publicada el 3 de julio de 1997
IgG1	Extremo N terminal de leptina	Antiobesidad	PCT/US 97/23183, presentada el 11 de diciembre de 1997
Ig Cγ1 humana	CTLA-4	Trastornos autoinmunológicos	Linsley (1991), J. Exp. Med. 174:561-9

El polietilenglicol ("PEG") conjugado o las proteínas de fusión y los péptidos también han sido estudiados para su empleo en productos farmacéuticos, en implantes artificiales y en otras aplicaciones donde la biocompatibilidad es de importancia. Varios derivados de PEG han sido propuestos por tener una fracción activa que permite al PEG unirse a agentes farmacéuticos e implantes, como así también a moléculas y superficies de manera general. Por ejemplo, se propusieron los derivados de PEG porque acoplan el PEG a superficies para controlar la humectación, la acumulación estática y la unión de otros tipos de moléculas a la superficie, incluso proteínas o residuos de proteínas.

En otros estudios, se ha demostrado que el acoplamiento de PEG ("PEGilación") se recomienda para superar obstáculos encontrados en el uso clínico de las moléculas biológicamente activas. La Publicación PCT publicada número WO 92/16221 menciona, por ejemplo, que se ha encontrado que muchas proteínas potencialmente terapéuticas tienen una corta semivida en suero sanguíneo.

La PEGilación disminuye la tasa de depuración del flujo sanguíneo al incrementar el peso molecular aparente de la molécula. Hasta cierto tamaño, la velocidad de filtración glomerular de las proteínas es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. La capacidad que tiene la PEGilación de reducir la depuración, por lo tanto, no es una función de la cantidad de grupos PEG que están unidos a la proteína, sino del peso molecular general de la proteína conjugada. La disminución de la eliminación puede originar un aumento de eficacia sobre el material no-PEGilado. Véase, por ejemplo, Conforti y otros, Pharm. Research Commun. Vol. 19, página 287 (1987) y Katre y otros, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A., volumen 84, página 1487 (1987).

Además, la PEGilación puede disminuir la agregación de las proteínas, (Suzuki y otros, Biochem. Biophys. Acta, volumen 788, página 248 (1984), alterar (esto es) la inmunogenicidad de proteínas (Abuchowski y otros, J. Biol. Chem., vol. 252, página 3582 (1977)), y aumentar la solubilidad de proteínas como se describe, por ejemplo, en la Publicación PCT Número WO 92/16221.

En general, la interacción de un complejo de proteína-ligando con su receptor a menudo se lleva a cabo en una interfase relativamente grande. Sin embargo, como se ha demostrado en el caso de la hormona de crecimiento humana enlazada a su receptor, sólo unos cuantos residuos clave en la interfase realmente contribuyen con gran parte de la energía de enlace. Clackson, T. y otros, Science 276:383-386 (1995). Esta observación y el hecho de que el grueso del complejo proteína-ligando remanente sólo sirve para exhibir los epítopos de enlace en la topología correcta, hacen posible encontrar ligandos activos de tamaño mucho más reducido. De esta manera, las moléculas que sólo tienen longitud "peptídica" pueden enlazarse a la proteína receptora de un complejo proteína-ligando grande dado. Dichos péptidos pueden imitar la bioactividad del complejo proteína-ligando grande ("agonistas peptídicos") o, a través del enlace competitivo, inhibir la bioactividad del complejo proteína-ligando grande ("antagonistas peptídicos").

El sistema de exhibición en fago de la biblioteca de péptidos surgió como un método poderoso para identificar dichos agonistas y antagonistas peptídicos. Véase, por ejemplo, Scott y otros (1990), Science 249:386; Devlin y otros (1990), Science 249:404; patente estadounidense Número 5.223.409, emitida el 29 de junio de 1993; patente estadounidense Número 5.733.731, emitida el 31 de marzo de 1998; patente estadounidense Número5.498.530, emitida el 12 de marzo de 1996; patente estadounidense Número 5.432.018, emitida el 11 de julio de 1995; patente estadounidense Número 5.338.665, emitida el 16 de agosto de 1994; patente estadounidense Número 5.922.545, emitida el 13 de julio de 1999; WO 96/40987,

publicada el 19 de diciembre de 1996; y WO 98/15833, publicada el 16 de abril de 1998, cada una de las cuales se incorpora por referencia. En dichas bibliotecas, las secuencias aleatorias de péptidos se exhiben por fusión con cubiertas proteicas del fago filamentoso. Típicamente, los péptidos exhibidos se eluyen por afinidad contra un dominio extracelular inmovilizado por anticuerpos. Los fagos retenidos se pueden enriquecer mediante rondas sucesivas de purificación de afinidad y repropagación, y los péptidos con mejor enlace se someten a secuenciamiento para identificar residuos clave dentro de una o más familias de péptidos estructuralmente relacionadas. Véase, por ejemplo, Cwirla y otros (1997), Science 276:1696-9, donde se identificaron dos familias distintas. Las secuencias peptídicas también sugieren cuáles residuos pueden reemplazarse de manera segura mediante mutagénesis del barrido de alanina o por mutagénesis en el nivel de ADN. Las bibliotecas de mutagénesis pueden crearse y tamizarse para optimizar en mayor grado la secuencia de los mejores enlazadores. Lowman (1997), Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24.

Otros métodos compiten con la exhibición en fago en la investigación sobre péptidos. Una biblioteca de péptidos puede fusionarse al extremo terminal carboxilo del represor lac y expresarse en E. coli. Otro método basado en E. coli permite la expresión en la membrana externa de la célula mediante la fusión con una lipoproteína asociada con péptidoglicano (PAL). Se hace referencia a estos y otros métodos en forma conjunta como "expresión en E. coli". Otro enfoque biológico para tamizar mezclas de péptidos solubles emplea levadura para la expresión y la secreción. Véase Smith y otros (1993), Mol. Pharmacol. 43:741-8. Se hace referencia al método de Smith y colaboradores, y a otros métodos relacionados, como "tamizaje basado en levadura". En otro método, la traducción de ARN aleatorio se interrumpe antes de la liberación de ribosoma, lo cual da como resultado una biblioteca de polipéptidos con su ARN asociado todavía adherido. Se hace referencia a éste y otros métodos en forma conjunta como "expresión en ribosoma". Otros métodos pueden emplear ligamiento químico de péptidos a ARN; ver, por ejemplo, Roberts & Szostak, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 94: 12297-303. Se hace referencia a éste y otros métodos en forma conjunta como "tamizaje de ARN-péptido". Se desarrollaron bibliotecas de péptidos derivados químicamente donde los péptidos se inmovilizan en materiales no-biológicos estables, tales como bastoncillos de polietileno o resinas permeables al solvente. Otra biblioteca de péptidos derivados químicamente utiliza fotolitografía para explorar los péptidos inmovilizados en portaobjetos de vidrio. Se hace referencia a estos y otros métodos en forma conjunta como "tamizaje de péptidos químicos". El tamizaje de péptidos químicos puede resultar ventajoso porque permite el empleo de aminoácidos D y otros análogos no-naturales, al igual que elementos no-peptídicos. Tanto los métodos biológicos como los químicos se analizan en Wells & Lowman, Curr. Opin. Biotechnol. 3: 355-62.

En el caso de péptidos bioactivos conocidos, puede completarse el diseño racional de ligandos peptídicos con propiedades terapéuticas favorables. En tal enfoque, se hacen

cambios escalonados a una secuencia peptídica y se determina el efecto de la sustitución sobre la bioactividad o una propiedad biofísica predictiva del péptido (por ejemplo, estructura en solución). Se hace referencia a estas técnicas en forma colectiva como "diseño racional". En una de dichas técnicas, se realiza una serie de péptidos en la cual un solo residuo por vez se reemplaza con alanina. Comúnmente se hace referencia a esta técnica como un "paseo de alanina" (alanine walk) o un "barrido de alanina" (alanine scan). Cuando se reemplazan dos residuos (contiguos o separados), se hace referencia a ello como "doble paseo de alanina". Las sustituciones de aminoácidos obtenidos pueden utilizarse solas o combinadas, lo cual resulta en una nueva entidad peptídica con favorables propiedades terapéuticas.

También se puede utilizar el análisis estructural de la interacción entre proteínas para sugerir péptidos que imitan la actividad aglutinante de complejos proteína-ligando grandes. En dicho análisis, la estructura de cristal puede sugerir la identidad y orientación relativa de residuos críticos del complejo proteína-ligando grande, a partir del cual se puede diseñar un péptido. Véase, por ejemplo, Takasaki y otros (1997), Nature Biotech. 15:1266-70. Se hace referencia a estos y otros métodos relacionados como "análisis estructural de proteínas". Estos métodos analíticos también se pueden utilizar para investigar la interacción entre una proteína receptora y péptidos seleccionados mediante exhibición en fago, lo cual puede sugerir una ulterior modificación de los péptidos para aumentar la afinidad de enlace.

Conceptualmente se pueden identificar miméticos de péptidos de cualquier proteína con el empleo de la exhibición en fago y los otros métodos que se mencionaron previamente. Estos métodos también se utilizaron para el mapeo de epítopos, para la identificación de aminoácidos críticos en interacciones entre proteínas, y como pistas para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Por ejemplo, Cortese y otros (1996), Curr. Opin. Biotech. 7:616-21. En la actualidad, las bibliotecas de péptidos se utilizan frecuentemente en estudios inmunológicos, tales como el mapeo de epítopos. Kreeger (1996), The Scientist, 10(13):19-20.

De particular interés es el empleo de bibliotecas de péptidos y otras técnicas en el descubrimiento de péptidos farmacológicamente activos. Un número de dichos péptidos identificados en la técnica se resumen en la Tabla 2. Los péptidos se describen en las publicaciones mencionadas, cada una de las cuales se incorpora en la presente por referencia. Se describe la actividad farmacológica de los péptidos y, en muchos, casos le sigue un término abreviado entre paréntesis. Algunos de estos péptidos se modificaron (por ejemplo, para formar dímeros reticulados con extremo C terminal). Típicamente, las bibliotecas de péptidos se tamizaron para identificar el enlace a un receptor para una proteína farmacológicamente activa (por ejemplo, el receptor EPO). Por lo menos en una instancia (CTLA4), se tamizó la biblioteca de péptidos para identificar el enlace a un anticuerpo monoclonal.

Tabla 2 – Péptidos farmacológicamente activos

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Con enlace disulfuro intrapeptídico	Receptor de EPO	Mimético de EPO	Wrighton y otros (1996), Science 273:458-63; patente de los Estados Unidos número 5.773.569, emitida el 30 de junio de 1998 para Wrighton y otros
Dímero reticulado en el extremo C terminal	Receptor EPO	Mimético de EPO	Livnah y otros (1996), Science 273:464-71; Wrighton y otros (1997), Nature Biotechnology 15:1261-5; solicitud de patente internacional WO 96/40772, publicada el 19 de diciembre de 1996
Lineal	Receptor de EPO	Mimético de EPO	Naranda y otros (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 96:7569-74; WO 99/47151, publicada el 23 de septiembre de 1999
Lineal	c-mpl	Mimético de TPO	Cwirla y otros (1997) Science 276:1696-9; patente de los Estados Unidos número 5.869.451, emitida el 9 de febrero de 1999; patente de los Estados Unidos número 5.932.946 emitida el 3 de agosto de 1999.
Dímero reticulado en el extremo C terminal	c-Mpl	Mimético de TPO	Cwirla y otros (1997), Science 276:1696-9

[1] La proteína mencionada en esta columna se puede enlazar al péptido asociado (por ejemplo, receptor de EPO, receptor de IL-1) o imitar mediante el péptido asociado. Las referencias mencionadas para cada una explican si la molécula es enlazada por o imitada por los péptidos.

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Dímero enlazado a disulfuro		Estimulación de hematopoyesis ("mimética de G-CSF")	Paukovits y otros (1984), Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 365:303-11; Laerum y otros (1988), Exp. Hemat. 16:274-80
Dímero enlazado a alquileno		Mimético de G-CSF	Bhatnagar y otros (1996), J. Med. Chem. 39:3814-9; Cuthbertson y otros (1997), J. Med. Chem. 40:2876-82; King y otros (1991), Exp. Hematol. 19:481; King y otros (1995), Blood 86 (Suppl. 1): 309a
Lineal	Receptor de IL-1	Enfermedades inflamatorias y autoinmunes ("antagonista de IL-1" o "mimético de IL-1ra")	Patente de los Estados Unidos número 5.608.035; patente de los Estados Unidos número 5.786.331; patente de los Estados Unidos número 5.880.096; Yanofsky y otros (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93:7381-6; Akeson y otros (1996), J. Biol. Chem. 271:30517-23; Wiekzorek y otros (1997), Pol. J. Pharmacol. 49:107-17; Yanofsky (1996), PNAs, 93:7381-7386
Lineal	Facteur thymique serique (FTS)	Estimulación de linfocitos ("mimético de FTS")	Inagaki-Ohara y otros (1996), Cellular Immunol. 171:30-40; Yoshida (1984), Int. J. Immunopharmacol. 6: 141-6
Con enlace disulfuro intrapeptídico	CTLA4 Mab	Mimético de CTLA4	Fukumoto y otros (1998), Nature Biotech. 16: 267-70

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Exocíclica	Receptor de TNF-α	Antagonista de TNF-α	Takasaki y otros (1997), Nature Biotech. 15:1266-70; WO 98/53842, publicada el 3 de diciembre de 1998
Lineal	Receptor de TNF-α	Antagonista de TNF-α	Chirinos-Rojas (1998), J. Imm. 5621-5626
Con enlace disulfuro intrapeptídico	C3b	Inhibición de la activación complementaria; enfermedades autoinmunes ("antagonista de C3b")	Sahu y otros (1996), J. Immunol. 157:884-91; Morikis y otros (1998), Protein Sci. 7:619-27
Lineal	Vinculina	Procesos de adhesión celular-crecimiento celular, diferenciación, cicatrización de heridas, metástasis tumoral ("enlace de vinculina")	Adey y otros (1997), Biochem. J. 324:523-8
Lineal	Proteína de enlace a C4 (C4BP)	Antitrombótica	Linse y otros (1997), J. Biol. Chem. 272:14658-65
Lineal	Receptor de uroquinasa	Procesos asociados con interacción de uroquinasa con su receptor (por ejemplo, angiogénesis, invasión y metástasis de células tumorales); ("antagonista de UKR")	Goodson y otros (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. 91:7129-33; Solicitud Internacional WO 97/35969, publicada el 2 de octubre de 1997

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	Mdm2, Hdm2	Inhibición de la inactivación de p53 mediada por Mdm2 o hdm2; antitumoral ("antagonista de Mdm/hdm")	Picksley y otros (1994), Oncogen 9:2523-9; Bottger y otros (1997), J. Mol. Biol. 269:744-56; Bottger y otros (1996), Oncogen 13:2141-7
Lineal	p21WAF1	antitumoral imitando la actividad de p21WAF1	Ball y otros (1997), Curr. Biol. 7:71-80
Lineal	Farnesil transferasa	Anti-cáncer al prevenir la activación de oncogen ras	Gibbs y otros (1994), Cell 77:175-178
Lineal	Dominio de efector ras	Anti-cáncer al inhibir la función biológica del oncogen ras	Moodie y otros (1994), Trends Genet. 10:44-48; Rodríguez y otros (1994), Nature 370;527-532
Lineal	Dominios SH2/SH3	Anti-cáncer al inhibir el crecimiento tumoral con tirosina quinasas activadas; tratamiento de estados de enfermedad mediada por SH3 ("antagonista de SH3")	Pawson y otros (1993), Curr. Biol. 3:434-432; Yu y otros (1994), Cell 76:933-945; Rickles y otros (1994), EMBO J. 13:5598-5604; Sparks y otros (1994), J. Biol. Chem. 269:23853-6; Sparks y otros (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1540-4; patente de los Estados Unidos número 5.886.150, emitida el 23 de marzo de 1999; patente de los Estados Unidos número 5.888.763, emitida el 30 de marzo de 1999.

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	p16INK4	Anti-cáncer al imitar la actividad de p16; por ejemplo, al inhibir el complejo D-Cdk de ciclina ("mimético de p16")	Fåhraeus y otros (1996), Curr. Biol. 6:84-91
Lineal	Src, Lyn	Inhibición de la activación de célula cebada, condiciones relacionadas a IgE, hipersensibilidad tipo I ("antagonista de célula cebada")	Stauffer y otros (1997), Biochem. 36:9388-94
Lineal	Proteasa de célula cebada	Tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por liberación de triptasa-6 ("inhibidores de proteasa de célula cebada")	Solicitud Internacional WO 98/33812, publicada el 6 de agosto de 1998
Lineal	Antígeno de núcleo HBV (HBcAg)	Tratamiento de infecciones virales HBV ("anti-HBV")	Dyson & Muray (1995), Proc. Natl. Acad. Sci. 92:2194-8
Lineal	Selectinas	Adhesión de neutrófilos; enfermedades inflamatorias ("antagonista de selectina")	Martens y otros (1995), J. Biol. Chem. 270:21129-36; solicitud de patente europea EP 0 714 912, publicada el 5 de junio de 1996
Lineal, ciclizada	Calmodulina	Antagonista de calmodulina	Pierce y otros (1995), Molec. Diversity 1:259-65; Dedman y otros (1993), J. Biol. Chem. 268;23025-30; Adey & Kay (1996), Gene 169:133-4

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal, ciclizada	Integrinas	Asentamiento tumoral; tratamiento para condiciones relacionadas con eventos celulares mediados por integrina, incluso agregación de plaquetas, trombosis, cicatrización de heridas, osteoporosis, reparación tisular, angiogénesis (por ejemplo, para tratamiento de cáncer), e invasión tumoral ("enlace de integrina")	Solicitudes internacionales WO 95/14714, publicada el 1 de junio de 1995; WO 97/08203, publicada el 6 de marzo de 1997; WO 98/10795, publicada el 19 de marzo de 1998; WO 99/24462, publicada el 20 de mayo de 1999; Kraft y otros (1999), J. Biol. Chem. 274:1979-1985
Cíclica, lineal	Componentes de fibronectina y matriz extracelular de células T y macrofagos	Tratamiento de condiciones inflamatorias y autoinmunes	WO 98/09985, publicada el 12 de marzo de 1998
Lineal	Somatostatina y cortistatina	Tratamiento o prevención de tumores productores de hormona, acromegalia, gigantismo, demencia, úlcera gástrica, crecimiento tumoral, inhibición de secreción de hormona, modulación de sueño o actividad neural	Solicitud de patente europea 0 911 393, publicada el 28 de abril de 1999

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	Lipopolisacárido bacteriano	Antibiótico; choque séptico; trastornos modulables por CAP37	Patente de los Estados Unidos número 5.877.151, emitida el 2 de marzo de 1999
Lineal o cíclica, incluso aminoácidos D	Pardaxina, mellitina	Antipatogénico	WO 97/31019, publicada el 28 de agosto de 1997
Lineal, cíclica	VIP	Impotencia, trastornos neurodegenerativos	WO 97/40070, publicada el 30 de octubre de 1997
Lineal	CTLs	Cáncer	EP 0 770,624, publicada el 2 de mayo de 1997
Lineal	THF-gamma2		Burnstein (1988), Biochem. 27:4066-71
Lineal	Amilina		Cooper (1987), Proc. Natl. Acad. Sci. 84:8628-32
Lineal	Adrenomedulina		Kitamura (1993), BBRC, 192:553-60
Cíclica, lineal	VEGF	Anti-angiogénica; cáncer, artritis reumatoidea, retinopatía diabética, soriasis ("antagonista de VEGF")	Fairbrother (1998), Biochem. 37:17754-17764
Cíclica	MMP	Inflamación y trastornos autoinmunes; crecimiento tumoral ("inhibidor de MMP")	Koivunen (1999), Nature Biotech., 17:768-774
	Fragmento HGH	Tratamiento de obesidad	Patente de los Estados Unidos número 5.869.452
	Equistatina	Inhibición de agregación de plaquetas	Gan (1988), J. Biol.Chem. 263:19827-32

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	Autoanticuerpo de SLE	SLE	WO 96/30057, publicada el 3 de octubre de 1996
	GD1 alfa	Supresión de metástasis tumoral	Ishikawa y otros (1998), FEBS Lett. 441(1):20-4
	Anticuerpos de beta-2-glicoproteína-1 (ß2GP1) antifosfolípidos	Activación celular endotelial, síndrome de antifosfolípido (APS), fenómeno tromboembólico, trombocitopenia, y pérdida fetal recurrente	Blank y otros (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:5164-8
Lineal	Cadena beta de receptor de Célula T	Diabetes	WO 96/11214, publicada el 18 de abril de 1996
		Antiproliferativa, antiviral	WO 00/01402, publicada el 13 de enero de 2000
		Anti-isquémica, liberadora de la hormona de crecimiento	WO 99/62539, publicada el 9 de diciembre de 1999
		Anti-angiogénica	WO 99/61476, publicada el 2 de diciembre de 1999
Lineal		Agonista de apoptosis; tratamiento de trastornos asociados a célula T (por ejemplo, enfermedades autoinmunes, infección viral, leucemia de célula T, linfoma de célula T)	WO 99/38526, publicada el 5 de agosto de 1999

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	MHC clase II	Tratamiento de enfermedades autoinmunes	Patente de los Estados Unidos número 5.880.103, emitida el 9 de marzo de 1999
Lineal	R andrógeno, p75, MJD, DCC, huntingtina	Proapoptótica, útil en tratamiento de cáncer	WO 99/45944, publicada el 16 de septiembre de 1999
Lineal	Factor von Willebrand; Factor VIII	Inhibición de la interacción del Factor VIII; anticoagulantes	WO 97/41220, publicada el 29 de abril de 1997
Lineal	Lentivirus LLP1	Antimicrobiano	Patente de los Estados Unidos número 5.945.507, emitida el 31 de agosto de 1999
Lineal	Péptido Inductor de Sueño Sincronizado	Trastornos del sueño	Graf (1986), Péptidos 7:1165
Lineal	Proteína Reactiva C (CPR)	Inflamación y cáncer	Barna (1994), Cancer Immunol. Immunother. 38:38 (1994)
Lineal	Péptidos Activadores de Esperma	Infertilidad	Suzuki (1992), Comp. Biochem. Physilol. 102B:679
Lineal	Angiotensinas	Factores hematopoyéticos para condiciones hematocitopénicas de cáncer, SIDA, etc.	Lundergan (1999), J. Periodontal Res. 34(4):223-228
Lineal	VIH-1 gp41	Anti-SIDA	Chan (1998), Cell, 93:681-684
Lineal	PKC	Inhibición de la resorción ósea	Moonga (1998), Exp. Physiol. 83:717-725
Lineal	Defensinas (HNP - 1, -2, -3, -4)	Antimicrobiano	Harving (1994), Methods Enz. 236:160-172
Lineal	p185HER2/neu, C-erbB-2	Mimético de AHNP:antitumoral	Park (2000), Nat. Biotechnol. 18:194-198

Forma de péptido	Compañero de enlace/proteína de interés1	Actividad farmacológica	Referencia
Lineal	gp130	Antagonista de IL-6	WO 99/60013, publicada el 25 de noviembre de 1999
Lineal	Proteínas relacionadas a colágeno, otra articulación, cartílago, artritis	Enfermedades autoinmunes	WO 99/50282, publicada el 7 de octubre de 1999
Lineal	Proteína de membrana HIV-1	Tratamiento de enfermedades degenerativas neurológicas	WO 99/51254, publicada el 14 de octubre de 1999
Lineal	IL-2	Trastornos autoinmunes (por ejemplo, rechazo de injerto, artritis reumatoidea)	WO 00/04048, publicada el 27 de enero de 2000; WO 00/11028, publicada el 2 de marzo de 2000

Los péptidos identificados mediante el tamizaje de la biblioteca de péptidos han sido considerados como "conductores" en el desarrollo de agentes terapéuticos en vez de ser usados como agentes terapéuticos en sí mismos. Al igual que otras proteínas y péptidos, se eliminarán rápidamente in vivo, ya sea por filtración renal, mecanismos de depuración celular en el sistema reticuloendotelial o degradación proteolítica. (Francis (1992), Focus on Growth Factors 3:4-11). Como resultado, la técnica actualmente usa los péptidos identificados para convalidar fármacos diana o como andamiajes para diseñar compuestos orgánicos que pueden no haber sido identificados tan fácilmente o tan rápidamente a través del tamizaje de la biblioteca química. Lowman (1997), Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26:401-24; Kay y otros (1998), Drug Disc. Today 3:370-8.

Típicamente, los péptidos purificados son sólo marginalmente estables en un estado acuoso y experimentan degradación química y física, lo cual da como resultado la pérdida de actividad biológica durante el procesamiento y el almacenamiento. Adicionalmente, las composiciones de péptidos en solución acuosa experimentan hidrólisis, tal como desamidación y clivaje de enlaces de péptidos. Estos efectos representan un grave problema para los péptidos terapéuticamente activos que se pretende administrar a seres humanos dentro de un rango de dosis definido según la actividad biológica.

La administración de péptidos purificados se mantiene como una estrategia de tratamiento prometedora para muchas enfermedades que afectan a la población humana. Sin

embargo, no se profundizó el estudio de la capacidad del cuerpo peptídico terapéutico para permanecer como una composición farmacéutica estable a través del tiempo en una variedad de condiciones de almacenamiento y luego ser eficaz para pacientes in vivo. Por lo tanto, persiste una necesidad en la técnica de proporcionar cuerpos peptídicos terapéuticos en formulaciones estables que resulten útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

RESEÑA DE LA INVENCIÓN

La presente invención proporciona formulaciones útiles para la liofilización de cuerpos peptídicos terapéuticos, que dan como resultado un producto de cuerpo peptídico terapéutico altamente estable. El producto de cuerpo peptídico terapéutico estable es útil como agente terapéutico en el tratamiento de individuos que sufren trastornos o afecciones que se pueden beneficiar con la administración del cuerpo peptídico terapéutico.

En un aspecto, la invención proporciona una composición a base de cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados que comprende una solución amortiguadora, un agente de carga, un agente estabilizador y, opcionalmente un tensioactivo; donde la solución amortiguadora está conformada por un agente amortiguador de pH en un rango entre alrededor de 5 mM y 20 mM, y donde el pH está en un rango entre alrededor de 3 y 8; donde el agente de carga se encuentra en una concentración entre alrededor de 0% y 4,5% en peso/volumen; donde el agente estabilizador se encuentra en una concentración entre alrededor de 0,1% y 20% en peso/volumen; donde el tensioactivo se encuentra en una concentración entre alrededor de 0,004% y 0,4% en peso/volumen; y donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura que se presenta en la Fórmula I.

Fórmula I: [(X1)a-F1-(X2)b]-(L1)c-WSPd

donde:

F1 es un dominio Fc;

X1 se selecciona de

P1-(L2)e-

P2-(L3)f -P1-(L2)e-

P3-(L4)g-P2 -(L3)f -P1-(L2)e- y

P4-(L5)h-P3-(L4)g-P2-(L3)f-P1-(L2)e

X2 se selecciona de:

-(L2)e-P1,

-(L2)e-P1-(L3)f -P2,

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g-P3, y

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g -P3-(L5)h-P4

donde P1, P2, P3 y P4 son, cada uno en forma independiente, secuencias de péptidos farmacológicamente activos.

L1, L2, L3, L4 y L5 son, cada uno en forma independiente, enlazadores;
a, b, c, e, f, g, y h son, cada uno en forma independiente, 0 ó 1,
siempre que al menos uno de a y b sea 1;
d es 0, 1, o mayor que 1; y
WSP es un polímero hidrosoluble, cuya unión se efectúa en cualquier fracción reactiva de F1.

En otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula II

Fórmula II: [X1-F1]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido al extremo C terminal de X1, y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

Aún en otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula III

Fórmula III: [F1-X2]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de X2, y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

También en otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula IV

Fórmula IV: [F1-(L1)e-P1]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de -(L1)c-P1 y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula V

Fórmula V: [F1-(L1)e-P1-(L2)f-P2]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de -L1-P1-L2-P2 y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico es un multímero o un dímero. En otra forma de realización, se proporciona la composición mencionada, donde P1, P2, P3, y/o P4 se seleccionan independientemente de un péptido que se presenta en cualquiera de las Tablas 4-38. En una forma de realización relacionada, P1, P2, P3, y/o P4 tienen la misma secuencia de aminoácidos. En otra forma de realización, el dominio Fc se presenta en la SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, WSP es PEG. Aún en otra forma de realización, el dominio Fc se presenta en la SEQ ID NO: 1 y WSP es PEG. En otra forma de realización, el PEG tiene un peso molecular entre alrededor de 2 kDa y 100 kDa, o entre 6 kDa y 25 kDa. En otra forma de realización, la composición comprende al menos 50%, 75%, 85%, 90%, o 95% de cuerpo peptídico terapéutico PEGilado.

También en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la solución amortiguadora del pH se selecciona del grupo conformado por glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato, y aspartato. Aún en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente de carga se selecciona del grupo conformado por manitol, glicina, sacarosa, dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol.

También en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente estabilizador se selecciona del grupo conformado por sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, clorhidrato de arginina, compuestos de poli-hidroxi, incluso polisacáridos tales como dextrano, almidón, almidón de hidroxietilo, ciclodextrinas, N-metil pirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio.

También en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el tensioactivo se selecciona del grupo conformado por lauril-sulfato de sodio, dioctil-sulfosuccinato de sodio, dioctil-sulfonato de sodio, ácido quenodeoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, hidrato de colato de sodio, deoxicolato de sodio, sal sódica del ácido glicodeoxicólico, cloruro de banzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, lecitina de soya, DOPC, DMPG, DMPC, y DOPG; éster de ácidos grasos de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. También en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico está entre alrededor de 0,25 mg/mL y 250 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 4% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,004% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 6. En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es de 0,5 mg/mL. En otra forma de realización, el cuerpo peptídico terapéutico es cualquiera de SEQ ID NO: 993, SEQ ID NO: 994, SEQ ID NO: 995, SEQ ID NO: 996, SEQ ID NO: 997, SEQ ID NO: 998, SEQ ID NO: 999, SEQ ID NO: 1000, SEQ ID NO: 1001, SEQ ID NO: 1002, SEQ ID NO: 1003, SEQ ID NO: 1004, SEQ ID NO: 1005,

SEQ ID NO: 1006, SEQ ID NO: 1007, SEQ ID NO: 1008, SEQ ID NO: 1009, SEQ ID NO: 1010, SEQ ID NO: 1011, SEQ ID NO: 1012, SEQ ID NO: 1013, SEQ ID NO: 1014, SEQ ID NO: 1015, SEQ ID NO: 1016, ó SEQ ID NO: 1017.

También en otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 7; donde el agente de carga es 4% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,01% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 32. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es de 30 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 20 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 3,3% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,01% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 4. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es de 100 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 2,5% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 3,5% en peso/volumen de sacarosa. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 31. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es de 30 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la composición se selecciona del grupo formado por: a) 10 mM de histidina, a pH 4,7, 4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; b) 10 mM de histidina, a pH 5, 4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; c) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; d) 10 mM de succinato, a pH 4,5, 4% de manitol y 2% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; e) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 9% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; f) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol, 2% de sacarosa, 1% de almidón de hidroxietilo, 0,004% de polisorbato 20; g) 5 mM de glutamato, a pH 4,5, 2% de manitol, 1% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; y h) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol, 2% de trehalosa, 0,004% de polisorbato 20.

En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se indica en las Tablas 21 a 24. Aún en otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico se selecciona del grupo conformado por 1 mg/mL, 30 mg/mL, 85 mg/mL y 100 mg/mL.

La presente invención también contempla métodos para elaborar cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados de la presente invención. En una forma de realización, la invención proporciona un método para elaborar un cuerpo peptídico terapéutico liofilizado que comprende los pasos de: a) preparar una solución con una solución amortiguadora, un agente de carga, un agente estabilizador y, opcionalmente, un tensioactivo; donde la solución amortiguadora está conformada por un agente amortiguador del pH en un rango entre alrededor de 5 mM y 20 mM y donde el pH está en un rango entre alrededor de 3 y 8; donde el agente de carga está a una concentración entre alrededor de 2,5% y 4% en peso/volumen; donde el agente estabilizador está en una concentración entre alrededor de 0.1% y 5% en peso/volumen; donde el tensioactivo está en una concentración entre alrededor de 0.004% y 0.04% en peso/volumen; y b) liofilizar el cuerpo peptídico terapéutico; donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura que se presenta en la Fórmula I.

Fórmula I: [(X1)a-F1-(X2)b]-(L1)c-WSPd

donde:

F1 es un dominio Fc;

X1 se selecciona de

P1-(L2)e-

P2-(L3)f -P1-(L2)e-

P3-(L4)g-P2 -(L3)f -P1-(L2)e- y

P4-(L5)h-P3-(L4)g-P2-(L3)f-P1-(L2)e

X2 se selecciona de:

-(L2)e-P1,

-(L2)e-P1-(L3)f -P2,

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g-P3, y

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g -P3-(L5)h-P4

donde P1, P2, P3 y P4 son, cada uno en forma independiente, secuencias de péptidos farmacológicamente activos.

L1, L2, L3, L4 y L5 son, cada uno en forma independiente, enlazadores;

a, b, c, e, f, g, y h son, cada uno en forma independiente, 0 ó 1,

siempre que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1, o mayor que 1; y

WSP es un polímero hidrosoluble, cuya unión se efectúa en cualquier fracción reactiva de F1.

En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula II.

Fórmula II: [X1-F1]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido al extremo C terminal de X1, y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula III.

Fórmula III: [F1-X2]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de X2, y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula IV.

Fórmula IV: [F1-(L1)e-P1]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de -(L1)c-P1 y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde el cuerpo peptídico terapéutico comprende una estructura presentada en la Fórmula V.

Fórmula V: [F1-(L1)e-P1-(L2)f-P2]-(L1)c-WSPd

donde el dominio Fc está unido en el extremo N terminal de -L1-P1-L2-P2 y cero, uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde el cuerpo peptídico terapéutico es un multímero o un dímero. En otra forma de realización, P1, P2, P3 y/o P4 se seleccionan independientemente de un péptido que se presenta en cualquiera de las Tablas 4 a 38. En otra forma de realización, P1, P2, P3, y/o P4 tienen la misma secuencia de aminoácidos. En otra forma de realización, el dominio Fc se presenta en la SEQ ID NO: 1. En otra forma de realización, WSP es PEG. En otra forma de realización, el dominio Fc se presenta en la SEQ ID NO: 1 y WSP es PEG. En otra forma de realización, el PEG tiene un peso molecular entre alrededor de 2 kDa y 100 kDa, o entre 6 kDa y 25 kDa. En otra forma de realización, se proporciona el método antes mencionado donde la composición comprende al menos 50%, 75%, 85%, 90% ó 95% de cuerpo peptídico terapéutico PEGilado.

En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde el agente amortiguador del pH se selecciona del grupo conformado por glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato, y aspartato. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde el agente de carga se selecciona del grupo conformado por manitol, glicina, sacarosa, dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente donde el agente estabilizador se

selecciona del grupo conformado por sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, clorhidrato de arginina, compuestos de poli-hidroxi, incluso polisacáridos tales como dextrano, almidón, almidón de hidroxietilo, ciclodextrinas, N-metil pirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio.

En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde el tensioactivo se selecciona del grupo conformado por lauril-sulfato de sodio, dioctil-sulfosuccinato de sodio, dioctil-sulfonato de sodio, ácido quenodeoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, hidrato de colato de sodio, deoxicolato de sodio, sal sódica del ácido glicodeoxicólico, cloruro de banzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridio monohidrato, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, glicerol monoestearato, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, lecitina de soya, DOPC, DMPG, DMPC, y DOPG; éster de ácidos grasos de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico está entre alrededor de 0,25 mg/mL y 250 mg/mL.

En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 4% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,004% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 6. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es 0,5 mg/mL.

En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 7; donde el agente de carga es 4% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,01% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 32. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es 30 mg/mL.

En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 20 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 3,3% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 2% en peso/volumen de sacarosa; y donde el tensioactivo es 0,01% en peso/volumen de polisorbato 20. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 4. En

otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es 100 mg/mL.

En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente donde el agente amortiguador del pH es 10 mM de histidina y donde el pH es 5; donde el agente de carga es 2,5% en peso/volumen de manitol; donde el agente estabilizador es 3,5% en peso/volumen de sacarosa. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se menciona en la Tabla 31. En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde la concentración de cuerpo peptídico terapéutico es 30 mg/mL.

En otra forma de realización de la invención, se proporciona un método mencionado anteriormente donde la composición se selecciona del grupo formado por: a) 10 mM de histidina, a pH 4,7, 4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; b) 10 mM de histidina, a pH 5,4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; c) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol y 2% de sacarosa, con y sin 0,004% de polisorbato 20; d) 10 mM de succinato, a pH 4,5, 4% de manitol y 2% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; e) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 9% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; f) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol, 2% de sacarosa, 1% de almidón de hidroxietilo, 0,004% de polisorbato 20; g) 5 mM de glutamato, a pH 4,5, 2% de manitol, 1% de sacarosa, 0,004% de polisorbato 20; y h) 10 mM de glutamato, a pH 4,5, 4% de manitol, 2% de trehalosa, 0,004% de polisorbato 20.

En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde P1 comprende una secuencia que se establece en las Tablas 21 a 24. En otra forma de realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente donde la concentración del cuerpo peptídico terapéutico se selecciona del grupo conformado por 1 mg/mL, 30 mg/mL, 85 mg/mL, y 100 mg/mL.

En otra forma de realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que, antes de la liofilización, también comprende los pasos de: b) ajustar el pH de la solución a un pH entre alrededor de 4 y 8; c) preparar una solución que contiene el cuerpo peptídico terapéutico; d) realizar un intercambio de solución amortiguadora de la solución del paso (c) por la solución del paso (b); e) agregar una cantidad adecuada de un tensioactivo; y f) liofilizar la mezcla del paso (e).

En otra forma de realización, se proporciona el método mencionado anteriormente donde se proporciona un método para preparar una composición de cuerpo peptídico terapéutico reconstituido que comprende los pasos de: a) liofilizar una composición de cuerpo peptídico terapéutico mencionada anteriormente; y b) reconstituir la composición de cuerpo peptídico terapéutico liofilizada.

En otra forma de realización, se proporciona un kit para preparar una composición farmacéutica acuosa, que comprende un primer recipiente que tiene una composición liofilizada de cuerpo peptídico terapéutico anteriormente mencionada, y un segundo

recipiente que tiene un solvente fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada.

DESCRIPCIÓN DETALLADA DE LA INVENCIÓN

Definición de términos

El término "que comprende", con respecto a un compuesto de péptidos, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales en cualquiera o en ambos extremos terminales amino o carboxi de la secuencia determinada. Por supuesto, estos aminoácidos adicionales no deben interferir de manera significativa con la actividad del compuesto. Con respecto a una composición de la presente invención, el término "que comprende" significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Estos componentes adicionales no deberán interferir significativamente con la actividad de la composición.

El término "cuerpo peptídico" se refiere a una molécula que comprende péptidos fusionados, ya sea directa o indirectamente, a otras moléculas tales como un dominio Fc de un anticuerpo, donde la fracción peptídica se enlaza específicamente a una diana conveniente. El o los péptidos se pueden fusionar ya sea a una región Fc o insertar en un Fc-bucle, una molécula Fc modificada. Los Fc-bucles se describen en la solicitud de patente estadounidense número US2006/0140934, que se incorpora íntegramente a la presente por referencia. La invención incluye las moléculas que comprenden un dominio Fc modificado para comprender un péptido como una secuencia interna (preferiblemente en una región de bucle) del dominio Fc. Las moléculas peptídicas internas de Fc pueden incluir más de una secuencia peptídica en tándem en una región interna en particular, y pueden incluir otros péptidos en otras regiones internas. Si bien se ejemplifican las regiones de bucle putativas, las inserciones en cualquier otro dominio no-terminal del Fc también se consideran parte de la presente invención. El término "cuerpo peptídico" no incluye proteínas de fusión de Fc (por ejemplo, proteínas de longitud completa fusionadas a un dominio Fc).

El término "vehículo", se refiere a una molécula que impide la degradación y/o aumenta la semivida, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad o aumenta la actividad biológica de una proteína terapéutica. Los ejemplos de vehículos incluyen un dominio Fc como se describe en la patente estadounidense número 5.428.130 otorgada a Capon y otros, emitida el 27 de junio de 1995.

El término "Fc natural" hace referencia a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento que no se enlaza con el antígeno, que es producto de la digestión del anticuerpo completo, ya sea en forma monomérica o multimérica. Típicamente, un Fc natural comprende un dominio CH2 y CH3. La fuente de inmunoglobulina original del Fc natural es de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas. Un Fc natural es un polipéptido monomérico que puede estar enlazado en formas diméricas o multiméricas por asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro), asociación no-covalente o una combinación de ambas. La cantidad de enlaces disulfuro

intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc natural oscila de una a cuatro, según la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero con enlace disulfuro que es el resultado de la digestión de papaína de una IgG. Ellison y colaboradores, (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9. El término "Fc natural", tal como se lo emplea en la presente, es genérico respecto de las formas monoméricas, diméricas y multiméricas.

El término "variante de Fc" se refiere a una molécula o secuencia que es modificada a partir de un Fc natural, pero que aún comprende un sitio de enlace para el receptor de reciclaje, FcRn. En las solicitudes internacionales WO 97/34631 (publicada el 25 de septiembre de 1997) y WO 96/32478 se describen ejemplos de variantes de Fc, así como la interacción con el receptor de reciclaje, y éstas se incorporan a la presente a modo de referencia. En un aspecto, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia humanizada a partir de un Fc natural no humano. En otro aspecto, un Fc natural comprende sitios que se pueden eliminar porque aportan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención. De esta manera, el término "variante de Fc" comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos Fc naturales que afectan o participan en: (1) la formación de ligadores disulfuro; (2) la incompatibilidad con una célula hospedante seleccionada; (3) la heterogeneidad del extremo N-terminal cuando se produce la expresión en una célula hospedante seleccionada; (4) la glicosilación; (5) la interacción con un complemento; (6) el enlace con un receptor Fc que no es un receptor de reciclaje; o (7) la citotoxicidad celular dependiente del anticuerpo (ADCC). Las variantes de Fc se describen más adelante con mayor grado de detalle.

El término "dominio Fc" comprende Fc natural y moléculas y secuencias de variantes de Fc, según se definió previamente. Al igual que con las variantes de Fc y los Fc naturales, el término "dominio Fc" incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya sea digeridas a partir del anticuerpo entero o producidas por otros medios. En una forma de realización, por ejemplo, la región Fc puede ser: DKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:1).

En la técnica se conocen otras secuencias Fc cuyo uso se contempla en la invención. Por ejemplo, Fc de la IgG1 (Registro de GenBank con el número de acceso P01857), Fc de la IgG2 (Registro de GenBank con el número de acceso P01859), Fc de la IgG3 (Registro de GenBank con el número de acceso P01860), Fc de la IgG4 (Registro de GenBank con el número de acceso P01861), Fc de la IgA1 (Registro de GenBank con el número de acceso P01876), Fc de la IgA2 (Registro de GenBank con el número de acceso P01877), Fc de la IgD (Registro de GenBank con el número de acceso P01880), Fc de la IgM (Registro de GenBank con el número de acceso P01871), y Fc de la IgE (Registro de

GenBank con el número de acceso P01854), son algunas secuencias Fc adicionales cuyo uso se contempla en la presente.

Opcionalmente, una secuencia de aminoácidos del extremo N terminal se puede agregar a las secuencias anteriores (por ejemplo, cuando se expresan en bacterias).

El término "multímero" aplicado a los dominios Fc o moléculas que comprenden los dominios Fc, se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas polipeptídicas asociadas de manera covalente, no covalente o mediante interacciones tanto covalentes como no-covalentes. Las moléculas de IgG, típicamente, forman dímeros; las de IgM, pentámeros; las de IgD, dímeros; y las de IgA, monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Los multímeros pueden formarse mediante la explotación de la secuencia y la actividad resultante de la fuente de Ig natural del Fc o mediante la derivación (según se define más adelante), tal como un Fc natural.

Los términos "derivador" y "derivado" significan los procedimientos y los compuestos resultantes, donde, por ejemplo y sin limitación: (1) el compuesto tiene una parte cíclica; por ejemplo reticulación entre residuos cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto es reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo el compuesto tiene un residuo cisteinilo y, de esta manera, forma dímeros reticulados en cultivo o in vivo; (3) uno o más ligamientos peptidilo se reemplazan por un ligamiento no-peptidilo; (4) el extremo N terminal se reemplaza por -NRR1, NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR, un grupo succinimida o benciloxicarbonilo-NH- sustituido o no-sustituido, donde R y R1 y los sustituyentes del anillo son tal como se definen más adelante; (5) el extremo C terminal se reemplaza por -C(O)R2 o -NR3R4 donde R2, R3 y R4 son tal como se definen más adelante; y (6) compuestos donde las fracciones de aminoácidos individuales se modifican a través del tratamiento con agentes capaces de reaccionar con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados. Más adelante se describen otros derivados.

Como se usa en la presente, el término "péptido" se refiere a moléculas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98,99, 100 o más aminoácidos ligados por enlaces de péptidos. Los péptidos contienen típicamente conformaciones aleatorias y/o flexibles, tales como la conformación a-hélice o estructura desordenada (random coil), y carecen de conformaciones estables, tales como las observadas en proteínas/polipéptidos grandes, típicamente por vía estructuras secundarias y terciarias. En formas de realización determinadas, en la presente se contemplan numerosas escalas de tamaño de péptidos, tales como desde aproximadamente 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50; 5-90, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 5-30; 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30; 10-20, 10-20 aminoácidos de longitud y similares. En formas de realización adicionales, los péptidos utilizados en la presente tienen una longitud de no más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30, o 20 aminoácidos. Los

ejemplos de péptidos pueden ser generados mediante cualquiera de los métodos que se contemplan en la presente, tales como portados en una biblioteca de péptidos (por ejemplo, una biblioteca de exhibición en fago), generados mediante síntesis química, derivados mediante digestión de proteínas, o generados usando técnicas de ADN recombinante. Los péptidos incluyen las formas D y L, ya sea purificadas o en una mezcla de las dos formas.

Adicionalmente, las sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de la invención también se contemplan en la presente. Por "sales fisiológicamente aceptables" se entiende cualquier sal que se conozca o que se descubra en el futuro que sea aceptable desde el punto de vista farmacéutico. Algunos ejemplos específicos son los siguientes: acetato; trifluoroacetato; hidrohaluros, tales como clorhidrato y bromhidrato; sulfato; citrato; tartrato, glicolato y oxalato.

El término "seleccionado al azar", tal como se lo emplea para hacer alusión a secuencias peptídicas, se refiere a secuencias totalmente seleccionadas al azar (por ejemplo, seleccionadas por métodos de exhibición en fago) y secuencias en las cuales uno o más residuos de una molécula natural se reemplazan por un residuo de aminoácidos que no aparece en esa posición en la molécula natural. Entre los métodos de ejemplo para identificar secuencias peptídicas se incluyen exhibición en fago, exhibición en E .coli, despliegue en ribosomas, monitoreo basado en levadura, monitoreo de ARN-péptido, muestreo químico, diseño racional, análisis estructural de proteínas y demás similares.

El término "farmacológicamente activo" significa que se ha determinado que una sustancia así descripta tiene actividad que afecta un parámetro médico (por ejemplo, a título enunciativo, presión arterial, hemograma, nivel de colesterol) o estado de la enfermedad (por ejemplo, a título enunciativo, cáncer, trastornos autoinmunes). Los péptidos farmacológicamente activos comprenden péptidos agonistas o miméticos y antagonistas, según se define más adelante.

Los términos "péptido mimético" y "péptido agonista" hacen referencia a un péptido que tiene actividad biológica comparable a una proteína (por ejemplo, a título enunciativo, EPO, TPO, G-CSF y otras proteínas que se describen en la presente) que interactúa con una proteína de interés. Estos términos además incluyen péptidos que imitan indirectamente la actividad de una proteína de interés, por ejemplo, potenciando los efectos del ligando natural de la proteína de interés; véase, por ejemplo, los miméticos de péptidos de G-CSF mencionados en las Tablas 2 y 7. Como un ejemplo, el término "péptido mimético de EPO" comprende cualquier péptido que puede ser identificado o derivado como se describe en Wrighton y otros (1996), Science 273:458-63, Naranda y otros (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96:7569-74, o cualquier otra referencia en la Tabla 2 identificada por tener materia mimética de EPO. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

Como otro ejemplo, el término "péptido mimético de TPO" o "TMP" se refiere a péptidos que pueden ser identificados o derivados como se describe en Cwirla y otros (1997), Science 276:1696-9, en las patentes de los Estados Unidos números 5.869.451 y 5.932.946 y en cualquier otra referencia en la Tabla 2 identificada por tener materia mimética de TPO, así como en la solicitud internacional WO 00/24770 publicada el 4 de mayo de 2000, incorporada a la presente por referencia. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

Como otro ejemplo, el término "péptido mimético de G-CSF" se refiere a cualquier péptido que pueda ser identificado o descrito en Paukovits y otros (1984), Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 365:303-11 o cualquiera de las referencias en la Tabla 2 identificadas por tener materia mimética de G-CSF. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término "péptido mimético de CTLA4" se refiere a cualquier péptido que pueda ser identificado o derivado como se describe en Fukumoto y otros (1998), Nature Biotech. 16:267-70. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término "péptido antagonista" o "péptido inhibidor" se refiere a un péptido que bloquea o que, de alguna manera, interfiere con la actividad biológica de la proteína asociada de interés, o tiene actividad biológica comparable a un antagonista o inhibidor conocido de la proteína asociada de interés. Por lo tanto, el término "péptido antagonista de TNF" comprende péptidos que pueden ser identificados o derivados como se describe en Takasaki y otros (1997), Nature Biotech. 15:1266-70 o cualquiera de las referencias en la Tabla 2 identificadas por tener materia antagonista de TNF. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

Los términos "antagonista de IL-1" y "péptido mimético de IL-1ra" se refieren a péptidos que inhiben o disminuyen la regulación del receptor de IL-1 mediante IL-1. La activación del receptor de IL-1 resulta de la formación de un complejo entre IL-1, receptor de IL-1, y proteína accesoria del receptor de IL-1. Los péptidos antagonistas de IL-1 o miméticos de IL-1ra se enlazan a IL-1, receptor de IL-1, o proteína accesoria del receptor de IL-1 y obstruyen la formación del complejo entre dos o tres componentes del complejo. Los ejemplos de péptidos antagonistas de IL-1 o miméticos de IL-1ra pueden ser identificados o derivados como se describe en las patentes de los Estados Unidos números 5.608.035; 5.786.331; 5.880.096; o cualquiera de las referencias en la Tabla 2 identificadas por tener

materia mimética de IL-1ra o antagonista de IL-1. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término "péptido antagonista de VEGF" se refiere a péptidos que pueden ser identificados o derivados como se describe en Fairbrother (1998), Biochem. 37:17754-64, y en cualquiera de las referencias en la Tabla 2 identificadas por tener materia antagonista de VEGF. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término "péptido inhibidor de MMP" se refiere a péptidos que pueden ser identificados o derivados como se describe en Koivunen (1999), Nature Biotech. 17:768-74 y en cualquiera de las referencias en la Tabla 2 identificadas por tener materia inhibidora de MMP. Los expertos en la técnica apreciarán que cada una de estas referencias permiten seleccionar péptidos diferentes a los que eficazmente se revelan en la presente si se siguen los procedimientos revelados con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término "péptido inhibidor de miostatina" se refiere a péptidos que pueden ser identificados por su capacidad para reducir o bloquear la actividad o señalización de miostatina como se ha demostrado en ensayos in vitro, tales como, por ejemplo, el ensayo de actividad de miostatina con base de célula pMARE C2C12 o mediante pruebas de animales in vivo como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense número US20040181033A1 y la publicación de solicitud PCT número WO2004/058988. Los ejemplos de péptidos inhibidores de miostatina se presentan en las Tablas 21-24.

El término "antagonista de integrina/adhesión" se refiere a péptidos que inhiben o disminuyen la actividad de las integrinas, selectinas, moléculas de adhesión celular, los receptores de integrina, receptores de selectina o receptores de molécula de adhesión celular. Los ejemplos de antagonistas de interina/adhesión comprenden laminina, equistatina, los péptidos que se describen en las Tablas 25 a 28.

El término "inhibidor de resorción ósea" se refiere a las moléculas como se determinan mediante los ensayos de los Ejemplos 4 y 11 de la WO 97/23614, la cual se incorpora en la presente por referencia en su totalidad. Los ejemplos de inhibidores de resorción ósea incluyen anticuerpo de OPG y OPG-L, que se describen en las WO 97/23614 y WO 98/46751, respectivamente, las cuales se incorporan en la presente por referencia en su totalidad.

El término "inhibidor del factor de crecimiento nervioso" o "agonista del factor de crecimiento nervioso" se refiere a un péptido que se enlaza al factor de crecimiento nervioso (NGF, por su sigla en inglés) e inhibe su actividad o señalización. Ejemplos de péptidos de este tipo se presentan en la Tabla 29.

El término "dominio modulador de TALL-1" se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que se enlaza al TALL-1 y comprende secuencias naturales o secuencias seleccionadas en forma aleatoria. Ejemplos de dominios moduladores de TALL-1 pueden ser identificados o derivados mediante exhibición en fago u otros métodos que se mencionan en la presente. Ejemplos de péptidos de este tipo se presentan en las Tablas 30 y 31.

El término "antagonista de TALL-1" se refiere a una molécula que se enlaza a TALL-1 y aumenta o disminuye uno o más parámetros de ensayo opuestos al efecto en dichos parámetros mediante TALL-1 natural de longitud completa. Dicha actividad se puede determinar, por ejemplo, mediante ensayos tales como los que se describen en la subsección titulada "Actividad biológica de AGP-3" en la sección Materiales y Métodos de la solicitud de patente titulada, "Proteínas relacionadas a TNF", WO 00/47740, publicada el 17 de agosto de 2000.

El término "péptido antagonista de Ang2" se refiere a péptidos que pueden ser identificados o derivados por tener características antagonistas de Ang-2. Ejemplos de péptidos de este tipo se presentan en las Tablas 32 a 38.

El término "WSP" se refiere a un polímero hidrosoluble que impide que un péptido, proteína u otro compuesto al cual está unido, se precipite en un entorno acuoso, por ejemplo, mediante un entorno fisiológico. A continuación se brinda una descripción más detallada de varias formas de realización de WSP contempladas por la invención.

Liofilización y administración

Los cuerpos peptídicos terapéuticos son útiles en formulaciones farmacéuticas a fin de tratar enfermedades humanas como se describe en la presente. En una forma de realización, las composiciones de cuerpos peptídicos terapéuticos se liofilizan. La liofilización se lleva a cabo con el uso de técnicas que son frecuentes en la técnica y deben optimizarse para que se pueda elaborar la composición [Tang y colaboradores, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang y colaboradores, Pharm Res. 13:243-9 (1996)]. Un ciclo de liofilización, en un aspecto, se compone de tres etapas: congelamiento, secado primario y secado secundario [A. P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)]. En el paso de congelamiento, la solución se enfría para iniciar la formación de hielo. Del mismo modo, esta etapa induce la cristalización del agente de carga. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se lleva a cabo por la reducción de la presión de la cámara por debajo de la presión del vapor del hielo, para lo cual se utiliza vacío y se introduce calor para promover la sublimación. Finalmente, el agua adsorbida o ligada se elimina en la etapa de secado secundario bajo presión reducida de la cámara y a una elevada temperatura. El procedimiento produce un material conocido como torta liofilizada. Posteriormente, la torta puede ser reconstituida ya sea con agua esterilizada o diluyente adecuado para inyección.

El ciclo de liofilización no sólo determina el estado físico definitivo de los excipientes, sino que también afecta otros parámetros tales como el tiempo de reconstitución, aspecto, estabilidad y contenido final de humedad. La estructura de la composición en el estado congelado continúa a través de varias transiciones (por ejemplo, transiciones vítreas, humectaciones y cristalizaciones), que se producen a temperaturas específicas y se pueden utilizar para comprender y optimizar el procedimiento de liofilización. La temperatura de transición vítrea (Tg y/o Tg') puede aportar información sobre el estado físico de un soluto y puede determinarse a través de la calorimetría diferencial de barrido [DSC, por sus siglas en inglés]. Tg y Tg' son parámetros importantes que se deben tomar en cuenta al diseñar el ciclo de liofilización. Por ejemplo, Tg' es importante para el secado primario. Sumado a ello, en el estado seco, la temperatura de transición vítrea aporta información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

Excipientes en general

Los excipientes son aditivos que están incluidos en una formulación debido a que imparten o mejoran la estabilidad, suministro y capacidad de fabricación de un fármaco. Independientemente del motivo para su inclusión, los excipientes son un componente integral de un fármaco y, por lo tanto, deben ser seguros y bien tolerados por los pacientes. Para los fármacos a base de proteínas, la selección de excipientes es particularmente importante debido a que estos pueden afectar tanto la eficacia como la inmunogenicidad del fármaco. Por consiguiente, las formulaciones a base de proteínas deben ser desarrolladas con la selección adecuada de excipientes que brinden la estabilidad, seguridad y posibilidad de comercialización adecuadas.

Una formulación liofilizada, generalmente, está conformada por una solución amortiguadora, un agente de carga y un estabilizador. La utilidad de un tensioactivo se puede evaluar y seleccionar en casos en donde la agregación durante el paso de liofilización o durante la reconstitución sea importante. Una solución amortiguadora adecuada se incluye para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización. Una comparación de los componentes de excipientes en formulaciones líquidas y de proteínas liofilizadas se proporciona en la Tabla A.

Tabla A: Componentes de excipientes de formulaciones liofilizadas a base de proteínas

Componente del excipiente	Función en formulación liofilizada
Solución amortiguadora	o Mantener el pH de la formulación durante la liofilización y tras la reconstitución
Agente de tonicidad/estabilizador	o Los estabilizadores incluyen crio y lioprotectores o Los ejemplos incluyen Polioles, azúcares y polímeros o Los crioprotectores protegen a las

Componente del excipiente	Función en formulación liofilizada
	proteínas de tensiones de congelamiento o Los lioprotectores estabilizan a las proteínas en el estado secado por congelamiento
Agente de carga	o Usado para mejorar la elegancia del producto y para prevenir la fractura o Proporciona resistencia estructural a la liotorta o Los ejemplos incluyen manitol y glicina
Tensioactivo	o Empleado si la agregación durante el proceso de liofilización es importante o Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución o Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidante	o Generalmente no empleado, las reacciones moleculares en la liotorta se retrasan en gran medida
Iones de metal/agente quelante	o Puede ser incluido si un ión de metal específico es incluido sólo como un co-factor o donde el metal se requiere para la actividad de proteasa o Los agentes quelantes generalmente no se necesitan en las lio formulaciones
Preservante	o Sólo para formulaciones con dosis múltiples o Proporciona protección contra crecimiento microbiano en la formulación o Generalmente se incluye en el diluyente de reconstitución (por ejemplo, bWFI)

El principal desafío al desarrollar formulaciones para proteínas terapéuticas es estabilizar el producto contra los rigores de fabricación, embarque y almacenamiento. El rol de los excipientes de la formulación es proporcionar estabilización contra estos rigores. También se pueden emplear excipientes para reducir la viscosidad de formulaciones a base de proteínas de alta concentración, a fin de permitir su suministro y mejorar la conveniencia del paciente. En general, los excipientes pueden clasificarse sobre la base de los mecanismos a través de los cuales estabilizan las proteínas contra varias tensiones químicas y físicas. Algunos excipientes se usan para aliviar los efectos de una tensión

específica o para regular una susceptibilidad particular de una proteína específica. Otros excipientes tienen efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de proteínas. Los excipientes que se describen en la presente se organizan ya sea por su tipo químico o su rol funcional en las formulaciones. Cuando se trata cada tipo de excipiente, se proporcionan breves descripciones de los modos de estabilización.

Teniendo en cuenta las enseñanzas y guía proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o rango de excipiente puede incluirse para obtener una formulación biofarmacéutica de la invención, que promueva la retención en condiciones de estabilidad del producto biofarmacéutico. Por ejemplo, la cantidad y tipo de sal que se debe incluir en una formulación biofarmacéutica de la invención puede seleccionarse según la osmolaridad conveniente (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, al igual que las cantidades y osmolaridad de otros componentes que se habrán de incluir en la formulación. Igualmente, a modo de ejemplo con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de dicho excipiente dependerá de su osmolaridad.

A modo de ejemplo, la inclusión de aproximadamente 5% de sorbitol puede alcanzar la isotonicidad, mientras que se necesita aproximadamente el 9% de excipiente sacarosa para alcanzar la isotonicidad. La selección de la cantidad o rango de concentraciones de uno o más excipientes que se pueden incluir dentro de una formulación biofarmacéutica de la invención se citó a modo de ejemplo previamente en relación a las sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que las consideraciones descriptas en la presente y que se ejemplifican más adelante por referencia a determinados excipientes son igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de excipientes incluso, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizantes, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

Además, cuando se indica un excipiente particular en una formulación, por ejemplo, mediante el porcentaje (%) en peso/volumen, los expertos en la técnica podrán reconocer que la concentración molar equivalente de ese excipiente también se contempla.

Por supuesto, un experto en la técnica podrá reconocer que las concentraciones de los excipientes mencionados anteriormente comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A manera de ejemplo, la concentración de un agente de carga se puede disminuir cuando, por ejemplo, existe una alta concentración de proteína/péptido o cuando, por ejemplo, existe una alta concentración de agente estabilizador. Adicionalmente, un experto en la técnica podrá reconocer que, con la finalidad de mantener la isotonicidad de una formulación particular en la cual no existe un agente de carga, la concentración de un agente estabilizador se podrá ajustar respectivamente (es decir, se usaría una cantidad "tonificante" del estabilizador). Otros excipientes son conocidos en la técnica y pueden encontrarse en Powell y otros, Compendium of

Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311.

Soluciones amortiguadoras

En general, se observó que la estabilidad de un fármaco a base de proteínas es máxima en un rango de pH estrecho. Este rango de pH de estabilidad óptima debe ser identificado en las etapas preliminares, durante los estudios de pre-formulación. Varios enfoques, tales como estudios de estabilidad acelerada y estudios de análisis calorimétrico, han demostrado ser útiles en este esfuerzo (Remmele R.L. Jr., y otros, Biochemistry, 38(16):5241-7 (1999)). Una vez que se finaliza una formulación, el producto farmacéutico debe ser fabricado y mantenido dentro de una especificación predefinida durante su vida en almacenamiento. Por lo tanto, los agentes amortiguadores casi siempre son empleados para controlar el pH en la formulación.

De manera rutinaria, se emplean ácidos orgánicos, fosfatos y Tris como amortiguadores en formulaciones a base de proteínas (Tabla B). La capacidad amortiguadora de las especies amortiguadoras es máxima a un pH igual al pKa, y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye, alejándose de este valor. Existe noventa por ciento de capacidad amortiguadora dentro de una unidad de pH de su pKa. La capacidad amortiguadora también aumenta proporcionalmente con el aumento de la concentración de la solución amortiguadora.

Es preciso considerar varios factores cuando se elige una solución amortiguadora. En primer lugar, la especie de la solución amortiguadora y su concentración necesitan ser definidas en base a su pKa y el pH de la formulación conveniente. Igualmente importante es asegurar que la solución amortiguadora sea compatible con el fármaco a base de proteína, otros excipientes de formulación, y no catalice ninguna reacción de degradación. Recientemente, los amortiguadores de carboxilato polianiónico -tales como citrato y succinato- han demostrado que forman aductos covalentes con los residuos de cadena lateral de las proteínas. Un tercer aspecto importante que se debe considerar es la sensación de escozor e irritación que puede inducir la solución amortiguadora. Por ejemplo, el citrato es conocido por producir escozor luego de su inyección (Laursen T., y otros, Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2):218-21 (2006)). El potencial de escozor e irritación es mayor en fármacos que son administrados por vía subcutánea o intramuscular, donde la solución del fármaco permanece en el sitio por un periodo de tiempo relativamente más prolongado que cuando se administra mediante la vía intravenosa, donde la formulación se diluye rápidamente en la sangre luego de su administración. Para las formulaciones que se administran mediante infusión IV directa, se debe controlar la cantidad total de solución amortiguadora (y cualquier otro componente de formulación). Se debe tener especial cuidado con los iones de potasio administrados en forma de la solución amortiguadora de fosfato de potasio, lo cual puede inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodríguez JC, y otros, Am. Fam. Physician., 73(2):283-90 (2006)).

Los amortiguadores para formulaciones liofilizadas necesitan consideración adicional. Algunas sustancias amortiguadoras, como fosfato de sodio, se pueden cristalizar fuera de la fase amorfa de la proteína durante el congelamiento, lo cual produce grandes cambios en el pH. Otras sustancias amortiguadoras comunes, tales como acetato e imidazol, deben ser evitados debido a que estos se pueden sublimizar o evaporar durante el proceso de liofilización, cambiando así el pH de la formulación durante la liofilización o después de la reconstitución.

Tabla B: Agentes amortiguadores comúnmente usados y sus valores pKa

Amortiguador	pKa	Ejemplo de producto farmacéutico
Acetato	4,8	Neupogen, Neulasta
Succinato	pKa1 = 4,8; pKa2 = 5,5	Actimmune
Citrato	pKa1 = 3,1; pKa2 = 4,8 pKa3 = 6,4	Humira
Histidina (imidazol)	6	Xolair
Fosfato	pKa1 = 2,15; pKa2 = 7,2 pKa3 = 12,3	Enbrel (formulación líquida)
Tris	8,1	Leukine

El sistema amortiguador presente en las composiciones es seleccionada de manera tal que sea fisiológicamente compatible y pueda mantener un pH conveniente en la solución reconstituida, así como en la solución antes de la liofilización. En una forma de realización, el pH de la solución antes de liofilización es entre pH 2 y pH 12. Por ejemplo, en una forma de realización, el pH de la solución antes de liofilización es 2; 2,3; 2,5; 2,7; 3; 3,3; 3,5; 3,7; 4; 4,3; 4,5; 4,7; 5; 5,3; 5,5; 5,7; 6; 6,3; 6,5; 6,7; 7; 7,3; 7,5; 7,7; 8; 8,3; 8,5; 8,7; 9; 9,3; 9,5; 9,7; 10; 10,3; 10,5; 10,7; 11; 11,3; 11,5; 11,7; ó 12. En una forma de realización, el pH en la solución reconstituida es entre alrededor de 4,5 y 9. En otra forma de realización, el pH en la solución reconstituida es 4,5; 4,7; 5; 5,3; 5,5; 5,7; 6; 6,3; 6,5; 6,7; 7; 7,3; 7,5; 7,7; 8; 8,3; 8,5; 8,7; ó 9.

En una forma de realización, el agente amortiguador del pH usado en la formulación es un aminoácido o una mezcla de aminoácidos. En un aspecto, el agente amortiguador del pH es histidina o una mezcla de aminoácidos, uno de los cuales es histidina.

El compuesto amortiguador de pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación en un nivel predeterminado. En una forma de realización, cuando el agente amortiguador del pH es un aminoácido, la concentración del aminoácido es entre alrededor de 0,1 mM y 1000 mM (1 M). En una forma de realización, el agente amortiguador del pH es al menos 0,1; 0,5; 0,7; 0,8; 0,9; 1; 1,2; 1,5; 1,7; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80; 90; 100; 200;

500; 700 ó 900 mM. En otra forma de realización; la concentración del agente amortiguador del pH es entre 1; 1,2; 1,5; 1,7; 2; 3; 4; 5; 6; 7; 8; 9; 10; 11; 12; 13; 14; 15; 16; 17; 18; 19; 20; 30; 40; 50; 60; 70; 80 ó 90 mM y 100 mM. En otra forma de realización, la concentración del agente amortiguador del pH es entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 ó 40 mM y 50 mM. En otra forma de realización, la concentración del agente amortiguador del pH es 10 mM.

Otros ejemplos de agentes amortiguadores de pH usados para amortiguar la formulación como se establece en la presente incluyen, sin sentido limitativo, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato y aspartato.

Estabilizadores y agentes de carga

Los agentes de carga resultan de utilidad en formulaciones liofilizadas, por ejemplo, para mejorar la elegancia del producto y evitar la ruptura. Las condiciones en la formulación generalmente están designadas de manera que el agente de carga se cristaliza fuera de la fase amorfa congelada (ya sea durante el congelamiento o recocido sobre el Tg') proporcionando la estructura de torta y volumen. El manitol y la glicina son ejemplos de agentes volumétricos comúnmente usados.

Los estabilizadores incluyen una clase de compuestos que pueden servir como crioprotectores, lioprotectores y agentes formadores de vidrio. Los crioprotectores actúan para estabilizar las proteínas durante congelamiento o en el estado congelado a bajas temperaturas (P. Cameron, ed., Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice, Interpharm Press, Inc., Búffalo Grove, IL, (1997)). Los lioprotectores estabilizan las proteínas en forma de dosificación sólida secada por congelamiento porque preservan las propiedades similares a la conformación natural de la proteína durante las etapas de deshidratación del secado por congelamiento. Las características de estado vidrioso han sido clasificadas como "fuertes" o "frágiles", según sus propiedades de relajación como una función de la temperatura. Es importante que los crioprotectores, lioprotectores y agentes formadores de vidrio permanezcan en la misma fase con la proteína a fin de impartir estabilidad. Los azúcares, polímeros y polioles se encuadran dentro de esta categoría y, a veces, pueden cumplir los tres roles.

Los polioles comprenden una clase de excipientes que incluye azúcares (por ejemplo, manitol, sacarosa, sorbitol), y otros alcoholes polihídricos (por ejemplo, glicerol y propilenglicol). El polímero polietilenglicol (PEG) está incluido en esta categoría. Los polioles se usan comúnmente como excipientes estabilizadores y/o agentes de isotonicidad, tanto en formulaciones líquidas como en formulaciones a base de proteínas parenterales liofilizadas. Con respecto a la serie de Hofmeister, los polioles son cosmotrópicos y, preferentemente, se excluyen de la superficie de la proteína. Los polioles pueden proteger a las proteínas tanto de vías de degradación físicas como químicas. Los co-solventes preferentemente excluidos aumentan la tensión de superficie eficaz del solvente en la interfase de proteína, mediante lo cual las conformaciones de

proteínas más energéticamente favorables son aquéllas con áreas de superficie más pequeñas.

El manitol es un agente volumétrico popular en formulaciones liofilizadas debido a que se cristaliza fuera de la fase de proteína amorfa durante el secado por congelamiento, brindando estabilidad estructural a la torta (por ejemplo, Leukine®, Enbrel® - Lyo, Betaseron®). Generalmente se usa en combinación con un crio y/o lioprotector, tal como la sacarosa. Debido a la propensión del manitol a cristalizarse bajo condiciones de congelamiento, el sorbitol y la sacarosa son los agentes de tonicidad/estabilizadores recomendados en formulaciones líquidas para proteger el producto contra los rigores de congelación-descongelación encontrados durante el transporte o cuando se congela el material volumétrico antes de su fabricación. El sorbitol y la sacarosa son mucho más resistentes a la cristalización y, por lo tanto, menos probables de separarse en fases de la proteína. Es interesante observar que mientras que se ha usado el manitol en cantidades tonificadoras en varias formulaciones líquidas comercializadas, tales como Actimmune®, Forteo®, y Rebif®, las etiquetas del producto de estos fármacos contienen una advertencia de "No congelar". Se deberá evitar el uso de azúcares reductores (que contienen grupos libres de aldehído y cetona), tales como glucosa y lactosa, debido a que éstos pueden reaccionar y glicosilar los residuos de lisina y arginina en la superficie de proteínas vía la reacción de Maillard de aldehídos y aminas primarias (Chevalier F., y otros: Nahrung, 46(2);58-63 (2002); Humeny A., y otros: J. Agric. Food Chem. 50(7):2153-60 (2002)). La sacarosa puede hidrolizarse a fructosa y glucosa bajo condiciones ácidas (Kautz C. F. y Robinson A. L., JACS, 50(4):1022-30 (1928)) y, por consiguiente, pueden producir una forma enzimática de glicosilación.

El polímero polietilenglicol (PEG) podría estabilizar proteínas mediante dos mecanismos dependientes de temperatura. A menores temperaturas, preferentemente es excluido de la superficie de la proteína, pero se ha demostrado que interactúa con la forma no plegada de la proteína a mayor temperatura dado su naturaleza anfipática (Lee L. L, y Lee J. C., Biochemistry, 26(24);7813-9 (1987)). Por lo tanto, a menores temperaturas puede proteger a las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial, pero a mayores temperaturas posiblemente reduce el número de colisiones productivas entre moléculas no plegadas. El PEG también es un crioprotector y ha sido empleado en Recombinate®, una formulación liofilizada del factor antihemofílico recombinante, que utiliza PEG 3350 a una concentración de 1,5 mg/mL. Los PEG líquidos de bajo peso molecular (PEG 300 – 600) pueden estar contaminados con peróxidos y ocasionar la oxidación de la proteína. Si se usa, el contenido de peróxido en la materia prima se deberá minimizar y controlar durante su vida en almacenamiento. Lo mismo es aplicable para los polisorbatos.

En una forma de realización particular de las presentes composiciones, un estabilizador (o una combinación de estabilizadores) se agrega a la formulación de liofilización para prevenir o reducir la agregación inducida por liofilización o inducida por almacenamiento y

la degradación química. Una solución nebulosa o turbia cuando se produce la reconstitución, indica que la proteína se precipita. El término "estabilizador" significa un excipiente que tiene la capacidad de prevenir la agregación u otra degradación física, así como la degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.), en un estado acuoso y sólido. Los estabilizadores que se emplean convencionalmente en composiciones farmacéuticas incluyen, sin sentido limitativo, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, clorhidrato de arginina, compuestos poli-hidroxi, incluso polisacáridos tales como dextrano, almidón, almidón de hidroxietilo, ciclodextrinas, N-metil pirrolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio. [Carpenter y otros, Develop. Biol. Standard 74:225, (1991)]. En una forma de realización, el estabilizador está incorporado en una concentración entre alrededor de 0% y 40% en peso/volumen. En otra forma de realización, el estabilizador está incorporado en una concentración de al menos 0,5, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, ó 40% en peso/volumen. En otra forma de realización, el estabilizador está incorporado en una concentración de alrededor de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9% y 10% en peso/volumen. En otra forma de realización, el estabilizador está incorporado en una concentración de alrededor de 2% y 4% en peso/volumen. En otra forma de realización, el estabilizador está incorporado en una concentración de alrededor 2% en peso/volumen. Si se desea, las composiciones liofilizadas también incluyen cantidades adecuadas de agentes de carga y reguladores de la osmolaridad que son apropiados para formar una "torta" liofilizada. Los agentes de carga pueden ser cristalinos (por ejemplo, manitol o glicina) o amorfos (por ejemplo, sacarosa, polímeros, tales como dextrano, polivinilpirrolidona y carboximetilcelulosa). Otros ejemplos de agentes volumétricos incluyen lactosa, sorbitol, trehalosa, o xilitol. En una forma de realización, el agente de carga es manitol. En otra forma de realización, el agente de carga está incorporado en una concentración de alrededor 0% y 10% en peso/volumen. En otra forma de realización, el agente de carga está incorporado en una concentración al menos de 0,2; 0,5; 0,7; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5; 6; 6,5; 7; 7,5; 8; 8,5; 9 ó 9,5% en peso/volumen. En otra forma de realización, en una concentración entre alrededor de 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4; 4,5% a 5% en peso/volumen, para producir una torta que sea farmacéutica y mecánicamente estable y elegante. En otra forma de realización, la concentración de manitol asciende al 4% en peso/volumen.

Tensioactivos

Las moléculas de proteínas tienen una alta propensión a interactuar con superficies, haciéndolas susceptibles a adsorción y desnaturalización a interfases aire-líquido, vial-líquido, y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta vía de degradación es inversamente dependiente de la concentración de proteína y puede resultar en la formación de agregados de proteína -solubles e insolubles- o bien en la pérdida de proteína de la solución vía la adsorción a las superficies. Además de la

adsorción a la superficie del recipiente, la degradación inducida por la superficie es exacerbada con agitación física, como se podría experimentar durante el despacho y la manipulación del producto.

Los tensioactivos son usados generalmente en formulaciones a base de proteínas para prevenir la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas amfipáticas con la capacidad de dejar fuera de competencia a las proteínas para posiciones interfaciales. Las porciones hidrófobas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones interfaciales (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las porciones hidrófilas de las moléculas permanecen orientadas hacia el grueso del solvente. A concentraciones suficientes (típicamente alrededor de la concentración micelar crítica del detergente), una capa de superficie de las moléculas del tensioactivo sirve para evitar que las moléculas de proteína se adsorban en la interfase. Con ello, se minimiza la degradación inducida por superficie. Los tensioactivos usados más comúnmente son ésteres de ácidos grasos de sorbitán polietoxilado, es decir, polisorbato 20 y polisorbato 80 (por ejemplo, Avonex®, Neupogen®, Neulasta®). Ambos difieren sólo en la longitud de la cadena alifática que imparte carácter hidrófobo a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. Por consiguiente, el polisorbato-80 es más activo en la superficie y tiene una concentración micelar menos crítica que el polisorbato 20. El tensioactivo poloxámero 188 también ha sido usado en varios productos líquidos comerciales, tales como Gonal-F®, Norditropin, y Ovidrel®.

Los detergentes también pueden afectar la estabilidad de conformación termodinámica de las proteínas. Aquí nuevamente, los efectos de un excipiente dado serán específicos de la proteína. Por ejemplo, se ha mostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de detergente de proteínas se puede racionalizar en términos de colas hidrófobas de las moléculas de detergente que se pueden comprometer en enlace específico con estados de proteína parcial o completamente no-plegados. Estos tipos de interacciones podrían originar un cambio en el equilibrio de conformación hacia los estados de proteína más expandidos (es decir, aumentando la exposición de porciones hidrófobas de la molécula de proteína en complemento para el enlace de polisorbato). Alternativamente, si el estado natural de la proteína muestra ciertas superficies hidrófobas, el detergente que se enlaza al estado natural puede estabilizar dicha conformación.

Otro aspecto de lod polisorbatos es que estos son inherentemente susceptibles a la degradación oxidativa. A menudo, como materia prima, éstos contienen suficientes cantidades de peróxidos para producir la oxidación de las cadenas laterales con residuo de proteína, especialmente metionina. El potencial para el daño oxidativo originado por la adición del estabilizador enfatiza el punto en el cual las concentraciones menos eficaces de excipientes se deben usar en las formulaciones. Para los tensioactivos, la concentración eficaz para una proteína determinada dependerá del mecanismo de estabilización. Se ha postulado que si el mecanismo de estabilización del tensioactivo

está relacionado para prevenir la desnaturalización de la superficie, la concentración eficaz estará alrededor de la concentración micelar crítica del detergente. De manera contraria, si el mecanismo de estabilización está asociado con interacciones de proteína-detergente específicas, la concentración de tensioactivo eficaz estará relacionada con la concentración de proteína y la estoiquiometría de la interacción (Randolph T.W., y otros, Pharm. Biotechnol., 13:159-75 (2002)).

También se pueden agregar tensioactivos en cantidades adecuadas para prevenir el fenómeno de adhesión relacionado con la superficie durante el congelamiento y secado [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85;1325, (1996)]. Los ejemplos de tensioactivos incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos, no-iónicos, zwiteriónicos y anfóteros, incluso los tensioactivos derivados de aminoácidos naturales. Los tensioactivos aniónicos incluyen, sin sentido limitativo, lauril-sulfato de sodio, dioctil-sulfosuccinato de sodio y dioctil-sulfonato de sodio, ácido quenodeoxicólico, sal sódica de N-lauroilsarcosina, dodecil sulfato de litio, sal sódica del ácido 1-octanosulfónico, hidrato de colato de sodio, deoxicolato de sodio y sal sódica del ácido glicodeoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, sin sentido limitativo, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos zwiteriónicos incluyen, sin sentido limitativo, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, a título enunciativo, digitonina, Tritón X-100, Tritón X-114, TWEEN-20 y TWEEN-80. En otra forma de realización, los tensioactivos incluyen lauromacrogol 400, polioxil 40 estearato, aceite de ricino hidrogenado de polioxietileno 10, 40, 50 y 60, glicerol monoestearato, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soya y otros fosfolípidos tales como DOPC, DMPG, DMPC, y DOPG; éster de ácidos grasos de sacarosa, metil celulosa y carboximetil celulosa. También se proporcionan las composiciones que comprenden estos tensioactivos, ya sea individualmente o como una mezcla en diferentes proporciones. En una forma de realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración entre alrededor de 0% y 5% en peso/volumen. En otra forma de realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración de, al menos, 0,001; 0,002; 0,005; 0,007; 0,01; 0,05; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5; 0,6; 0,7; 0,7 (sic); 0,8; 0,9; 1; 1,5; 2; 2,5; 3; 3,5; 4 ó 4,5% en peso por volumen. En otra forma de realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración entre alrededor de 0,001% y 0,5% en peso/volumen. En otra forma de realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración entre alrededor de 0,004; 0,005; 0,007; 0,01; 0,05 ó 0,1% en peso/volumen a 2% en peso/volumen. En otra forma de realización, el tensioactivo se incorpora en una concentración entre alrededor de 0,01% y 0,1% en peso/volumen.

Sales

A menudo se agregan sales para aumentar la resistencia iónica de la formulación, lo cual puede ser importante a efectos de la solubilidad, estabilidad física e isotonicidad de la proteína. Las sales pueden afectar la estabilidad física de las proteínas en una variedad de formas. Los iones pueden estabilizar el estado natural de las proteínas al enlazarse a

residuos cargados en la superficie de la proteína. Alternativamente, estas pueden estabilizar el estado desnaturalizado al enlazarse a los grupos péptidos a lo largo del esqueleto de la proteína (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación natural de la proteína protegiendo interacciones electrostáticas repulsivas entre residuos dentro de una molécula de la proteína. Los electrolitos en las formulaciones de proteína también pueden proteger las interacciones electrostáticas atractivas entre moléculas de la proteína que pueden producir la agregación e insolubilidad de la proteína.

El efecto de la sal en la estabilidad y solubilidad de proteínas varía significativamente con las características de las especies iónicas. La serie de Hofmeister se originó en la década de 1880 como una forma para categorizar los electrolitos en base a su capacidad para precipitar proteínas (Cacace M. G., y otros, Quarterly Reviews of Biophysics, 30(3):241-277 (1997)). En este informe, la serie de Hofmeister se usa para ilustrar una escala de efectos de estabilización de proteínas mediante co-solutos iónicos y no iónicos. En la Tabla C, los co-solutos se ordenan con respecto a sus efectos generales en proteínas en estado de solución, desde estabilizadores (cosmotrópicos) hasta desestabilizadores (caotrópicos). En general, las diferencias en efectos a través de los aniones son mucho mayores que las que se observa para los cationes, y, para ambos tipos, los efectos son más evidentes a mayores concentraciones de lo que son aceptables en formulaciones parenterales. Altas concentraciones de cosmotropos (por ejemplo, > sulfato de amonio 1 molar) se usan comúnmente para precipitar proteínas de solución mediante un proceso denominado "disminución de la solubilidad de las proteínas al añadir sal", donde el cosmotropo preferentemente es excluido de la superficie de la proteína reduciendo la solubilidad de la proteína en su conformación natural (plegada). La eliminación o dilución de la sal regresará la proteína a la solución. El término "aumento de la solubilidad de las proteínas al ir añadiendo sal" se refiere al uso de iones desestabilizadores (por ejemplo, como guanidina y cloruro) que aumentan la solubilidad de proteínas mediante solvatización de los enlaces de péptido al esqueleto de la proteína. Las mayores concentraciones del caotropo favorecerá la conformación de estado desnaturalizado (no plegado) de la proteína a medida que la solubilidad de la cadena del péptido aumenta. La eficacia relativa de iones para "aumento de sal" y "disminución de sal" define su posición en la serie de Hofmeister.

Con el fin de mantener isotonicidad en una formulación parenteral, las concentraciones de sal generalmente se limitan a menos de 150 mM para combinaciones de iones monovalentes. En este rango de concentración, el mecanismo de estabilización de sal probablemente se debe al análisis de fuerzas intramoleculares repulsivas electrostáticas o fuerzas intermoleculares atractivas (análisis Debye-Huckel). De manera interesante, las sales caotrópicas han demostrado ser más eficaces para estabilizar la estructura de la proteína que las concentraciones similares de cosmotropos mediante este mecanismo. Se considera que los aniones caotrópicos se enlazan de manera más fuerte que los iones cosmotrópicos. Con respecto a la degradación de proteína covalente, se esperan efectos

diferenciales de fuerza iónica en este mecanismo a través de la teoría de Debye-Huckel. Por consiguiente, los informes publicados sobre la estabilización de proteínas mediante cloruro de sodio están acompañados por aquellos donde el cloruro de sodio aceleró la degradación covalente. Los mecanismos mediante los cuales las sales afectan la estabilidad de la proteína son específicos de proteína y pueden variar significativamente como una función del pH de la solución. Un ejemplo donde un excipiente puede ser útil para permitir el suministro de un fármaco a base de proteína es aquel de algunas formulaciones de anticuerpos de alta concentración. Recientemente, se ha demostrado que las sales son eficaces para reducir la viscosidad de dichas formulaciones (Liu J., y otros, J. Pharm Sci., 94(9):1928-40 (2005); Erratum en: J Pharm Sci., 95(1):234-5. (2006)).

Tabla C: La serie de sales de Hofmeister

Cosoluto			Escalas de estabilización	
Anión	Catión	Otros		
F-	(CH3)4N+	Glicerol/ Sorbitol	Estabilizante (disminución de sal)	Cosmotrópico
PO4-	(CH3)2NH+	Sacarosa/ Trehalosa		
SO4-	NH4+	TMAO		
CHCOO-	K+			
Cl-	Na+			
Br-	Cs+			
I-	Li+			
	Mg2+	Guanidina		
	Ca2+	Arginina		
	Ba2+	Urea	Desestabilizante (aumento de sal)	Caotrópico

Aminoácidos

Los aminoácidos han encontrado uso versátil en formulaciones a base de proteínas como amortiguadores, agentes volumétricos, estabilizadores y antioxidantes. La histidina y el ácido glutámico se emplean para amortiguar formulaciones a base de proteínas en el rango de pH de 5,5 – 6,5 y 4 – 5,5, respectivamente. El grupo imidazol de histidina tiene un pKa = 6 y el grupo carboxilo de cadena lateral de ácido glutámico tiene un pKa de 4,3 lo cual los hace adecuados para su amortiguación en sus rangos de pH respectivos. El acetato, la solución amortiguadora más comúnmente empleada en el rango de pH ácido de 4,0 – 5,5, se sublima durante la liofilización y, por lo tanto, no se debe usar en formulaciones secadas por congelamiento. El ácido glutámico es particularmente útil en

dichos casos (por ejemplo, Stemgen®). La histidina se encuentra comúnmente en formulaciones a base de proteínas comercializadas (por ejemplo, Xolair®, Herceptin®, Recombinate®). Proporciona una buena alternativa para citrato, una solución amortiguadora conocida por ser punzante tras la inyección. De manera interesante, también se ha reportado que la histidina tiene un efecto estabilizador en ABX-IL8 (un anticuerpo de IgG2) con respecto a la agregación cuando se usa en altas concentraciones, tanto en presentaciones líquidas como liofilizadas (Chen B, y otros, Pharm. Res., 20(12):1952-60 (2003)). También se observó que la histidina (hasta 60 mM) reduce la viscosidad de una formulación de alta concentración de este anticuerpo. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron un aumento de la agregación y decoloración en formulaciones que contienen histidina durante los estudios de congelación-descongelación del anticuerpo realizados en recipientes de acero inoxidable. Los autores atribuyeron esto a un efecto de los iones de hierro lixiviados de la corrosión de los recipientes de acero. Otra nota de precaución con la histidina es que atraviesa un proceso de foto-oxidación en presencia de iones de metal (Tomita M, y otros, Biochemistry, 8(12):5149-60 (1969)). El uso de la metionina como un antioxidante en formulaciones parece ser prometedor; se ha observado que es eficaz contra un número de tensiones oxidativas (Lam XM, y otros, J Pharm Sci., 86(11):1250-5 (1997)).

Se ha demostrado que los aminoácidos glicina, prolina, serina y alanina estabilizan las proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina también es un agente de carga usado comúnmente en formulaciones liofilizadas (por ejemplo, Neumega®, Genotropin®, Humatrope®). Ésta se cristaliza de la fase amorfa congelada, brindando la estructura y el volumen de torta. Se ha demostrado que la arginina es un agente eficaz para inhibir la agregación, y ha sido usada tanto en formulaciones líquidas como liofilizadas (por ejemplo, Activasa®, Avonex®, Enbrel® líquida). Adicionalmente, la eficiencia mejorada de replegamiento de ciertas proteínas en presencia de arginina ha sido atribuida a su supresión de la reacción de agregación competitiva durante el proceso de replegamiento.

Antioxidantes

La oxidación de residuos de proteínas surge de un número de fuentes diferentes. Aparte de la adición de antioxidantes específicos, la prevención de daño de la proteína oxidativa implica el control cuidadoso de un número de factores a través del proceso de fabricación y almacenamiento del producto, tales como oxígeno atmosférico, temperatura, exposición a la luz y contaminación química. Los antioxidantes farmacéuticos usados más comúnmente son agentes reductores, barredores de oxígeno/radicales libres o agentes quelantes. Los antioxidantes en formulaciones a base de proteínas terapéuticas deben ser solubles en agua y permanecer activos durante la vida en almacenamiento del producto. Los agentes reductores y barredores de oxígeno/radicales libres trabajan cortando las especies de oxígeno activo en solución. Los agentes quelantes, tales como EDTA, pueden ser eficaces al enlazar los contaminantes de metales traza que promueven

la formación de radicales libres. Por ejemplo, se utilizó EDTA en la formulación líquida de factor de crecimiento de fibroblasto ácido para inhibir la oxidación catalizada por iones de metal de los residuos de cisteína. El EDTA ha sido utilizado en productos comerciales como Kineret® y Ontak®.

Además de evaluar la eficacia de varios excipientes para prevenir la oxidación de proteínas, los científicos de formulación deben estar informados sobre el potencial de los propios antioxidantes para inducir otros cambios covalentes o físicos a la proteína. Un número de dichos casos han sido reportados en la literatura. Los agentes reductores (como la glutationa) pueden producir la interrupción de los enlaces disulfuro intramoleculares, lo cual puede derivar en la entremezcla de disulfuro. En la presencia de iones de metal de transición, el ácido ascórbico y el EDTA han mostrado que promueven la oxidación de metionina en un número de proteínas y péptidos (Akers M. J., y Defelippis M. R., Peptides and Proteins as Parenteral Solutions. En: Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editors. Pharmaceutical Science, Taylor y Francis, Reino Unido (1999)); Fransson J. R., J. Pharm. Sci. 86(9):4046-1050 (1997); Yin J., y otros, Pharm. Res.,21(12):2377-83 (2004)). Se ha reportado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por la luz y la temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, la formación de un aducto de tiosulfato-proteína también se reportó en este estudio (Lam X. M., Yang J. Y., y otros, J. Pharm Sci. 86(11):1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante adecuado se hace de acuerdo con las tensiones y sensibilidades específicas de la proteína.

Iones de metal

En general, los iones de metal de transición no son convenientes en las formulaciones a base de proteínas debido a que estos pueden catalizar reacciones de degradación física y química en las proteínas. Sin embargo, los iones de metal específicos se incluyen en formulaciones cuando estos son co-factores para las proteínas, y en formulaciones de suspensión de proteínas cuando estos forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión de zinc de insulina). Recientemente, el uso de iones de magnesio (10 – 120 mM) ha sido propuesto para inhibir la isomerización de ácido aspártico en ácido isoaspártico (WO 2004039337).

Dos ejemplos donde los iones de metal confieren estabilidad o actividad incrementada en proteínas son la deoxirribonucleasa humana (rhDNasa, Pulmozyme®), y el Factor VIII. En el caso de rhDNasa, los iones de Ca+2 (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima a través de un sitio de enlace específico (Chen B., y otros, J Pharm Sci., 88(4):477-82 (1999)). De hecho, la eliminación de iones de calcio de la solución con EGTA originó un aumento en desamidación y agregación. Sin embargo, este efecto se observó sólo con iones de Ca+2; se observó que otros cationes divalentes - Mg+2, Mn+2, y Zn+2 desestabilizan rhDNasa. Se observaron efectos similares en el Factor VIII. Los iones de Ca+2 y Sr+2 estabilizaron la proteína mientras que otros como Mg+2, Mn+2, y Zn+2, Cu+2 y Fe+2 desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., y otros, Int. J. Pharm., 155,

121-131 (1997). En un estudio separado con Factor VIII, se observó un aumento significativo en la velocidad de agregación en presencia de iones de Al+3 (Derrick TS, y otros, J. Pharm. Sci., 93(10):2549-57 (2004). Los autores resaltan que otros excipientes, como las sales de amortiguación, a menudo son contaminados con iones de Al+3 y muestran la necesidad para usar excipientes de calidad adecuada en productos formulados.

Conservantes

Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales multiuso que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su principal función es inhibir el crecimiento microbiano y asegurar la esterilidad del producto durante la vida en almacenamiento o término de uso del producto farmacéutico. Los conservantes usados comúnmente incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. A pesar de que los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones a base de proteínas que incluyen conservantes puede plantear un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizador (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor importante para limitar su uso en formulaciones a base de proteínas de dosis múltiples (Roy S., y otros, J. Pharm. Sci., 94(2):382-96 (2005)).

Hasta la fecha, la mayoría de fármacos de proteínas ha sido formulada sólo para uso único. Sin embargo, cuando las formulaciones en dosis múltiples son posibles, éstas tienen la ventaja adicional de permitir la conveniencia del paciente y de mejorar la capacidad de comercialización. Un buen ejemplo es aquel de la hormona de crecimiento humana (hGH), donde el desarrollo de formulaciones conservadas ha derivado en la comercialización de dispositivos para inyección de tipo lápiz, que son multiusos y mucho más convenientes. Al menos cuatro de dichos dispositivos tipo lápiz que contienen formulaciones conservadas de hGH se encuentran actualmente disponibles en el mercado. Norditropin® (líquida, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquida, Genentech) y Genotropin (liofilizada - cartucho de cámara doble, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol, mientras que Somatrope® (Eli Lilly) está formulada con m-cresol.

Varios aspectos deben ser considerados durante el desarrollo de las formulaciones de formas farmacéuticas conservadas. Es preciso optimizar la concentración de conservante eficaz en el producto farmacéutico. Esto requiere testear un conservante determinado en la forma farmacéutica con rangos de concentración que confieren eficacia anti-microbiana sin comprometer la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, tres conservantes fueron analizados exitosamente en el desarrollo de una formulación líquida para el receptor de interleucina-1 (Tipo I), usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Los conservantes se ordenaron por categoría en base a su impacto en la estabilidad en concentraciones usadas comúnmente en productos comerciales (Remmele R. L. Jr., y otros, Pharm Res., 15(2):200-8 (1998)).

Como se podría esperar, el desarrollo de formulaciones líquidas que contenían conservantes son más desafiantes que las formulaciones liofilizadas. Los productos

secados por congelamiento pueden ser liofilizados sin el conservante y reconstituidos con un conservante que contiene diluyente en el momento de uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína, minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con las formulaciones líquidas, la eficacia y estabilidad del conservante se deben mantener durante la vida en almacenamiento completa del producto (~ 18-24 meses). Un punto importante que se debe observar es que la eficacia del conservante tiene que ser demostrada en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes de excipientes.

Algunos conservantes pueden provocar reacciones en el sitio de la inyección, lo cual es otro factor a tomar en cuenta al elegir un conservante. En pruebas clínicas que se centraron en la evaluación de conservantes y soluciones amortiguadoras en Norditropin, se observó que la percepción de dolor fue menor en formulaciones que contienen fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contiene m-cresol (Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Suppl 3:98-103 (2004)). De manera interesante, entre los conservantes usados comúnmente, el alcohol bencílico posee propiedades anestésicas (Minogue SC, y Sun D. A., Anesth Analg., 100(3):683-6 (2005)).

Teniendo en cuenta las enseñanzas y guía proporcionadas en la presente, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o rango de excipiente puede ser incluido en cualquier formulación particular para lograr una formulación biofarmacéutica de la invención que promueva la retención en estabilidad de la formulación biofarmacéutica. Por ejemplo, la cantidad y tipo de sal que se debe incluir en una formulación biofarmacéutica de la invención puede seleccionarse según la osmolaridad conveniente (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la solución final, al igual que las cantidades y osmolaridad de otros componentes que se habrán de incluir en la formulación. Igualmente, a modo de ejemplo con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de dicho excipiente dependerá de su osmolaridad.

A modo de ejemplo, la inclusión de aproximadamente 5% de sorbitol puede alcanzar la isotonicidad, mientras que se necesita aproximadamente el 9% de excipiente sacarosa para alcanzar la isotonicidad. La selección de la cantidad o rango de concentraciones de uno o más excipientes que se pueden incluir en una formulación biofarmacéutica de la invención se citó a modo de ejemplo previamente en relación a las sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica comprenderán que las consideraciones descriptas en la presente y que se ejemplifican más adelante por referencia a determinados excipientes son igualmente aplicables a todos los tipos y combinaciones de excipientes incluso, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizantes, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones metálicos, agentes quelantes y/o conservantes.

Además, cuando se indica un excipiente particular en una formulación, por ejemplo, mediante el porcentaje (%) en peso/volumen, los expertos en la técnica podrán reconocer que la concentración molar equivalente de ese excipiente también se contempla.

Por supuesto, un experto en la técnica podrá reconocer que las concentraciones de los excipientes mencionados anteriormente comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A manera de ejemplo, la concentración de un agente de carga se puede disminuir cuando, por ejemplo, existe una alta concentración de proteína/péptido o cuando, por ejemplo, existe una alta concentración de agente estabilizador. Adicionalmente, un experto en la técnica podrá reconocer que, con la finalidad de mantener la isotonicidad de una formulación particular en la cual no existe un agente de carga, la concentración de un agente estabilizador se podrá ajustar respectivamente (es decir, se usaría una cantidad "tonificante" del estabilizador).

Las composiciones son estables al menos por dos años a una temperatura de 2°C-8°C en el estado liofilizado. Esta prolongada estabilidad es una condición beneficiosa para prolongar la vida en estantería del producto farmacéutico.

Métodos de preparación

La presente invención además contempla métodos para la preparación de formulaciones a base de proteínas terapéuticas. En un aspecto, los métodos para preparar una formulación a base de cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados comprenden el paso de liofilizar una composición de cuerpo peptídico terapéutico en una solución amortiguadora que comprende un agente amortiguador, un agente de carga, un agente estabilizador y un tensioactivo.

Los métodos actuales también comprenden uno o más de los siguientes pasos: agregar un agente estabilizador a dicha mezcla antes de la liofilización; agregar a dicha mezcla al menos un agente seleccionado entre un agente de carga, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo, antes de la liofilización. El agente de carga puede ser cualquier agente de carga que se describe en la presente. En un aspecto, el agente de carga es manitol. En otra forma de realización, el agente estabilizador es sacarosa. El tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo que se describe en la presente. En una forma de realización, el tensioactivo es polisorbato 20.

La práctica de reconstitución estándar para el material liofilizado es volver a agregar un volumen de agua pura o agua esterilizada para inyección (típicamente equivalente al volumen eliminado durante la liofilización), si bien las soluciones diluidas de agentes bacterianos algunas veces se usan en la producción de elementos farmacéuticos para la administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de cuerpos peptídicos terapéuticos reconstituidos que comprenden el paso de agregar un diluyente a una composición a base de cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados de la invención.

La composición a base de cuerpos peptídicos terapéuticos liofilizados puede reconstituirse como una solución acuosa. Varios excipientes acuosos, por ejemplo, agua esterilizada para inyección, agua con conservantes para varios usos o bien agua con las cantidades convenientes de tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20), 0,4 % de solución

salina y 0,3 % de glicina, o bien suspensiones acuosas, pueden contener el compuesto activo mezclado con excipientes adecuados para la fabricación de suspensiones acuosas. En varios aspectos, dichos excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa de sodio, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma acacia; los agentes de dispersión o humectantes pueden ser un fosfatido natural, por ejemplo lecitina; o productos de condensación de un óxido de alquileno con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno; o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetil-eneoxicetanol; o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como polioxietilen sorbitol monooleato; o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo polietileno sorbitan monooleato. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo, etilo o n-propilo, p-hidroxibenzoato.

Para administrar composiciones a humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases "farmacéuticamente" o "farmacológicamente aceptable" se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas, tales como los productos de agregación y clivaje, y que no producen reacciones alérgicas ni adversas de otra naturaleza cuando se las administra con el uso de vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe más adelante. Los "excipientes farmacéuticamente aceptables" incluyen cualquier y todos los solventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes retardadores de la absorción e isotónicos y otros similares, incluso los agentes que se revelan en la presente

Las composiciones de cuerpos peptídicos terapéuticos se pueden administrar por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, por atomizador de inhalación, vaginal, rectal, o mediante inyección intracraneal. El término parenteral, tal como se lo utiliza en la presente, incluye inyecciones subcutánea, intravenosa, intramuscular, intraesternal o técnicas de infusión. También se contempla la administración por inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar o bien el implante quirúrgico en un sitio específico. En términos generales, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como de otras impurezas que pueden resultar perjudiciales para el receptor.

Las administraciones únicas o múltiples de las composiciones se pueden llevar a cabo con los niveles y patrones de dosis que son seleccionados por el médico a cargo. Para la prevención o tratamiento de una enfermedad, la dosificación adecuada dependerá del tipo de enfermedad que se va a tratar, como se define arriba, la gravedad y curso de la enfermedad, si el fármaco se administra por motivos preventivos o terapéuticos, las

terapias previas, la historia clínica del paciente y su respuesta al fármaco, y la discreción del médico a cargo.

Kits

Como un aspecto adicional, la invención incluye kits que comprenden una o más composiciones o uno o más compuestos liofilizados envasados en una manera que facilite su uso para la administración a individuos. En una forma de realización, dicho kit incluye un compuesto o composición que se describe en la presente (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o péptido terapéutico), envasado en un recipiente tal como una botella o vasija sellada, con una etiqueta pegada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o composición en la práctica del método. En una forma de realización, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición liofilizada de proteínas o péptidos terapéuticos, y un segundo recipiente que tiene una solución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada. En un aspecto, el compuesto o composición se envasa en una forma farmacéutica unitaria. El kit puede incluir, igualmente, un dispositivo adecuado para administrar la composición según la vía de administración específica. Con preferencia, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición a base de las proteínas o los péptidos terapéuticos.

Dosificaciones.

El régimen de dosificación implicado en un método para tratar una afección que se describe en la presente será determinado por el médico a cargo, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la edad, condición, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, tiempo de administración y otros factores clínicos. En varios aspectos, el régimen diario está en el rango de 0,1 µg-1000 µg de una preparación por kilogramo de peso corporal (calculando la masa de la proteína sola, sin modificación química) o 0,1 µg-150 µg/kg. En algunas formas de realización de la invención, la dosis puede exceder 1 mg/kg, 3 mg/kg ó 10 mg/kg.

Las preparaciones de la invención se pueden administrar mediante un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener los niveles circulantes terapéuticos del producto farmacéutico. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención se puede administrar como una dosis de una vez. Los expertos en la técnica podrán optimizar fácilmente dosificaciones eficaces y regímenes de administración conforme se determine mediante una buena práctica médica y la condición clínica del paciente individual. La frecuencia de la administración de la dosis dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y la ruta de administración. La formulación farmacéutica óptima será determinada por un experto en la técnica dependiendo de la ruta de administración y la dosificación conveniente. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18 Ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712, cuya divulgación se incorpora a la presente por referencia. Dichas formulaciones pueden influir en el

estado físico, estabilidad, velocidad de liberación in vivo y velocidad de eliminación in vivo de los agentes administrados. Según la ruta de administración, se puede calcular una dosis de acuerdo con el peso corporal, área de superficie corporal o tamaño del órgano. El refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación adecuada para el tratamiento que incluye cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente se lleva a cabo de manera rutinaria por los expertos en la técnica sin experimentación indebida, especialmente considerando la información de dosificación y los ensayos que se divulgan en la presente, así como los datos farmacocinéticos observados en las pruebas clínicas humanas que se explicaron. Las dosificaciones adecuadas pueden ser determinadas mediante el uso de ensayos establecidos para determinar dosificaciones en el nivel de sangre junto con datos de respuesta a la dosis adecuados. El régimen de dosificación final será determinado por el médico a cargo, considerando varios factores que modifican la acción de los fármacos, por ejemplo, la actividad específica del fármaco, la gravedad del daño y la respuesta del paciente, la edad, la condición, el peso corporal, el sexo y la dieta del paciente, la gravedad de cualquier infección, el tiempo de administración y otros factores clínicos. A medida que se lleven a cabo estudios, se obtendrá información adicional con respecto a los niveles de dosificación adecuados y la duración del tratamiento para varias enfermedades y condiciones.

Estructura de los compuestos

En general. En preparaciones de acuerdo con la invención, un péptido está unido a un vehículo a través del extremo N terminal del péptido, el extremo C terminal del péptido, o ambos, y la estructura resultante se puede modificar en mayor grado con un WSP unido de manera covalente, que está unido a la fracción de vehículo en el producto de vehículo-péptido. Por lo tanto, las moléculas de cuerpos peptídicos terapéuticos para esta invención se pueden describir mediante la siguiente Fórmula I:

I [(X1)a-F1-(X2)b]-(L1)c-WSPd

donde:

F1 es un vehículo;

X1 se selecciona de

P1-(L2)e-

P2-(L3)f -P1-(L2)e-

P3-(L4)g-P2 -(L3)f -P1-(L2)e- y

P4-(L5)h-P3-(L4)g-P2-(L3)f-P1-(L2)e -

X2 se selecciona de:

-(L2)e-P1,

-(L2)e-P1-(L3)f -P2,

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g-P3, y

-(L2)e-P1-(L3)f-P2-(L4)g -P3-(L5)h-P4

donde P1, P2, P3 y P4 son, cada uno en forma independiente, secuencias de péptidos farmacológicamente activos.

L1, L2, L3, L4 y L5 son, cada uno en forma independiente, enlazadores;

a, b, c, e, f, g, y h son, cada uno en forma independiente, 0 ó 1,

siempre que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1, o mayor que 1; y

WSP es un polímero hidrosoluble, cuya unión se efectúa en cualquier fracción reactiva de F1.

Por lo tanto, el compuesto I comprende compuestos de las Fórmulas

II [X1-F1]-(L1)c-WSPd

incluyendo sus multímeros, donde F1 es un dominio Fc y está unido en el extremo C terminal de X1, y uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

III [F1-X2]-(L1)c-WSPd

incluyendo sus multímeros, donde F1 es un dominio Fc y está unido en el extremo N terminal de X2, y uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

IV [F1-(L1)e-P1]-(L1)c-WSPd

incluyendo sus multímeros, donde F1 es un dominio Fc y está unido en el extremo N terminal de -(L1)c-P1 y uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1; y

V [F1-(L1)e-P1-(L2)f-P2]-(L1)c-WSPd

incluyendo sus multímeros, donde F1 es un dominio Fc y está unido en el extremo N terminal de -L1-P1-L2-P2 y uno o más WSP están unidos al dominio Fc, opcionalmente a través del enlazador L1.

En una forma de realización, F1 es un dominio Fc y está unido al extremo N terminal o extremo C terminal de un péptido. En una forma de realización relacionada, el Fc está enlazado en forma dimérica, como se describe en la presente, al cual se unen 2 (o más) péptidos. Los péptidos pueden ser homodiméricos (es decir, la misma secuencia de aminoácidos), o heterodinámicos (es decir, diferentes secuencias de aminoácidos que enlazan la misma diana o que enlazan diferentes dianas).

En otra forma de realización, se proporcionan Fc-bucles que comprenden uno o más péptidos. Los Fc-bucles que comprenden uno o más péptidos se preparan en un proceso en el cual al menos un péptido biológicamente activo se incorpora como una secuencia interna en un dominio Fc. Dicha secuencia interna puede agregarse por inserción (es decir, entre aminoácidos en el dominio Fc previamente existente) o mediante el reemplazo de aminoácidos en el dominio Fc previamente existente (es decir, se eliminan los aminoácidos en el dominio Fc existente previamente y se agregan los aminoácidos peptídicos). En el último caso, la cantidad de aminoácidos peptídicos agregados no necesariamente debe corresponder a la cantidad de aminoácidos eliminados del dominio

Fc existente previamente. Por ejemplo, en un aspecto, se proporciona una molécula en la cual se eliminan 10 aminoácidos y se agregan 15 aminoácidos. Los compuestos farmacológicamente activos proporcionados se elaboran mediante un procedimiento que comprende: a) seleccionar al menos un péptido que modula la actividad de una proteína de interés; y b) elaborar un agente farmacológico que comprende una secuencia de aminoácidos del péptido seleccionado como una secuencia interna de un dominio Fc. Este procedimiento puede emplearse para modificar un dominio Fc que ya está enlazado, a través de un extremo N terminal o C terminal -o bien de una cadena lateral- a un péptido; por ejemplo como se describe en las solicitudes de patentes estadounidenses números 2003/0195156, 2003/0176352, 2003/0229023 y 2003/0236193, y las publicaciones internacionales números WO 00/24770 y WO 04/026329. El procedimiento descripto en la publicación de la solicitud de patente estadounidense número US2006/0140934 también puede emplearse para modificar un dominio Fc que es parte de un anticuerpo. De esta manera, se pueden producir diferentes moléculas que tienen funcionalidades adicionales, tales como el dominio de enlace a un epítopo diferente o un dominio de enlace adicional con el epítopo existente de la molécula precursora. También se hace referencia a las moléculas que comprenden una secuencia peptídica interna como "enlaces peptídicos internos de Fc" ó "moléculas peptídicas internas Fc".

Las moléculas peptídicas internas de Fc pueden incluir más de una secuencia peptídica en tándem en una región interna en particular, y pueden incluir otros péptidos en otras regiones internas. Si bien se prefieren las regiones de bucle putativas, las inserciones en cualquier otro dominio no-terminal de Fc también se consideran parte de la presente invención. Las variantes y los derivados de los compuestos indicados previamente (que se describen más adelante), también se encuentran comprendidos dentro de la presente invención.

Los compuestos de la presente invención pueden prepararse a través de métodos sintéticos estándar, técnicas de ADN recombinantes o cualquier otro método para preparar péptidos y proteínas de fusión.

Un uso de las moléculas peptídicas internas de Fc que se contempla, es como agente terapéutico o profiláctico. Un polipéptido seleccionado puede tener actividad comparable a -o incluso mayor que- el ligando natural imitado por el péptido. Sumado a ello, ciertos agentes terapéuticos naturales a base de ligandos podrían inducir anticuerpos contra el propio ligando endógeno del paciente. En contraste, la secuencia exclusiva del péptido enlazado por vehículo evita esta deficiencia porque tiene escasa o ninguna identidad de secuencia con el ligando natural. Sumado a ello, los enlaces peptídicos internos de Fc presentan ventajas respecto del replegamiento y purificación a través de las moléculas de Fc enlazadas en el extremo N terminal o C terminal. Del mismo modo, los enlaces peptídicos internos de Fc pueden ser más estables tanto desde el punto de vista termodinámico, debido a la estabilización de dominios quiméricos, como químicamente, debido a la mayor resistencia a la degradación proteolítica de las peptidasas amino y

carboxi. Los enlaces peptídicos internos Fc también exhiben mayores propiedades farmacocinéticas.

Péptidos. Se puede utilizar cualquier número de péptidos en conjunto con la presente invención. De particular interés son los péptidos que imitan la actividad de EPO, TPO, hormona de crecimiento, G-CSF, GM-CSF, IL-1ra, CTLA4, TRAIL, TNF, VEGF, MMP, miostatina, integrina, OPG, OPG-L, NGF, TALL-1, compañeros de enlace a Ang-2, TGF-α y TGF-β. Los antagonistas de péptidos también son de interés, particularmente aquellos antagonistas a la actividad de TNF, cualquiera de las interleucinas (IL-1, 2, 3, ...) y proteínas implicadas en la activación de complemento (por ejemplo, C3b). Los péptidos dirigidos también son de interés, incluso péptidos de asentamiento de tumor, péptidos transportadores de membrana y similares. Todas estas clases de péptidos se pueden descubrir mediante métodos que se describen en las referencias citadas en esta memoria y en otras referencias.

La exhibición en fago, en particular, resulta de utilidad en la generación de péptidos que se usan en la presente invención. Se ha establecido que la selección por afinidad de bibliotecas de péptidos aleatorios se puede utilizar para identificar ligandos peptídicos para cualquier sitio de cualquier producto génico. Dedman y colaboradores, (1993), J. Biol. Chem. 268: 23025-30. La exhibición en fago resulta particularmente adecuada para identificar péptidos que se enlazan con las proteínas de interés, tales como receptores de la superficie celular o cualquier proteína que tenga epítopos lineales. Wilson y colaboradores, (1998), Can. J. Microbiol. 44: 313-29; Kay y colaboradores, (1998), Drug Disc. Today 3: 370-8. Dichas proteínas son ampliamente analizadas en Herz y colaboradores, (1997), J. Receptor & Signal Transduction Res. 17(5): 671-776, que se incorporan íntegramente a la presente a modo de referencia. Dichas proteínas de interés se prefieren para su empleo en la presente invención.

A manera de ejemplo, y sin sentido limitativo, se proporciona un grupo de péptidos que se enlazan a receptores de citoquina. Las citoquinas recientemente han sido clasificadas de acuerdo con su código de receptor. Véase Inglot (1997), Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis 45:353-7, la cual se incorpora en la presente por referencia. Entre estos receptores se encuentran los CKR (familia I en la Tabla 3). La clasificación del receptor aparece en la Tabla 3.

Tabla 3 - Receptores de citoquina clasificados por código de receptor

Citoquinas (ligandos)		Tipo de Receptor	
Familia	Subfamilia	Familia	Subfamilia
I. Citoquinas hematopoyéticas	1. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 2. IL-3, IL-5, GM-CSF 3. IL-6, IL-11, IL-12, LIF, OSM, CNTF, Leptina (OB) 4. G-CSF, EPO, TPO, PRL, GH 5. IL-17, HVS, IL-17	I. Citoquina R (CKR)	1. γCr compartido, IL-9R, IL-4R 2. GP 140 βR compartido 3. RP 130 3.compartido, IL-6R, Leptina R 4. R de "cadena única", GCSF-R, TPO-R, GH-R 5. otros R2
II. Ligandos de IL-10	IL-10, BCRF-1, HSV-IL-10	II. IL-10 R	
III. Interferones	1. IFN-α1, α2, α4, m, t, IFN-β3 2. IFN-γ	III. Interferón R	1. IFNAR 2. IFNGR
IV. IL-1 y ligandos similares a IL-1	1. IL-1α, IL-1 β, IL-1Ra 2. IL-18, IL-18BP	IV. IL-1R	1. IL-1R, IL-1RAcP 2. IL-18R, IL-18RAcP
V. Familia dek TNF	1. TNF-α, TNF- β (LT), FASL, CD40L, CD30L, CD27L, 0X40L, OPGL, TRAIL, APRIL, AGP-3, BLys, TL5, Ntn-2, KAY, Neutrocina-α	3. NGF/TNF R4	TNF-RI, AGP-3R, DR4, DR5, OX40, OPG, TACI, CD40, FAS, ODR
VI. Quimosinas 2. Quimosinas β: MIP1α, MIP1 β, MCP-1,2,3,4, RANTES eotaxina 3. Y quiomicinas: linfotactina	1. Quimosinas α: IL-8, GRO α, β, γ, IF-10, PF-4, SDF-1	4. Quimosina R	1. CXCR 2. CCR 3. CR 4. DARC5
VII. Factores de Crecimiento	1.1 SCF, M-CSF, PDGF-AA, AB,	VII. RKF	1. sub-familia TK 1.1 IgTK III R,

	BB, KDR, FLT-1, FLT-3L, VEGF, SSV-PDGF, HGF, SF 1.2 FGFα, FGFβ 1.3 EGF, TGF-α, VV-F19 (similar a EGF) 1.4 IGF-I, IGF-II, Insulina 1.5 NGF, BDNF, NT-3, NT-46		VEGF-RI, VEGF-RII 1.2 IgTK IV R 1.3 TK-I rico en cisteína 1.4 TK-II rico en cisteína, IGF-RI 1.5 TK V nudo de cisteína
	2. TGF-β1, β2, β3		2. sub-familia serina-treonina quinasa (STKS)7

1. IL-17R pertenece a la familia CKR pero no se asigna a las 4 subfamilias indicadas.
2. Otros subtipos del tipo I IFN permanecen sin ser asignados. Las citoquinas hematopoyéticas, los ligandos IL-10 e interferones no poseen quinasas de proteínas intrínsecas funcionales. Las moléculas de señalización para las citoquinas son moléculas de JAK, STAT y no-receptoras relacionadas. IL-14, IL-16 y IL-18 se han clonado pero de acuerdo con el código del receptor permanecen sin ser asignados
3. Los receptores de TNF usan moléculas intracelulares distintas, múltiples para la transducción de señales incluyendo "dominio de muerte" de FAS R y 55kDa TNF-R que participa en sus efectos citotóxicos. NGF/TNF R se puede enlazar tanto a NGF y factores relacionados como a ligandos de TNG. Los receptores de quimocina son 7 receptores de dominio de transmembrana (7TM, serpentina). Son G-proteínas acopladas.
4. El antígeno del grupo de sanguíneo de Duffy (DARC) es un receptor de eritocitos que se puede enlazar a varias quimocinas diferentes. IL-IR pertenece a la superfamilia de inmunoglobulina pero sus características de eventos de transducción de señales no permanecen claras.
5. Las citoquinas neurotróficas también se pueden asociar con receptores de NGF/TNF.
6. STKS puede abarcar muchos otros factores relacionados de TGF-β que permanecen sin ser asignados. Las quinasas de proteínas son parte intrínseca del dominio intracelular de la familia quinasa receptora (RKF). Las enzimas participan en la transmisión de señales a través de los receptores.

Otras proteínas de interés como dianas para generar péptidos en la presente invención incluyen las siguientes:

αvβ3
αVβ1
Ang-2
B7
B7RP1
CRP1
Calcitonina
CD28
CETP
cMet
Factor de complemento B
C4b
CTLA4
Glucagón
Receptor de glucagón
LIPG
MPL
Variantes de empalme de moléculas expresadas preferentemente en células tumorales; por ejemplo CD44, CD30
Variantes no glicosiladas de mucina y glicoproteínas de superficie Y de Lewis
CD19, CD20, CD33, CD45
Antígeno de la membrana específico de la próstata y antígeno de las células específico de la próstata
Metaloproteinasas de matriz (MMP, por su sigla en inglés), tanto secretadas como enlazadas a membrana (por ejemplo, MMP-9)
Catepsinas
Receptor de TIE-2
Heparanasa
Activador de plasminógeno uroquinasa (UPA), receptor de UPA
Hormona paratiroidea (PTH, por su sigla en inglés), proteína relacionada a la hormona paratiroidea (PTHrP), PTH-RI, PTH-RII
Her2
Her3
Insulina
Miostatina
TALL-1

Factor de crecimiento nervioso
Integrinas y receptores
Selectinas y sus receptores
Moléculas de adhesión celular y sus receptores

En las Tablas 4 a 38 a continuación se presentan ejemplos de péptidos. Estos péptidos se pueden preparar mediante cualquier método divulgado en la técnica, muchos de los cuales se mencionan en la presente. En la mayoría de las tablas que siguen se usan abreviaturas de aminoácidos de una sola letra. La "X" en estas secuencias (y en toda esta memoria, a menos que se especifique lo contrario en un caso particular) significa que cualquiera de los 20 residuos de aminoácidos naturales puede estar presentes. Cualquiera de estos péptidos puede estar enlazado en tándem (es decir, en secuencias), con o sin enlazadores, y algunos ejemplos de enlace en tándem se proporcionan en la tabla. Los enlazadores se presentan como "Λ" y pueden ser cualquiera de los enlazadores que se describen en la presente. El tándem se repite y los enlazadores se muestran separados por guiones para brindar una mayor claridad. Cualquier péptido que contenga un residuo de cisteinilo puede estar reticulado con otro péptido que contiene Cys, uno o ambos de los cuales pueden estar enlazados a un vehículo. En la tabla se proporcionan algunos ejemplos de reticulación. Cualquier péptido que tenga más de un residuo Cys puede formar un enlace disulfuro intrapeptídico, también; véase, por ejemplo, péptidos miméticos de EPO en la Tabla 5. En la tabla se especifican algunos ejemplos de péptidos enlazados a disulfuro intrapeptídico. Cualquiera de estos péptidos se puede derivar como se describe en la presente, y algunos ejemplos derivados se proporcionan en la tabla. Los péptidos derivados en las tablas son ejemplos no limitativos, debido a que los péptidos no derivados asociados también se pueden emplear en esta invención. Para los derivados en los cuales los extremos terminales carboxilo se cubren con un grupo amino, el grupo amino de tapa se muestra como –NH2. Para derivados en los cuales los residuos de aminoácidos se sustituyen con fracciones que no son residuos de aminoácidos, las sustituciones se denotan mediante σ, que significa cualquiera de las fracciones que se describen en Bhatnagar y otros (1996), J. Med. Chem. 39:3814-9 y Cuthbertson y otros (1997), J. Med. Chem. 40:2876-82, las cuales se incorporan a la presente por referencia. El sustituyente J y los sustituyentes Z (Z5, Z6,...Z40) son como se definen en las patentes de los Estados Unidos números 5.608.035, 5.786.331 y 5.880.096, las cuales se incorporan a la presente por referencia. Para las secuencias miméticas de EPO (Tabla 5), los sustituyentes X2 a X11 y el entero "n" son como se define en la WO 96/40772, la cual se incorpora en la presente por referencia. También para las secuencias miméticas de EPO, los sustituyentes Xna, X1a, X2a, X3a, X4a, X5a y Xca siguen las definiciones de Xn, X1, X2, X3, X4, X5 y Xc, respectivamente, establecidas en la WO 99/47151, la cual también se incorpora por referencia. Los sustituyentes "Ψ", "Θ" y "+" son como se definen en Sparks y otros, (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93:1540-4,

la cual se incorpora en la presente por referencia. X4, X5, X6 y X7 son como se definen en la patente estadounidense número 5.773.569, la cual se incorpora en la presente por referencia, excepto que: para los péptidos de enlace a integrina, X1, X2, X3, X4, X5, X6, X7 y X8 son como se definen en las solicitudes internacionales WO 95/14714, publicada el 1 de junio de 1995, y WO 97/08203, publicada el 6 de marzo de 1997, las cuales también se incorporan a la presente por referencia; y para los péptidos miméticos de VIP, X1, X1', X1", X2, X3, X4, X5, X6 y Z y los enteros m y n son como se definen en la WO 97/40070, publicada el 30 de octubre de 1997, la cual también se incorpora a la presente por referencia. Xaa y Yaa a continuación son como se definen en WO 98/09985, publicada el 12 de marzo de 1998, la cual también se incorpora en la presente por referencia. AA1, AA2, AB1, AB2, y Ac son como se definen en la solicitud internacional WO 98/53842, publicada el 3 de diciembre de 1998, la cual también se incorpora en la presente por referencia. X1, X2, X3 y X4 en la Tabla 17 sólo son como se definen en la solicitud europea EP 0 911 393, publicada el 28 de abril de 1999. Los residuos que aparecen en negritas son D-aminoácidos. Todos los péptidos se enlazan a través de enlaces de péptidos a menos que se indique lo contrario. Las abreviaturas se mencionan al final de esta memoria. En la columna "SEQ ID NO.", "NR" significa que no se requiere una lista de secuencias para la secuencia determinada.

Tabla 4—Secuencias de péptidos antagonistas de IL-1

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Z11Z7Z8QZ5YZ6Z9Z10	3
XXQZ5YZ6XX	4
Z7XQZ5YZ6XX	5
Z7Z8QZ5YZ6Z9Z10	6
Z11Z7Z8QZ5YZ6Z9Z10	7
Z12Z13Z14Z15Z16Z17Z18Z19Z20Z21Z22Z11Z7Z8QZ5YZ6Z9Z10L	8
Z23NZ24Z39Z25Z26Z27Z28Z29Z30Z40	9
TANVSSFEWTPYYWQPYALPL	10
SWTDYGYWQPYALPISGL	11
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	12
ENTYSPNWADSMYWQPYALPL	13
SVGEDHNFWTSEYWQPYALPL	14
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	15
FEWTPGYWQPY	16
FEWTPGYWQHY	17

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
FEWTPGWYQJY	18
AcFEWTPGWYQJY	19
FEWTPGWpYQJY	20
FAWTPGYWQJY	21
FEWAPGYWQJY	22
FEWVPGYWQJY	23
FEWTPGYWQJY	24
AcFEWTPGYWQJY	25
FEWTPaWYQJY	26
FEWTPSarWYQJY	27
FEWTPGYYQPY	28
FEWTPGWWQPY	29
FEWTPNYWQPY	30
FEWTPvYWQJY	31
FEWTPecGYWQJY	32
FEWTPAibYWQJY	33
FEWTSarGYWQJY	34
FEWTPGYWQPY	35
FEWTPGYWQHY	36
FEWTPGWYQJY	37
AcFEWTPGWYQJY	38
FEWTPGW-pY-QJY	39
FAWTPGYWQJY	40
FEWAPGYWQJY	41
FEWVPGYWQJY	42
FEWTPGYWQJY	43
AcFEWTPGYWQJY	44
FEWTPAWYQJY	45
FEWTPSarWYQJY	46
FEWTPGYYQPY	47
FEWTPGWWQPY	48
FEWTPNYWQPY	49
FEWTPVYWQJY	50
FEWTPecGYWQJY	51
FEWTPAibYWQJY	52
FEWTSarGYWQJY	53

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
FEWTPGYWQPYALPL	54
1NapEWTPGYYQJY	55
YEWTPGYYQJY	56
FEWVPGYYQJY	57
FEWTPSYYQJY	58
FEWTPNYYQJY	59
TKPR	60
RKSSK	61
RKQDK	62
NRKQDK	63
RKQDKR	64
ENRKQDKRF	65
VTKF F	66
VTKFY	67
VTDFY	68
SHLYWQPYSVQ	69
TLVYWQPYSLQT	70
RGDYWQPYSVQS	71
VHVYWQPYSVQT	72
RLVYWQPYSVQT	73
SRVWFQPYSLQS	74
NMVYWQPYSIQT	75
SVVFWQPYSVQT	76
TFVYWQPYALPL	77
TLVYWQPYSIQR	78
RLVYWQPYSVQR	79
SPVFWQPYSIQI	80
WIEWWQPYSVQS	81
SLIYWQPYSLQM	82
TRLYWQPYSVQR	83
RCDYWQPYSVQT	84
MRVFWQPYSVQN	85
KIVYWQPYSVQT	86
RHLYWQPYSVQR	87
ALVWWQPYSEQI	88
SRVWFQPYSLQS	89

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
WEQPYALPLE	90
QLVWWQPYSVQR	91
DLRYWQPYSVQV	92
ELVWWQPYSLQL	93
DLVWWQPYSVQW	94
NGNYWQPYSFQV	95
ELVYWQPYSIQR	96
ELMYWQPYSVQE	97
NLLYWQPYSMQD	98
GYEWYQPYSVQR	99
SRVWYQPYSVQR	100
LSEQYQPYSVQR	101
GGGWWQPYSVQR	102
VGRWYQPYSVQR	103
VHVYWQPYSVQR	104
QARWYQPYSVQR	105
VHVYWQPYSVQT	106
RSVYWQPYSVQR	107
TRVWFQPYSVQR	108
GRIWFQPYSVQR	109
GRVWFQPYSVQR	110
ARTWYQPYSVQR	111
ARVWWQPYSVQM	112
RLMFYQPYSVQR	113
ESMWYQPYSVQR	114
HFGWWQPYSVHM	115
ARFWWQPYSVQR	116
RLVYWQ PYAPIY	117
RLVYWQ PYSYQT	118
RLVYWQ PYSLPI	119
RLVYWQ PYSVQA	120
SRVWYQ PYAKGL	121
SRVWYQ PYAQGL	122
SRVWYQ PYAMPL	123
SRVWYQ PYSVQA	124
SRVWYQ PYSLGL	125

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SRVWYQ PYAREL	126
SRVWYQ PYSRQP	127
SRVWYQ PYFVQP	128
EYEWYQ PYALPL	129
IPEYWQ PYALPL	130
SRIWWQ PYALPL	131
DPLFWQ PYALPL	132
SRQWVQ PYALPL	133
IRSWWQ PYALPL	134
RGYWQ PYALPL	135
RLLWVQ PYALPL	136
EYRWFQ PYALPL	137
DAYWVQ PYALPL	138
WSGYFQ PYALPL	139
NIEFWQ PYALPL	140
TRDWVQ PYALPL	141
DSSWYQ PYALPL	142
IGNWYQ PYALPL	143
NLRWDQ PYALPL	144
LPEFWQ PYALPL	145
DSYWWQ PYALPL	146
RSQYYQ PYALPL	147
ARFWLQ PYALPL	148
NSYFWQ PYALPL	149
RFMYWQPYSVQR	150
AHLFWQPYSVQR	151
WWQPYALPL	152
YYQPYALPL	153
YFQPYALGL	154
YWYQPYALPL	155
RWWQPYATPL	156
GWYQPYALGF	157
YWYQPYALGL	158
IWYQPYAMPL	159
SNMQPYQRLS	160
TFVYWQPY AVGLPAAETACN	161

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
TFVYWQPY SVQMTITGKVTM	162
TFVYWQPY SSHXXVPXGFPL	163
TFVYWQPY YGNPQWAIHVRH	164
TFVYWQPY VLLELPEGAVRA	165
TFVYWQPY VDYVWPIPIAQV	166
GWYQPYVDGWR	167
RWEQPYVKDGWS	168
EWYQPYALGWAR	169
GWWQPYARGL	170
LFEQPYAKALGL	171
GWEQPYARGLAG	172
AWVQPYATPLDE	173
MWYQPYSSQPAE	174
GWTQPYSQQGEV	175
DWFQPYSIQSDE	176
PWIQPYARGFG	177
RPLYWQPYSVQV	178
TLIYWQPYSVQI	179
RFDYWQPYSDQT	180
WHQFVQPYALPL	181
EWDS VYWQPYSVQ TLLR	182
WEQN VYWQPYSVQ SFAD	183
SDV VYWQPYSVQ SLEM	184
YYDG VYWQPYSVQ VMPA	185
SDIWYQ PYALPL	186
QRIWWQ PYALPL	187
SRIWWQ PYALPL	188
RSLYWQ PYALPL	189
TIIWEQ PYALPL	190
WETWYQ PYALPL	191
SYDWEQ PYALPL	192
SRIWCQ PYALPL	193
EIMFWQ PYALPL	194
DYVWQQ PYALPL	195
MDLLVQ WYQPYALPL	196
GSKVIL WYQPYALPL	197

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RQGANI WYQPYALPL	198
GGGDEP WYQPYALPL	199
SQLERT WYQPYALPL	200
ETWVRE WYQPYALPL	201
KKGSTQ WYQPYALPL	202
LQARMN WYQPYALPL	203
EPRSQK WYQPYALPL	204
VKQKWR WYQPYALPL	205
LRRHDV WYQPYALPL	206
RSTASI WYQPYALPL	207
ESKEDQ WYQPYALPL	208
EGLTMK WYQPYALPL	209
EGSREG WYQPYALPL	210
VIEWWQ PYALPL	211
VWYWEQ PYALPL	212
ASEWWQ PYALPL	213
FYEWWQ PYALPL	214
EGWWVQ PYALPL	215
WGEWLQ PYALPL	216
DYVWEQ PYALPL	217
AHTWWQ PYALPL	218
FIEWFQ PYALPL	219
WLAWEQ PYALPL	220
VMEWWQ PYALPL	221
ERMWQ PYALPL	222
NXXWXX PYALPL	223
WGNWYQ PYALPL	224
TLYWEQ PYALPL	225
VWRWEQ PYALPL	226
LLWTQ PYALPL	227
SRIWXX PYALPL	228
SDIWYQ PYALPL	229
WGYYXX PYALPL	230
TSGWYQ PYALPL	231
VHPYXX PYALPL	232
EHSYFQ PYALPL	233

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
XXIWYQ PYALPL	234
AQLHSQ PYALPL	235
WANWFQ PYALPL	236
SRLYSQ PYALPL	237
GVTFSQ PYALPL	238
SIVWSQ PYALPL	239
SRDLVQ PYALPL	240
HWGH VYWQPYSVQ DDLG	241
SWHS VYWQPYSVQ SVPE	242
WRDS VYWQPYSVQ PESA	243
TWDA VYWQPYSVQ KWLD	244
TPPW VYWQPYSVQ SLDP	245
YWSS VYWQPYSVQ SVHS	246
YWY QPY ALGL	247
YWY QPY ALPL	248
EWI QPY ATGL	249
NWE QPY AKPL	250
AFY QPY ALPL	251
FLY QPY ALPL	252
VCK QPY LEWC	253
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	254
QGWLTWQDSVDMYWQPYALPL	255
FSEAGYTWPENTYWQPYALPL	256
TESPGGLDWAKIYWQPYALPL	257
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	258
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	259
SVGEDHNFWTSE YWQPYALPL	260
MNDQTSEVSTFP YWQPYALPL	261
SWSEAFEQPRNL YWQPYALPL	262
QYAEPSALNDWG YWQPYALPL	263
NGDWATADWSNY YWQPYALPL	264
THDEHI YWQPYALPL	265
MLEKTYTTWTPG YWQPYALPL	266
WSDPLTRDADL YWQPYALPL	267
SDAFTTQDSQAM YWQPYALPL	268
GDDAAWRTDSLT YWQPYALPL	269

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AIIRQLYRWSEM YWQPYALPL	270
ENTYSPNWADSM YWQPYALPL	271
MNDQTSEVSTFP YWQPYALPL	272
SVGEDHNFWTSE YWQPYALPL	273
QTPFTWEESNAY YWQPYALPL	274
ENPFTWQESNAY YWQPYALPL	275
VTPFTWEDSNVF YWQPYALPL	276
QIPFTWEQSNAY YWQPYALPL	277
QAPLTWQESAAY YWQPYALPL	278
EPTFTWEESKAT YWQPYALPL	279
TTTLTWEESNAY YWQPYALPL	280
ESPLTWEESSAL YWQPYALPL	281
ETPLTWEESNAY YWQPYALPL	282
EATFTWAESNAY YWQPYALPL	283
EALFTWKESTAY YWQPYALPL	284
STP-TWEESNAY YWQPYALPL	285
ETPFTWEESNAY YWQPYALPL	286
KAPFTWEESQAY YWQPYALPL	287
STSFTWEESNAY YWQPYALPL	288
DSTFTWEESNAY YWQPYALPL	289
YIPFTWEESNAY YWQPYALPL	290
QTAFTWEESNAY YWQPYALPL	291
ETLFTWEESNAT YWQPYALPL	292
VSSFTWEESNAY YWQPYALPL	293
QPYALPL	294
Py-1-NapPYQJYALPL	295
TANVSSFEWTPG YWQPYALPL	296
FEWTPGYWQPYALPL	297
FEWTPGYWQJYALPL	298
FEWTPGYYQJYALPL	299
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	300
FTWEESNAYYWQJYALPL	301
ADVL YWQPYA PVTLWV	302
GDVAE YWQPYA LPLTSL	303
SWTDYG YWQPYA LPISGL	304
FEWTPGYWQPYALPL	305

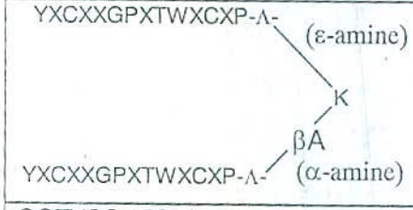
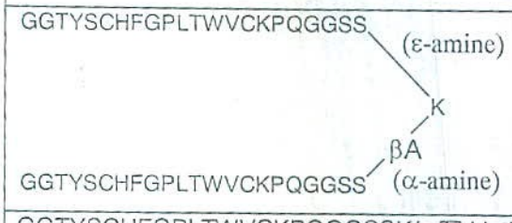
Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
FEWTPGYWQJYALPL	306
FEWTPGWYQPYALPL	307
FEWTPGWYQJYALPL	308
FEWTPGYYQPYALPL	309
FEWTPGYYQJYALPL	310
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	311
SWTDYGYWQPYALPISGL	312
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	313
ENTYSPNWADSMYWQPYALPL	314
SVGEDHNFWTSEYWQPYALPL	315
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	316
FEWTPGYWQPYALPL	317
FEWTPGYWQPY	318
FEWTPGYWQJY	319
EWTPGYWQPY	320
FEWTPGWYQJY	321
AEWTPGYWQJY	322
FAWTPGYWQJY	323
FEATPGYWQJY	324
FEWAPGYWQJY	325
FEWTAGYWQJY	326
FEWTPAYWQJY	327
FEWTPGAWQJY	328
FEWTPGYAQJY	329
FEWTPGYWQJA	330
FEWTGGYWQJY	331
FEWTPGYWQJY	332
FEWTJGYWQJY	333
FEWTPecGYWQJY	334
FEWTPAibYWQJY	335
FEWTPSarWYQJY	336
FEWTSarGYWQJY	337
FEWTPNYWQJY	338
FEWTPVYWQJY	339
FEWTVPYWQJY	340
AcFEWTPGWYQJY	341

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AcFEWTPGYWQJY	342
INap-EWTPGYYQJY	343
YEWTPGYYQJY	344
FEWVPGYYQJY	345
FEWTPGYYQJY	346
FEWTPsYYQJY	347
FEWTPnYYQJY	348
SHLY-Nap-QPYSVQM	349
TLVY-Nap-QPYSLQT	350
RGDY-Nap-QPYSVQS	351
NMVY-Nap-QPYSIQT	352
VYWQPYSVQ	353
VY-Nap-QPYSVQ	354
TFVYWQJYALPL	355
FEWTPGYYQJ-Bpa	356
XaaFEWTPGYYQJ-Bpa	357
FEWTPGY-Bpa-QJY	358
AcFEWTPGY-Bpa-QJY	359
FEWTPG-Bpa-YQJY	360
AcFEWTPG-Bpa-YQJY	361
AcFE-Bpa-TPGYYQJY	362
AcFE-Bpa-TPGYYQJY	363
Bpa-EWTPGYYQJY	364
AcBpa-EWTPGYYQJY	365
VYWQPYSVQ	366
RLVYWQPYSVQR	367
RLVY-Nap-QPYSVQR	368
RLDYWQPYSVQR	369
RLVWFQPYSVQR	370
RLVYWQPYSIQR	371
DNSSWYDSFLL	372
DNTAWYESFLA	373
DNTAWYENFLL	374
PARE DNTAWYDSFLI WC	375
TSEY DNTTWYEKFLA SQ	376
SQIP DNTAWYQSFLL HG	377

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SPFI DNTAWYENFLL TY	378
EQIY DNTAWYDHFLL SY	379
TPFI DNTAWYENFLL TY	380
TYTY DNTAWYERFLM SY	381
TMTQ DNTAWYENFLL SY	382
TI DNTAWYANLVQ TYPQ	383
TI DNTAWYERFLA QYPD	384
HI DNTAWYENFLL TYTP	385
SQ DNTAWYENFLL SYKA	386
QI DNTAWYERFLL QYNA	387
NQ DNTAWYESFLL QYNT	388
TI DNTAWYENFLL NHNL	389
HY DNTAWYERFLQ QGWH	390
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	391
YIPFTWEESNAYYWQPYALPL	392
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	393
pY-INap-pY-QJYALPL	394
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	395
FEWTPGYWQJYALPL	396
FEWTPGYWQPYALPLSD	397
FEWTPGYYQJYALPL	398
FEWTPGYWQJY	399
AcFEWTPGYWQJY	400
AcFEWTPGWYQJY	401
AcFEWTPGYYQJY	402
AcFEWTPaYWQJY	403
AcFEWTPaWYQJY	404
AcFEWTPaYYQJY	405
FEWTPGYYQJYALPL	406
FEWTPGYWQJYALPL	407
FEWTPGWYQJYALPL	408
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	409
AcFEWTPGYWQJY	410
AcFEWTPGWYQJY	411
AcFEWTPGYYQJY	412
AcFEWTPAYWQJY	413

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AcFEWTPAWYQJY	414
AcFEWTPAYYQJY	415

Tabla 5 - Secuencias de péptidos miméticos de EPO

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
YXCXXGPXTWXCXP	416
YXCXXGPXTWXCXP-YXCXXGPXTWXCXP	417
YXCXXGPXTWXCXP-Λ-YXCXXGPXTWXCXP	418
	419
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	420
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	421
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	422
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	423
GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	424
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	425
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG -Λ- GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	426
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	427
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	428
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK-Λ-GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	429
	430
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK(Λ-biotina)	431
CX4X5GPX6TWX7C	432
GGTYSCHGPLTWVCKPQGG	433

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
VGNYMAHMGPITWVCRPGG	434
GGPHHVYACRMGPLTWIC	435
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	436
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	437
TIAQYICYMGPETWECRPSPKA	438
YSCHFGPLTWVCK	439
YCHFGPLTWVC	440
X3X4X5GPX6TWX7X8	441
YX2X3X4X5GPX6TWX7X8	442
X1YX2X3X4X5GPX6TWX7X8X9X10X11	443
X1YX2CX4X5GPX6TWX7CX9X10X11	444
GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	445
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	446
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	447
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	448
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	449
VGNYMAHMGPITWVCRPGG	450
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	451
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	452
TIAQYICYMGPETWECRPSPKA	453
YSCHFGPLTWVCK	454
YCHFGPLTWVC	455
SCHFGPLTWVCK	456
(AX2)nX3X4X5GPX6TWX7X8	457
XnCX1X2GWVGX3CX4X5WXC	458

Tabla 6 - Secuencias de péptidos miméticos de TPO

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
IEGPTLRQWLAARA	459
IEGPTLRQWLAAKA	460
IEGPTLREWLAARA	461
IEGPTLRQWLAARA-Λ-IEGPTLRQWLAARA	462
IEGPTLRQWLAAKA-Λ-IEGPTLRQWLAAKA	463
IEGPTLRQCLAARA-Λ-IEGPTLRQCLAARA	464

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
IEGPTLRQWLAARA-Λ-K(BrAc)-Λ-IEGPTLRQWLAARA	465
IEGPTLRQWLAARA-Λ-K(PEG)-Λ-IEGPTLRQWLAARA	466
IEGPTLRQCLAARA-Λ-IEGPTLRQWLAARA | IEGPTLRQCLAARA-Λ-IEGPTLRQWLAARA	467
IEGPTLRQWLAARA-Λ-IEGPTLRQCLAARA | IEGPTLRQWLAARA-Λ-IEGPTLRQCLAARA	468
VRDQIXXXL	469
TLREWL	470
GRVRDQVAGW	471
GRVKDQIAQL	472
GVRDQVSWAL	473
ESVREQVMKY	474
SVRSQISASL	475
GVRETVYRHM	476
GVREVIVMHML	477
GRVRDQIWAAL	478
AGVRDQILIWL	479
GRVRDQIMLSL	480
GRVRDQI(X)3L	481
CTLRQWLQGC	482
CTLQEFLEGC	483
CTRTEWLHGC	484
CTLREWLHGGFC	485
CTLREWVFAGLC	486
CTLRQWLILLGMC	487
CTLAEFLASGVEQC	488
CSLQEFLSHGGYVC	489
CTLREFLDPTTAVC	490
CTLKEWLVSHEVWC	491
CTLREWL(X)2-6C	492
REGPTLRQWM	493
EGPTLRQWLA	494

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
ERGPFWAKAC	495
REGPRCVMWM	496
CGTEGPTLSTWLDC	497
CEQDGPTLLEWLKC	498
CELVGPSLMSWLTC	499
CLTGPFVTQWLYEC	500
CRAGPTLLEWLTLC	501
CADGPTLREWISFC	502
C(X)1-2EGPTLREWL(X)1-2C	503
GGCTLREWLHGGFCGG	504
GGCADGPTLREWISFCGG	505
GNADGPTLRQWLEGRRPKN	506
LAIEGPTLRQWLHGNGRDT	507
HGRVGPTLREWKTQVATKK	508
TIKGPTLRQWLKSREHTS	509
ISDGPTLKEWLSVTRGAS	510
SIEGPTLREWLTSRTPHS	511

Tabla 7 - Secuencias de péptidos miméticos de G-CSF

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
EEDCK	512
EEDCK | EEDCK	513
EEDσK	514
EEDσK | EEDσK	515
pGluEDσK	516
pGluEDσK | pGluEDσK	517
PicSDσK	518

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
PicSDσK | PicSDσK	519
EEDσK-Λ-EEDCK	520
EEDXK-Λ-□EEDXK	521

Tabla 8 - Secuencias de péptidos antagonistas de TNF

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
YCFTASENHCY	522
YCFTNSENHCY	523
YCFTRSENHCY	524
FCASENHCY	525
YCASENHCY	526
FCNSENHCY	527
FCNSENRCY	528
FCNSVENRCY	529
YCSOSVSNDCF	530
FCVSNDRCY	531
YCRKELGQVCY	532
YCKEPGQCY	533
YCRKEMGCY	534
FCRKEMGCY	535
YCWSQNLCY	536
YCELSQYLCY	537
YCWSQNYCY	538
YCWSQYLCY	539
DFLPHYKNTSLGHRP	540
AA1-AB1 \ AC / AA2-AB2	NR

5

Tabla 9 - Secuencias de péptidos de enlace a integrina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RX1ETX2WX3	541
RX1ETX2WX3	542
RGDGX	543
CRGDGXC	544
CX1X2RLDX3X4C	545
CARRLDAPC	546
CPSRLDSPC	547
X1X2X3RGDX4X5X6	548
CX2CRGDCX5C	549
CDCRGDCFC	550
CDCRGDCLC	551
CLCRGDCIC	552
X1X2DDX4X5X7X8	553
X1X2X3DDX4X5X6X7X8	554
CWDDGWLC	555
CWDDLWWLC	556
CWDDGLMC	557
CWDDGWMC	558
CSWDDGWLC	559
CPDDLWWLC	560
NGR	NR
GSL	NR
RGD	NR
CGRECPRLCQSSC	561
CNGRCVSGCAGRC	562
CLSGSLSC	563
RGD	NR
NGR	NR
GSL	NR
NGRAHA	564
CNGRC	565
CDCRGDCFC	566
CGSLVRC	567
DLXXL	568
RTDLDSLRTYTL	569

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RTDLDSLRTY	570
RTDLDSLRT	571
RTDLDSLR	572
GDLDLLKLRLTL	573
GDLHSLRQLLSR	574
RDDLHMLRLQLW	575
SSDLHALKKRYG	576
RGDLKQLSELTW	577
RGDLAALSAPPV	578

Tabla 10—Secuencias de péptidos antagonistas de selectina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
DITWDQLWDLMK	579
DITWDELWKIMN	580
DYTWFELWDMMQ	581
QITWAQLWNMMK	582
DMTWHDLWTLMS	583
DYSWHDLWEMMS	584
EITWDQLWEVMN	585
HVSWEQLWDIMN	586
HITWDQLWRIMT	587
RNMSWLELWEHMK	588
AEWTWDQLWHVMNPAESQ	589
HRAEWLALWEQMSP	590
KKEDWLALWRIMSV	591
ITWDQLWDLMK	592
DITWDQLWDLMK	593
DITWDQLWDLMK	594
DITWDQLWDLMK	595
CQNRYTDLVAIQNKNE	596
AENWADNEPNNKRNNED	597
RKNNKTWTWVGTKKALTNE	598
KKALTNEAENWAD	599
CQXRYTDLVAIQNKXE	600
RKXNXXWTWVGTXKXLTEE	601

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AENWADGEPNNKXNXED	602
CXXXYTXLVAIQNKXE	603
RKXXXXWXWVGTXKXLTXE	604
AXNWXXXEPNNXXXED	605
XKXKTXEAXNWXX	606

Tabla 11 - Secuencias de péptidos antipatógenos

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQQ	607
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSGGQE	608
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	609
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	610
KGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	611
KKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	612
KKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	613
GFFALIPKIIS	614
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	615
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	616
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	617
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR	618
AVLKVLTTGLPALISWIKR	619
KLLLLLKLLLLK	620
KLLLKLLLKLLK	621
KLLLKLKLKLLK	622
KKLLKLKLKLKK	623
KLLLKLLLKLLK	624
KLLLKLKLKLLK	625
KLLLLK	626
KLLLKLLK	627
KLLLKLKLKLLK	628
KLLLKLKLKLLK	629
KLLLKLKLKLLK	630
KAAAKAAAKAAK	631
KVVVKVVVKVVK	632
KVVVKVKVKVVK	633

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
KVVVKVKVKVK	634
KVVVKVKVKVVK	635
KLILKL	636
KVLHLL	637
LKLRLL	638
KPLHLL	639
KLILKLVR	640
KVFHLLHL	641
HKFRILKL	642
KPFHILHL	643
KIIIKIKIKIIK	644
KIIIKIKIKIIK	645
KIIIKIKIKIIK	646
KIPIKIKIKIPK	647
KIPIKIKIKIVK	648
RIIIRIRIRIIR	649
RIIIRIRIRIIR	650
RIIIRIRIRIIR	651
RIVIRIRIRLIR	652
RIIVRIRLRIIR	653
RIGIPLRVRIIR	654
KIVIRIRIPLIR	655
RIAVKWRLRFIK	656
KIGWKLRVRIIR	657
KKIGWLIIRVRR	658
RIVIRIRIRLIRIR	659
RIIVRIRLRIIRVR	660
RIGIRLRVRIIRRV	661
KIVIRIRARLIRIRIR	662
RIIVKIRLRIIKKIRL	663
KIGIKARVRIIRVKII	664
RIIVHIRLRIIHHIRL	665
HIGIKAHVRIIRVHII	666
RIYVKIHLRYIKKIRL	667
KIGHKARVHIIRYKII	668
RIYVKPHPRYIKKIRL	669

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
KPGHKARPHIIRYKII	670
KIVIRIRIRLIRIRIRKIV	671
RIIVKIRLRIIKKIRLIKK	672
KIGWKLRVRIIRVKIGRLR	673
KIVIRIRIRLIRIRIRKIVKVKRIR	674
RFAVKIRLRIIKKIRLIKKIRKRVIK	675
KAGWKLRVRIIRVKIGRLRKIGWKKRVRIK	676
RIYVKPHPRYIKKIRL	677
KPGHKARPHIIRYKII	678
KIVIRIRIRLIRIRIRKIV	679
RIIVKIRLRIIKKIRLIKK	680
RIYVSKISIYIKKIRL	681
KIVIFTRIRLTSIRIRSIV	682
KPIHKARPTIIRYKMI	683
cyclicCKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC	684
CKKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC	685
CKKKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC	686
CyclicCRIVIRIRIRLIRIRC	687
CyclicCKPGHKARPHIIRYKIIC	688
CyclicCRFAVKIRLRIIKKIRLIKKIRKRVIKC	689
KLLLKLLL KLLKC	690
KLLLKLLLKLLK	691
KLLLKLKLKLLKC	692
KLLLKLLLKLLK	693

Tabla 12 - Secuencias de péptidos miméticos de VIP

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
HSDAVFYDNYTR LRKQMAVKKYLN SILN	694
Nle HSDAVFYDNYTR LRKQMAVKKYLN SILN	695
X1 X1' X1" X2	696
X3 S X4 LN	697
NH CH CO KKYX5 NH CH CO X6 | | (CH2)m___Z_____(CH2)n	698
KKYL	699

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
NSILN	700
KKYL	701
KKYA	702
AVKKYL	703
NSILN	704
KKYV	705
SILauN	706
KKYLNle	707
NSYLN	708
NSIYN	709
KKYLPPNSILN	710
LauKKYL	711
CapKKYL	712
KYL	713
KKYNle	714
VKKYL	715
LNSILN	716
YLNSILN	717
KKYLN	718
KKYLNS	719
KKYLNSI	720
KKYLNSIL	721
KKYL	722
KKYDA	723
AVKKYL	724
NSILN	725
KKYV	726
SILauN	727
NSYLN	728
NSIYN	729
KKYLNle	730
KKYLPPNSILN	731
KKYL	732
KKYDA	733
AVKKYL	734
NSILN	735

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
KKYV	736
SILauN	737
LauKKYL	738
CapK[1]KYL	739
KYL	740
KYL	741
KKYNle	742
VKKYL	743
LNSILN	744
YLNSILN	745
KKYLNle	746
KKYLN	747
KKYLNS	748
KKYLNSI	749
KKYLNSIL	750
KKKYLD	751
cyclicCKKYLC	752
CKKYLK | | S-CH[2]-CO	753
KKYA	754
WWTDTGLW	755
WWTDDGLW	756
WWDTRGLWVWTI	757
FWGNDGIWLESG	758
DWDQFGLWRGAA	759
RWDDNGLWVVVL	760
SGMWSHYGIWMG	761
GGRWDQAGLWVA	762
KLWSEQGIWMGE	763
CWSMHGLWLC	764
GCWDNTGIWVPC	765
DWDTRGLWVY	766
SLWDENGAWI	767
KWDDRGLWMH	768
QAWNERGLWT	769

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
QWDTRGLWVA	770
WNVHGIWQE	771
SWDTRGLWVE	772
DWDTRGLWVA	773
SWGRDGLWIE	774
EWTDNGLWAL	775
SWDEKGLWSA	776
SWDSSGLWMD	777

Tabla 13 - Secuencias de péptidos antagonistas de Mdm/hdm

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
TFSDLW	778
QETFSDLWKLLP	779
QPTFSDLWKLLP	780
QETFSDYWKLLP	781
QPTFSDYWKLLP	782
MPRFMDYWEGLN	783
VQNFIDYWTQQF	784
TGPAFTHYWATF	785
IDRAPTFRDHWFALV	786
PRPALVFADYWETLY	787
PAFSRFWSDLSAGAH	788
PAFSRFWSKLSAGAH	789
PXFXDYWXXL	790
QETFSDLWKLLP	791
QPTFSDLWKLLP	792
QETFSDYWKLLP	793
QPTFSDYWKLLP	794

Tabla 14 - Secuencias de péptidos antagonistas de calmodulina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SCVKWGKKEFCGS	795
SCWKYWGKECGS	796
SCYEWGKLRWCGS	797

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SCLRWGKWSNCGS	798
SCWRWGKYQICGS	799
SCVSWGALKLCGS	800
SCIRWGQNTFCGS	801
SCWQWGNLKICGS	802
SCVRWGQLSICGS	803
LKKFNARRKLKGAILTTMLAK	804
RRWKKNFIAVSAANRFKK	805
RKWQKTGHAVRAIGRLSS	806
inlkalaalakkil	807
KIWSILAPLGTTLVKLVA	808
LKKLLKLLKKLLKL	809
LKWKKLLKLLKKLLKKLL	810
AEWPSLTEIKTLSHFSV	811
AEWPSPTRVISTTYFGS	812
AELAHWPPVKTVLRSFT	813
AEGSWLQLLNLMKQMNN	814
AEWPSLTEIK	815

Tabla 15 - Secuencias de péptidos antagonistas de mastocitos/inhibidores de proteasa de mastocitos

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SGSGVLKRPLPILPVTR	816
RWLSSRPLPPLPLPPRT	817
GSGSYDTLALPSLPLHPMSS	818
GSGSYDTRALPSLPLHPMSS	819
GSGSSGVTMYPKLPPHWSMA	820
GSGSSGVRMYPKLPPHWSMA	821
GSGSSSMRMVPTIPGSAKHG	822
RNR	NR
QT	NR
RQK	NR
NRQ	NR
RQK	NR
RNRQKT	823

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RNRQ	824
RNRQK	825
NRQKT	826
RQKT	827

Tabla 16 - Secuencias de péptidos antagonistas de SH3

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RPLPPLP	828
RELPPLP	829
SPLPPLP	830
GPLPPLP	831
RPLPIPP	832
RPLPIPP	833
RRLPPTP	834
RQLPPTP	835
RPLPSRP	836
RPLPTRP	837
SRLPPLP	838
RALPSPP	839
RRLPRTP	840
RPVPPIT	841
ILAPPVP	842
RPLPMLP	843
RPLPILP	844
RPLPSLP	845
RPLPSLP	846
RPLPMIP	847
RPLPLIP	848
RPLPPTP	849
RSLPPLP	850
RPCPPPP	851
RQLPIPP	852
XXXRPLPPLPXP	853
XXXRPLPPIPXX	854
XXXRPLPPLPXX	855

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RXXRPLPPLPXP	856
RXXRPLPPLPPP	857
PPPYPPPPIPXX	858
PPPYPPPPVPXX	859
LXXRPLPXΨP	860
ΨXXRPLPXLP	861
PPXΘXPPPΨP	862
+PPΨPXKPXWL	863
RPXΨPΨR+SXP	864
PPVPPRPXXTL	865
ΨPΨLPΨK	866
+ΘDXPLPXLP	867

Tabla 17 - Secuencias de péptidos miméticos de somatostatina o cortistatina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
X1-X2-Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe-X3-Ser-X4	868
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	869
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	870
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	871
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	872
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	873
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	874
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	875
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	876
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	877
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	878
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	879
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	880
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	881
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	882

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	883
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	884
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	885
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	886
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	887
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	888
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	889
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	890
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	891
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	892

Tabla 18 - Secuencias de péptidos antagonistas de UKR

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AEPMPHSLNFSQYLWYT	893
AEHTYSSLWDTYSPLAF	894
AELDLWMRHYPLSFSNR	895
AESSLWTRYAWPSMPSY	896
AEWHPGLSFGSYLWSKT	897
AEPALLNWSFFFNPGLH	898
AEWSFYNLHLPEPQTIF	899
AEPLDLWSLYSLPPLAM	900
AEPTLWQLYQFPLRLSG	901
AEISFSELMWLRSTPAF	902
AELSEADLWTTWFGMGS	903
AESSLWRIFSPSALMMS	904
AESLPTLTSILWGKESV	905
AETLFMDLWHDKHILLT	906
AEILNFPLWHEPLWSTE	907
AESQTGTLNTLFWNTLR	908
AEPVYQYELDSYLRSYY	909
AELDLSTFYDIQYLLRT	910
AEFFKLGPNGYVYLHSA	911

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
FKLXXXGYVYL	912
AESTYHHLSLGYMYTLN	913
YHXLXXGYMYT	914

Tabla 19 - Secuencias de péptidos inhibidores de macrófagos y/o linfocitos T

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Xaa-Yaa-Arg	NR
Arg-Yaa-Xaa	NR
Xaa-Arg-Yaa	NR
Yaa-Arg-Xaa	NR
Ala-Arg	NR
Arg-Arg	NR
Asn-Arg	NR
Asp-Arg	NR
Cys-Arg	NR
Gln-Arg	NR
Glu-Arg	NR
Gly-Arg	NR
His-arg	NR
Ile-Arg	NR
Leu-Arg	NR
Lys-Arg	NR
Met-Arg	NR
Phe-Arg	NR
Ser-Arg	NR
Thr-Arg	NR
Trp-Arg	NR
Tyr-Arg	NR
Val-Arg	NR
Ala-Glu-Arg	NR
Arg-Glu-Arg	NR
Asn-Glu-Arg	NR
Asp-Glu-Arg	NR
Cys-Glu-Arg	NR
Gln-Glu-Arg	NR

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Glu-Glu-Arg	NR
Gly-Glu-Arg	NR
His-Glu-Arg	NR
Ile-Glu-Arg	NR
Leu-Glu-Arg	NR
Lys-Glu-Arg	NR
Met-Glu-Arg	NR
Phe-Glu-Arg	NR
Pro-Glu-Arg	NR
Ser-Glu-Arg	NR
Thr-Glu-Arg	NR
Trp-Glu-Arg	NR
Tyr-Glu-Arg	NR
Val-Glu-Arg	NR
Arg-Ala	NR
Arg-Asp	NR
Arg-Cys	NR
Arg-Gln	NR
Arg-Glu	NR
Arg-Gly	NR
Arg-His	NR
Arg-Ile	NR
Arg-Leu	NR
Arg-Lys	NR
Arg-Met	NR
Arg-Phe	NR
Arg-Pro	NR
Arg-Ser	NR
Arg-Thr	NR
Arg-Trp	NR
Arg-Tyr	NR
Arg-Val	NR
Arg-Glu-Ala	NR
Arg-Glu-Asn	NR
Arg-Glu-Asp	NR
Arg-Glu-Cys	NR

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Arg-Glu-Gln	NR
Arg-Glu-Glu	NR
Arg-Glu-Gly	NR
Arg-Glu-His	NR
Arg-Glu-Ile	NR
Arg-Glu-Leu	NR
Arg-Glu-Lys	NR
Arg-Glu-Met	NR
Arg-Glu-Phe	NR
Arg-Glu-Pro	NR
Arg-Glu-Ser	NR
Arg-Glu-Thr	NR
Arg-Glu-Trp	NR
Arg-Glu-Tyr	NR
Arg-Glu-Val	NR
Ala-Arg-Glu	NR
Arg-Arg-Glu	NR
Asn-Arg-Glu	NR
Asp-Arg-Glu	NR
Cys-Arg-Glu	NR
Gln-Arg-Glu	NR
Glu-Arg-Glu	NR
Gly-Arg-Glu	NR
His-Arg-Glu	NR
Ile-Arg-Glu	NR
Leu-Arg-Glu	NR
Lys-Arg-Glu	NR
Met-Arg-Glu	NR
Phe-Arg-Glu	NR
Pro-Arg-Glu	NR
Ser-Arg-Glu	NR
Thr-Arg-Glu	NR
Trp-Arg-Glu	NR
Tyr-Arg-Glu	NR
Val-Arg-Glu	NR
Glu-Arg-Ala,	NR

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Glu-Arg-Arg	NR
Glu-Arg-Asn	NR
Glu-Arg-Asp	NR
Glu-Arg-Cys	NR
Glu-Arg-Gln	NR
Glu-Arg-Gly	NR
Glu-Arg-His	NR
Glu-Arg-Ile	NR
Glu-Arg-Leu	NR
Glu-Arg-Lys	NR
Glu-Arg-Met	NR
Glu-Arg-Phe	NR
Glu-Arg-Pro	NR
Glu-Arg-Ser	NR
Glu-Arg-Thr	NR
Glu-Arg-Trp	NR
Glu-Arg-Tyr	NR
Glu-Arg-Val	NR

Tabla 20 - Ejemplos adicionales de péptidos farmacológicamente activos

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
VEPNCDIHVMWEWECFERL	915	Antagonista de VEGF
GERWCFDGPLTWVCGEES	916	Antagonista de VEGF
RGWVEICVADDNGMCVTEAQ	917	Antagonista de VEGF
GWDECDVARMWEWECFAGV	918	Antagonista de VEGF
GERWCFDGPRAWVCGWEI	919	Antagonista de VEGF
EELWCFDGPRAWVCGYVK	920	Antagonista de

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
		VEGF
RGWVEICAADDYGRCLTEAQ	921	Antagonistas de VEGF
RGWVEICESDVWGRCL	922	Antagonistas de VEGF
RGWVEICESDVWGRCL	923	Antagonistas de VEGF
GGNECDIARMWEWECFERL	924	Antagonista de VEGF
RGWVEICAADDYGRCL	925	Antagonista de VEGF
CTTHWGFTLC	926	Inhibidor de MMP
CLRSGXGC	927	Inhibidor de MMP
CXXHWGFXXC	928	Inhibidor de MMP
CXPXC	929	Inhibidor de MMP
CRRHWGFEFC	930	Inhibidor de MMP
STTHWGFTLS	931	Inhibidor de MMP
CSLHWGFWWC	932	Mimético de CTLA4
GFVCSGIFAVGVGRC	933	Mimético de CTLA4
APGVRLGCAVLGRYC	934	Mimético de CTLA4
LLGRMK	935	Antiviral (HBV)
ICVVQDWGHHRCTAGHMANLTSHASAI	936	Antagonista de C3b
ICVVQDWGHHRCT	937	Antagonista de C3b
CVVQDWGHHAC	938	Antagonista de C3b
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	939	Enlace a Vinculina
stggfddvydwarrvssaltttlvatr	940	Enlace a vinculina
srgvnfsewlydmsaamkeasnvfpsrrsr	941	Enlace a vinculina
SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	942	Enlace a vinculina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	943	Enlace a vinculina
SSTGWVDLLGALQRAADATRTSIPPSLQNSR	944	Enlace a vinculina
DVYTKKELIECARRVSEK	945	Enlace a vinculina
EKGSYYPGSGIAQFHIDYNNVS	946	Enlace a C4BP
SGIAQFHIDYNNVSSAEGWHVN	947	Enlace a C4BP
LVTVEKGSYYPGSGIAQFHIDYNNVSSAEGWHVN	948	Enlace a C4BP
SGIAQFHIDYNNVS	949	Enlace a C4BP
LLGRMK	950	anti-HBV
ALLGRMKG	951	anti-HBV
LDPAFR	952	anti-HBV
CXXRGDC	953	Inhibición de la agregación plaquetaria
RPLPPLP	954	Antagonista de Src
PPVPPR	955	Antagonista de Src
XFXDXWXXLXX	956	Antirumoral (particularmente para sarcomas)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD	957	Mimético de P-16
RERWNFDFVTETPLEGDFAW	958	Mimético de P-16
KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS	959	Mimético de P-16
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP	960	Mimético de P-16
RRLIF	961	Mimético de P-16
KRRQTSATDFYHSKRRLIFSRQIKIWFQNRRMKW KK	962	Mimético de P-16
KRRLIFSKRQIKIWFQNRRMKWKK	963	Mimético de P-16
Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln	964	Mimético de CAP37/enlace LPS
Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys	965	Mimético de CAP37/enlace LPS
Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val	966	Mimético de CAP37/enlace LPS

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
WHWRHRIPLQLAAGR	967	Mimético de carbohidratos (GD1 alfa)
LKTPRV	968	Enlace a β2GPI Ab
NTLKTPRV	969	Enlace a β2GPI Ab
NTLKTPRVGGC	970	Enlace a β2GPI Ab
KDKATF	971	Enlace a β2GPI Ab
KDKATFGCHD	972	Enlace a β2GPI Ab
KDKATFGCHDGC	973	Enlace a β2GPI Ab
TLRVYK	974	Enlace a β2GPI Ab
ATLRVYKGG	975	Enlace a β2GPI Ab
CATLRVYKGG	976	Enlace a β2GPI Ab
INLKALAALAKKIL	977	Transportador de membrana
GWT	NR	Transportador de membrana
GWTLNSAGYLLG	978	Transportador de membrana
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	979	Transportador de membrana
CVHAYRS	980	Antiproliferativa, antiviral
CVHAYRA	981	Antiproliferativo, antiviral
CVHAPRS	982	Antiproliferativo, antiviral
CVHAPRA	983	Antiproliferativo, antiviral
CVHSYRS	984	Antiproliferativo, antiviral
CVHSYRA	985	Antiproliferativo, antiviral
CVHSPRS	986	Antiproliferativo, antiviral

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
CVHSPRA	987	Antiproliferativo, antiviral
CVHTYRS	988	Antiproliferativo, Antiviral
CVHTYRA	989	Antiproliferativo, Antiviral
CVHTPRS	990	Antiproliferativo, antiviral
CVHTPRA	991	Antiproliferativo, antiviral
HWAWFK	992	Anti-isquémico, liberador de la hormona de crecimiento

Tabla 21: Péptidos inhibidores de miostatina

Nombre del cuerpo peptídico	SEQ ID	Secuencia peptídica
Miostatina-TN8-Con1	1036	KDKCKMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-Con2	1037	KDLCAMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-Con3	1038	KDLCKMWKWMCKPP
Miostatina -TN8-Con4	1039	KDLCKMWHWMCKPK
Miostatina -TN8-Con5	1040	WYPCYEFHFWCYDL
Miostatina -TN8-Con6	1041	WYPCYEGHFWCYDL
Miostatina -TN8-Con7	1042	IFGCKWWDVQCYQF
Miostatina -TN8-Con8	1043	IFGCKWWDVDCYQF
Miostatina -TN8-Con9	1044	ADWCVSPNWFCMVM
Miostatina -TN8-Con10	1045	HKFCPWWALFCWDF
Miostatina -TN8-1	1046	KDLCKMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-2	1047	IDKCAIWGWMCPPL
Miostatina -TN8-3	1048	WYPCGEFGMWCLNV
Miostatina -TN8-4	1049	WFTCLWNCDNE
Miostatina -TN8-5	1050	HTPCPWFAPLCVEW
Miostatina -TN8-6	1051	KEWCWRWKWMCKPE

Nombre del cuerpo peptídico	SEQ ID	Secuencia peptídica
Miostatina -TN8-7	1052	FETCPSWAYFCLDI
Miostatina -TN8-8	1053	AYKCEANDWGCWWL
Miostatina -TN8-9	1054	NSWCEDQWHRCWWL
Miostatina -TN8-10	1055	WSACYAGHFWCYDL
Miostatina -TN8-11	1056	ANWCVSPNWFCMVM
Miostatina -TN8-12	1057	WTECYQQEFWCWNL
Miostatina -TN8-13	1058	ENTCERWKWMCPPK
Miostatina -TN8-14	1059	WLPCHQEGFWCMNF
Miostatina -TN8-15	1060	STMCSQWHWMCNPF
Miostatina -TN8-16	1061	IFGCHWWDVDCYQF
Miostatina -TN8-17	1062	IYGCKWWDIQCYDI
Miostatina -TN8-18	1063	PDWCIDPDWWCKFW
Miostatina -TN8-19	1064	QGHCTRWPWMCPPY
Miostatina -TN8-20	1065	WQECYREGFWCLQT
Miostatina -TN8-21	1066	WFDCYGPGFKCWSP
Miostatina -TN8-22	1067	GVRCPKGHLWCLYP
Miostatina -TN8-23	1068	HWACGYWPWSCKWV
Miostatina -TN8-24	1069	GPACHSPWWWCVFG
Miostatina -TN8-25	1070	TTWCISPMWFCSQQ
Miostatina -TN8-26	1071	HKFCPPWAIFCWDF
Miostatina -TN8-27	1072	PDWCVSPRWYCNMW
Miostatina -TN8-28	1073	VWKCHWFGMDCEPT
Miostatina -TN8-29	1074	KKHCQIWTWMCAPK
Miostatina -TN8-30	1075	WFQCGSTLFWCYNL
Miostatina -TN8-31	1076	WSPCYDHYFYCYTI
Miostatina -TN8-32	1077	SWMCGFFKEVCMWV
Miostatina -TN8-33	1078	EMLCMIHPVFCNPH
Miostatina -TN8-34	1079	LKTCNLWPWMCPPL
Miostatina -TN8-35	1080	VVGCKWYEAWCYNK
Miostatina -TN8-36	1081	PIHCTQWAWMCPPT
Miostatina -TN8-37	1082	DSNCPWYFLSCVIF
Miostatina -TN8-38	1083	HIWCNLAMMKCVEM
Miostatina -TN8-39	1084	NLQCIYFLGKCIYF
Miostatina -TN8-40	1085	AWRCMWFSDVCTPG
Miostatina -TN8-41	1086	WFRCFLDADWCTSV
Miostatina -TN8-42	1087	EKICQMWSWMCAPP

Nombre del cuerpo peptídico	SEQ ID	Secuencia peptídica
Miostatina -TN8-43	1088	WFYCHLNKSECTEP
Miostatina -TN8-44	1089	FWRCAIGIDKCKRV
Miostatina -TN8-45	1090	NLGCKWYEVWCFTY
Miostatina -TN8-46	1091	IDLCNMWDGMCYPP
Miostatina -TN8-47	1092	EMPCNIWGWMCPPV
Miostatina -TN12-1	1093	WFRCVLTGIVDWSECFGL
Miostatina -TN12-2	1094	GFSCTFGLDEFYVDCSPF
Miostatina -TN12-3	1095	LPWCHDQVNADWGFCMLW
Miostatina -TN12-4	1096	YPTCSEKFWIYGQTCVLW
Miostatina -TN12-5	1097	LGPCPIHHGPWPQYCVYW
Miostatina -TN12-6	1098	PFPCETHQISWLGHCLSF
Miostatina -TN12-7	1099	HWGCEDLMWSWHPLCRRP
Miostatina -TN12-8	1100	LPLCDADMMPTIGFCVAY
Miostatina -TN12-9	1101	SHWCETTFWMNYAKCVHA
Miostatina -TN12-10	1102	LPKCTHVPFDQGGFCLWY
Miostatina -TN12-11	1103	FSSCWSPVSRQDMFCVFY
Miostatina -TN12-13	1104	SHKCEYSGWLQPLCYRP
Miostatina -TN12-14	1105	PWWCQDNYVQHMLHCDSP
Miostatina -TN12-15	1106	WFRCMLMNSFDAFQCVSY
Miostatina -TN12-16	1107	PDACRDQPWYMFMGCMLG
Miostatina -TN12-17	1108	FLACFVEFELCFDS
Miostatina -TN12-18	1109	SAYCIITESDPYVLCVPL
Miostatina -TN12-19	1110	PSICESYSTMWLPMCQHN
Miostatina -TN12-20	1111	WLDCHDDSWAWTKMCRSH
Miostatina -TN12-21	1112	YLNCVMMNTSPFVECVFN
Miostatina -TN12-22	1113	YPWCDGFMIQQGITCMFY
Miostatina -TN12-23	1114	FDYCTWLNGFKDWKCWSR
Miostatina -TN12-24	1115	LPLCNLKEISHVQACVLF
Miostatina -TN12-25	1116	SPECAFARWLGIEQCQRD
Miostatina -TN12-26	1117	YPQCFNLHLLEWTECDWF
Miostatina -TN12-27	1118	RWRCEIYDSEFLPKCWFF
Miostatina -TN12-28	1119	LVGCDNVWHRCKLF
Miostatina -TN12-29	1120	AGWCHVWGEMFGMGCSAL
Miostatina -TN12-30	1121	HHECEWMARWMSLDCVGL
Miostatina -TN12-31	1122	FPMCGIAGMKDFDFCVWY
Miostatina -TN12-32	1123	RDDCTFWPEWLWKLCERP

Nombre del cuerpo peptídico	SEQ ID	Secuencia peptídica
Miostatina -TN12-33	1124	YNFCSYLFGVSKEACQLP
Miostatina -TN12-34	1125	AHWCEQGPWRYGNICMAY
Miostatina -TN12-35	1126	NLVCGKISAWGDEACARA
Miostatina -TN12-36	1127	HNVCTIMGPSMKWFCWND
Miostatina -TN12-37	1128	NDLCAMWGWRNTIWCQNS
Miostatina -TN12-38	1129	PPFCQNDNDMLQSLCKLL
Miostatina -TN12-39	1130	WYDCNVPNELLSGLCRLF
Miostatina -TN12-40	1131	YGDCDQNHWMWPFTCLSL
Miostatina -TN12-41	1132	GWMCHFDLHDWGATCQPD
Miostatina -TN12-42	1133	YFHCMFGGHEFEVHCESF
Miostatina -TN12-43	1134	AYWCWHGQCVRF
Miostatina - Lineal-1	1135	SEHWTFTDWDGNEWWVRPF
Miostatina - Lineal -2	1136	MEMLDSLFELLKDMVPISKA
Miostatina - Lineal -3	1137	SPPEEALMEWLGWQYGKFT
Miostatina - Lineal -4	1138	SPENLLNDLYILMTKQEWYG
Miostatina - Lineal-5	1139	FHWEEGIPFHVVTPYSYDRM
Miostatina - Lineal-6	1140	KRLLEQFMNDLAELVSGHS
Miostatina - Lineal-7	1141	DTRDALFQEFYEFVRSRLVI
Miostatina - Lineal-8	1142	RMSAAPRPLTYRDIMDQYWH
Miostatina - Lineal-9	1143	NDKAHFFEMFMFDVHNFVES
Miostatina - Lineal-10	1144	QTQAQKIDGLWELLQSIRNQ
Miostatina - Lineal -11	1145	MLSEFEEFLGNLVHRQEA
Miostatina - Lineal-12	1146	YTPKMGSEWTSFWHNRIHYL
Miostatina - Lineal-13	1147	LNDTLLRELKMVLNSLSDMK
Miostatina - Lineal-14	1148	FDVERDLMRWLEGFMQSAAT
Miostatina - Lineal-15	1149	HHGWNYLRKGSAPQWFEAWV
Miostatina –Lineal-16	1150	VESLHQLQMWLDQKLASGPH
Miostatina - Lineal-17	1151	RATLLKDFWQLVEGYGDN
Miostatina - Lineal-18	1152	EELLREFYRFVSAFDY
Miostatina - Lineal-19	1153	GLLDEFSHFIAEQFYQMPGG
Miostatina - Lineal-20	1154	YREMSMLEGLLDVLERLQHY
Miostatina - Lineal-21	1155	HNSSQMLLSELIMLVGSMMQ
Miostatina - Lineal-22	1156	WREHFLNSDYIRDKLIAIDG
Miostatina - Lineal-23	1157	QFPFYVFDDLPAQLEYWIA
Miostatina - Lineal-24	1158	EFFHWLHNHRSEVNHWLDMN
Miostatina - Lineal-25	1159	EALFQNFFRDVLTLSEREY

Nombre del cuerpo peptídico	SEQ ID	Secuencia peptídica
Miostatina - Lineal-26	1160	QYWEQQWMTYFRENGLHVQY
Miostatina - Lineal-27	1161	NQRMMLEDLWRIMTPMFGRS
Miostatina - Lineal-29	1162	FLDELKAELSRHYALDDLDE
Miostatina - Lineal-30	1163	GKLIEGLLNELMQLETFMPD
Miostatina - Lineal-31	1164	ILLLDEYKKDWKSWF
Miostatina-2xTN8-19 kc	1165	QGHCTRWPWMCPPYGSGSATGGSGSTASSG SGSATGQGHCTRWPWMCPPY
Miostatina-2xTN8-con6	1166	WYPCYEGHFWCYDLGSGSTASSGSGSATGWY PCYEGHFWCYDL
Miostatina-2xTN8-5 kc	1167	HTPCPWFAPLCVEWGSGSATGGSGSTASSGS GSATGHTPCPWFAPLCVEW
Miostatina-2xTN8-18 kc	1168	PDWCIDPDWWCKFWGSGSATGGSGSTASSGS GSATGPDWCIDPDWWCKFW
Miostatina-2xTN8-11 kc	1169	ANWCVSPNWFCMVMGSGSATGGSGSTASSG SGSATGANWCVSPNWFCMVM
Miostatina-2xTN8-25 kc	1170	PDWCIDPDWWCKFWGSGSATGGSGSTASSGS GSATGPDWCIDPDWWCKFW
Miostatina-2xTN8-23 kc	1171	HWACGYWPWSCKWVGSGSATGGSGSTASSG SGSATGHWACGYWPWSCKWV
Miostatina-TN8-29-19 kc	1172	KKHCQIWTWMCAPKGSGSATGGSGSTASSGS GSATGQGHCTRWPWMCPPY
Miostatina-TN8-19-29 kc	1173	QGHCTRWPWMCPPYGSGSATGGSGSTASSG SGSATGKKHCQIWTWMCAPK
Miostatina-TN8-29-19 kn	1174	KKHCQIWTWMCAPKGSGSATGGSGSTASSGS GSATGQGHCTRWPWMCPPY
Miostatina-TN8-29-19-8g	1175	KKHCQIWTWMCAPKGGGGGGGGQGHCTRWP WMCPPY
Miostatina-TN8-19-29-6gc	1176	QGHCTRWPWMCPPYGGGGGGKKHCQIWTW MCAPK

Tabla 22 - Péptidos inhibidores de miostatina

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mTN8-19-1	1177	VALHGQCTRWPWMCPPQREG

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mTN8-19-2	1178	YPEQGLCTRWPWMCPPQTLA
mTN8-19-3	1179	GLNQGHCTRWPWMCPPQDSN
mTN8-19-4	1180	MITQGQCTRWPWMCPPQPSG
mTN8-19-5	1181	AGAQEHCTRWPWMCAPNDWI
mTN8-19-6	1182	GVNQGQCTRWRWMCPPNGWE
mTN8-19-7	1183	LADHGQCIRWPWMCPPEGWE
mTN8-19-8	1184	ILEQAQCTRWPWMCPPQRGG
mTN8-19-9	1185	TQTHAQCTRWPWMCPPQWEG
mTN8-19-10	1186	VVTQGHCTLWPWMCPPQRWR
mTN8-19-11	1187	IYPHDQCTRWPWMCPPQPYP
mTN8-19-12	1188	SYWQGQCTRWPWMCPPQWRG
mTN8-19-13	1189	MWQQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-14	1190	EFTQWHCTRWPWMCPPQRSQ
mTN8-19-15	1191	LDDQWQCTRWPWMCPPQGFS
mTN8-19-16	1192	YQTQGLCTRWPWMCPPQSQR
mTN8-19-17	1193	ESNQGQCTRWPWMCPPQGGW
mTN8-19-18	1194	WTDRGPCTRWPWMCPPQANG
mTN8-19-19	1195	VGTQGQCTRWPWMCPPYETG
mTN8-19-20	1196	PYEQGKCTRWPWMCPPYEVE
mTN8-19-21	1197	SEYQGLCTRWPWMCPPQGWK
mTN8-19-22	1198	TFSQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-23	1199	PGAHDHCTRWPWMCPPQSRY
mTN8-19-24	1200	VAEEWHCRRWPWMCPPQDWR
mTN8-19-25	1201	VGTQGHCTRWPWMCPPQPAG
mTN8-19-26	1202	EEDQAHCRSWPWMCPPQGWV
mTN8-19-27	1203	ADTQGHCTRWPWMCPPQHWF
mTN8-19-28	1204	SGPQGHCTRWPWMCAPQGWF
mTN8-19-29	1205	TLVQGHCTRWPWMCPPQRWV
mTN8-19-30	1206	GMAHGKCTRWAWMCPPQSWK
mTN8-19-31	1207	ELYHGQCTRWPWMCPPQSWA
mTN8-19-32	1208	VADHGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-33	1209	PESQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-34	1210	IPAHGHCTRWPWMCPPQRWR

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mTN8-19-35	1211	FTVHGHCTRWPWMCPPYGWV
mTN8-19-36	1212	PDFPGHCTRWRWMCPPQGWE
mTN8 19-37	1213	QLWQGPCTQWPWMCPPKGRY
mTN8-19-38	1214	HANDGHCTRWQWMCPPQWGG
mTN8-19-39	1215	ETDHGLCTRWPWMCPPYGAR
mTN8-19-40	1216	GTWQGLCTRWPWMCPPQGWQ
mTN8-19 con1	1217	VATQGQCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19 con2	1218	VATQGQCTRWPWMCPPQRWG
mTN8 con6-1	1219	QREWYPCYGGHLWCYDLHKA
mTN8 con6-2	1220	ISAWYSCYAGHFWCWDLKQK
mTN8 con6-3	1221	WTGWYQCYGGHLWCYDLRRK
mTN8 con6-4	1222	KTFWYPCYDGHFWCYNLKSS
mTN8 con6-5	1223	ESRWYPCYEGHLWCFDLTET

Tabla 23 - Péptidos inhibidores de miostatina

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
L2	1224	MEMLDSLFELLKDMVPISKA
mL2-Con1	1225	RMEMLESLLELLKEIVPMSKAG
mL2-Con2	1226	RMEMLESLLELLKEIVPMSKAR
mL2-1	1227	RMEMLESLLELLKDIVPMSKPS
mL2-2	1228	GMEMLESLFELLQEIVPMSKAP
mL2-3	1229	RMEMLESLLELLKDIVPISNPP
mL2-4	1230	RIEMLESLLELLQEIVPISKAE
mL2-5	1231	RMEMLQSLLELLKDIVPMSNAR
mL2-6	1232	RMEMLESLLELLKEIVPTSNGT
mL2-7	1233	RMEMLESLFELLKEIVPMSKAG
mL2-8	1234	RMEMLGSLLELLKEIVPMSKAR
mL2-9	1235	QMELLDSLFELLKEIVPKSQPA
mL2-10	1236	RMEMLDSLLELLKEIVPMSNAR
mL2-11	1237	RMEMLESLLELLHEIVPMSQAG

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mL2-12	1238	QMEMLESLLQLLKEIVPMSKAS
mL2-13	1239	RMEMLDSLLELLKDMVPMTTGA
mL2-14	1240	RIEMLESLLELLKDMVPMANAS
mL2-15	1241	RMEMLESLLQLLNEIVPMSRAR
mL2-16	1242	RMEMLESLFDLLKELVPMSKGV
mL2-17	1243	RIEMLESLLELLKDIVPIQKAR
mL2-18	1244	RMELLESLFELLKDMVPMSDSS
mL2-19	1245	RMEMLESLLEVLQEIVPRAKGA
mL2-20	1246	RMEMLDSLLQLLNEIVPMSHAR
mL2-21	1247	RMEMLESLLELLKDIVPMSNAG
mL2-22	1248	RMEMLQSLFELLKGMVPISKAG
mL2-23	1249	RMEMLESLLELLKEIVPNSTAA
mL2-24	1250	RMEMLQSLLELLKEIVPISKAG
mL2-25	1251	RIEMLDSLLELLNELVPMSKAR
L-15	1252	HHGWNYLRKGSAPQWFEAWV
mL15-con1	1253	QVESLQQLLMWLDQKLASGPQG
mL15-1	1254	RMELLESLFELLKEMVPRSKAV
mL15-2	1255	QAVSLQHLLMWLDQKLASGPQH
mL15-3	1256	DEDSLQQLLMWLDQKLASGPQL
mL15-4	1257	PVASLQQLLIWLDQKLAQGPHA
mL15-5	1258	EVDELQQLLNWLDHKLASGPLQ
mL15-6	1259	DVESLEQLLMWLDHQLASGPHG
mL15-7	1260	QVDSLQQVLLWLEHKLALGPQV
mL15-8	1261	GDESLQHLLMWLEQKLALGPHG
mL15-9	1262	QIEMLESLLDLLRDMVPMSNAF
mL15-10	1263	EVDSLQQLLMWLDQKLASGPQA
mL15-11	1264	EDESLQQLLIYLDKMLSSGPQV
mL15-12	1265	AMDQLHQLLIWLDHKLASGPQA
mL15-13	1266	RIEMLESLLELLDEIALIPKAW
mL15-14	1267	EVVSLQHLLMWLEHKLASGPDG
mL15-15	1268	GGESLQQLLMWLDQQLASGPQR
mL15-16	1269	GVESLQQLLIFLDHMLVSGPHD
mL15-17	1270	NVESLEHLMMWLERLLASGPYA

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mL15-18	1271	QVDSLQQLLIWLDHQLASGPKR
mL15-19	1272	EVESLQQLLMWLEHKLAQGPQG
mL15-20	1273	EVDSLQQLLMWLDQKLASGPHA
mL15-21	1274	EVDSLQQLLMWLDQQLASGPQK
mL15-22	1275	GVEQLPQLLMWLEQKLASGPQR
mL15-23	1276	GEDSLQQLLMWLDQQLAAGPQV
mL15-24	1277	ADDSLQQLLMWLDRKLASGPHV
mL15-25	1278	PVDSLQQLLIWLDQKLASGPQG
L-17	1279	RATLLKDFWQLVEGYGDN
mL17-con1	1280	DWRATLLKEFWQLVEGLGDNLV
mL17-con2	1281	QSRATLLKEFWQLVEGLGDKQA
mL17-1	1282	DGRATLLTEFWQLVQGLGQKEA
mL17-2	1283	LARATLLKEFWQLVEGLGEKVV
mL17-3	1284	GSRDTLLKEFWQLVVGLGDMQT
mL17-4	1285	DARATLLKEFWQLVDAYGDRMV
mL17-5	1286	NDRAQLLRDFWQLVDGLGVKSW
mL17-6	1287	GVRETLLYELWYLLKGLGANQG
mL17-7	1288	QARATLLKEFCQLVGCQGDKLS
mL17-8	1289	QERATLLKEFWQLVAGLGQNMR
mL17-9	1290	SGRATLLKEFWQLVQGLGEYRW
mL17-10	1291	TMRATLLKEFWLFVDGQREMQW
mL17-11	1292	GERATLLNDFWQLVDGQGDNTG
mL17-12	1293	DERETLLKEFWQLVHGWGDNVA
mL17-13	1294	GGRATLLKELWQLLEGQGANLV
mL17-14	1295	TARATLLNELVQLVKGYGDKLV
mL17-15	1295	GMRATLLQEFWQLVGGQGDNWM
mL17-16	1297	STRATLLNDLWQLMKGWAEDRG
mL17-17	1298	SERATLLKELWQLVGGWGDNFG
mL17-18	1299	VGRATLLKEFWQLVEGLVGQSR
mL17-19	1300	EIRATLLKEFWQLVDEWREQPN
mL17-20	1301	QLRATLLKEFLQLVHGLGETDS
mL17-21	1302	TQRATLLKEFWQLIEGLGGKHV
mL17-22	1303	HYRATLLKEFWQLVDGLREQGV

Cuerpo peptídico madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mL17-23	1304	QSRVTLLREFWQLVESYRPIVN
mL17-24	1305	LSRATLLNEFWQFVDGQRDKRM
mL17-25	1306	WDRATLLNDFWHLMEELSQKPG
mL17-26	1307	QERATLLKEFWRMVEGLGKNRG
mL17-27	1308	NERATLLREFWQLVGGYGVNQR
L-20	1309	YREMSMLEGLLDVLERLQHY
mL20-1	1310	HQRDMSMLWELLDVLDGLRQYS
mL20-2	1311	TQRDMSMLDGLLEVLDQLRQQR
mL20-3	1312	TSRDMSLLWELLEELDRLGHQR
mL20-4	1313	MQHDMSMLYGLVELLESLGHQI
mL20-5	1314	WNRDMRMLESLFEVLDGLRQQV
mL20-6	1315	GYRDMSMLEGLLAVLDRLGPQL
mL20 con1	1316	TQRDMSMLEGLLEVLDRLGQQR
mL20 con2	1317	WYRDMSMLEGLLEVLDRLGQQR
L-21	1318	HNSSQMLLSELIMLVGSMMQ
mL21-1	1319	TQNSRQMLLSDFMMLVGSMIQG
mL21-2	1320	MQTSRHILLSEFMMLVGSIMHG
mL21-3	1321	HDNSRQMLLSDLLHLVGTMIQG
mL21-4	1322	MENSRQNLLRELIMLVGNMSHQ
mL21-5	1323	QDTSRHMLLREFMMLVGEMIQG
mL21 con1	1324	DQNSRQMLLSDLMILVGSMIQG
L-24	1325	EFFHWLHNHRSEVNHWLDMN
mL24-1	1326	NVFFQWVQKHGRVVYQWLDINV
mL24-2	1327	FDFLQWLQNHRSEVEHWLVMDV

Tabla 24 - Péptidos inhibidores de miostatina

Nombre del cuerpo peptídico	Péptido
2x mTN8–Con6–(N)–1K	M–GAQ–WYPCYEGHFWCYDL–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–WYPCYEGHFWCYDL–LE–5G–FC (SEQ ID NO: 1328)

Nombre del cuerpo peptídico	Péptido
2x mTN8–Con6–(C)–1K	FC–5G–AQ–WYPCYEGHFWCYDL–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–WYPCYEGHFWCYDL–LE (SEQ ID NO: 1329)
2x mTN8–Con7–(N)–1K	M–GAQ–IFGCKWWDVQCYQF–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–IFGCKWWDVQCYQF–LE–5G–FC (SEQ ID NO: 1330)
2x mTN8–Con7–(C)–1K	FC–5G–AQ–IFGCKWWDVQCYQF–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–IFGCKWWDVQCYQF–LE (SEQ ID NO: 1331)
2x mTN8–Con8–(N)–1K	M–GAQ–IFGCKWWDVDCYQF–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–IFGCKWWDVDCYQF–LE–5G–FC (SEQ ID NO: 1332)
2x mTN8–Con8–(C)–1K	FC–5G–AQ–IFGCKWWDVDCYQF–GSGSATGGSGSTASSGSGSATG–IFGCKWWDVDCYQF–LE (SEQ ID NO: 1333)
2X mTN8–19–7	FC–5G–AQ–LADHGQCIRWPWMCPPEGWELEGSGSATGGSGSTASSGSGSATGLADHGQCIRWPWMCPPEGWE–LE (SEQ ID NO: 1334)
2X mTN8–19–7 ST—GG del2x LE	FC–5G–AQ–LADHGQCIRWPWMCPPEGWEGSGSATGGSGGGASSGSGSATGLADHGQCIRWPWMCPPEGWE (SEQ ID NO: 1335)
2X mTN8–19–21	FC–5G–AQ–SEYQGLCTRWPWMCPPQGWKLEGSGSATGGSGSTASSGSGSATGSEYQGLCTRWPWMCPPQGWK–LE (SEQ ID NO: 1336)
2X mTN8–19–21 ST—GG del2x LE	FC–5G–AQ–SEYQGLCTRWPWMCPPQGWKGSGSATGGSGGGASSGSGSATGSEYQGLCTRWPWMCPPQGWK (SEQ ID NO: 1337)

Nombre del cuerpo peptídico	Péptido
2X mTN8–19–22	FC–5G–AQ–TFSQGHCTRWPWMCPPQGWGLEGSGSATGGSGSTASSGSGSATGTFSQGHCTRWPWMCPPQGWG–L E (SEQ ID NO: 1338)
2X mTN8–19–32	FC–5G–AQ–VADHGHCTRWPWMCPPQGWGLEGSGSATGGSGSTASSGSGSATGVADHGHCTRWPWMCPPQGWG–LE (SEQ ID NO: 1339)
2X mTN8–19–32 ST—GG del2x LE	FC–5G–AQ–VADHGHCTRWPWMCPPQGWGGSGSATGGSGGGASSGSGSATGVADHGHCTRWPWVCPPQGWG (SEQ ID NO: 1340)
2X mTN8–19–33	FC–5G–AQ–PESQGHCTRWPWMCPPQGWGLEGSGSATGGSGSTASSGSGSATGPESQGHCTRWPWMCPPQGWGLE (SEQ ID NO: 1341)
2X mTN8–19–33 ST—GG del2x LE	FC–5G–AQ–PESQGHCTRWPWMCPPQGWGGSGSATGGSGGGASSGSGSATGPESQGHCTRWPWMCP PQGWG (SEQ ID NO: 1342)

Tabla 25 - Secuencias de péptidos antagonistas de integrina

Secuencia/estructura	SEQ. ID NO:
CLCRGDCIC	1344
CWDDGWLC	1345
CWDDLWWLC	1346
CWDDGLMC	1347
CWDDGWMC	1348
CSWDDGWLC	1349
CPDDLWWLC	1350
NGR	1351
GSL	1352
RGD	1353

Secuencia/estructura	SEQ. ID NO:
CGRECPRLCQSSC	1354
CNGRCVSGCAGRC	1355
CLSGSLSC	1356
GSL	1357
NGRAHA	1358
CNGRC	1359
CDCRGDCFC	1360
CGSLVRC	1361
DLXXL	1362
RTDLDSLRTYTL	1363
RTDLDSLRTY	1364
RTDLDSLRT	1365
RTDLDSLR	1366
GDLDLLKLRLTL	1367
GDLHSLRQLLSR	1368
RDDLHMLRLQLW	1369
SSDLHALKKRYG	1370
RGDLKQLSELTW	1371
CXXRGDC	1372
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	1373
stggfddvydwarrvssaltttlvatr	1374
srgvnfsewlydmsaamkeasnvfpsrrsr	1375
SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	1376
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	1377
SSTGWVDLLGALQRAADATRTSIPPSLQNSR	1378
DVYTKKELIECARRVSEK	1379
RGDGX	1380
CRGDGXC	1381
CARRLDAPC	1382
CPSRLDSPC	1383
CDCRGDCFC	1384
CDCRGDCLC	1385
RGDLAALSAPPV	1386

Tabla 26 - Secuencias de péptidos antagonistas de selectina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
DITWDQLWDLMK	1387
DITWDELWKIMN	1388
DYTWFELWDMMQ	1389
QITWAQLWNMMK	1390
DMTWHDLWTLMS	1391
DYSWHDLWEMMS	1392
EITWDQLWEVMN	1393
HVSWEQLWDIMN	1394
HITWDQLWRIMT	1395
RNMSWLELWEHMK	1396
AEWTWDQLWHVMNPAESQ	1397
HRAEWLALWEQMSP	1398
KKEDWLALWRIMSV	1399
ITWDQLWDLMK	1400
DITWDQLWDLMK	1401
DITWDQLWDLMK	1402
DITWDQLWDLMK	1403
CQNRYTDLVAIQNKNE	1404
AENWADNEPNNKRNNED	1405
RKNNKTWTWVGTKKALTNE	1406
KKALTNEAENWAD	1407
CQXRYTDLVAIQNKXE	1408
AENWADGEPNNKXNXED	1409

Tabla 27 - Péptidos de enlace a vinculina

Secuencia/estructura	SEQ. ID NO:
SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	1410
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	1411
SSTGWVDLLGALQRAADATRTSIPPSLQNSR	1412
DVYTKKELIECARRVSEK	1413
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	1414
stggfddvydwarrvssaltttlvatr	1415
srgvnisevlydmsaamkeasnvfpsrrsr	1416

Tabla 28 - Secuencias de péptidos relacionados con laminina

Secuencia/estructura	SEQ. ID NO:
YIGSRYIGSR [i.e., (YIGSR)2]	1417
YIGSRYIGSRYIGSR [i.e., (YIGSR)3]	1418
YIGSRYIGSRYIGSRYIGSR [i.e., (YIGSR)4]	1419
YIGSRYIGSRYIGSRYIGSRYIGSR [i.e., (YIGSR)5]	1420
IPCNNKGAHSVGLMWWMLAR	1421
YIGSRREDVEILDVPDSGR	1422
RGDRGDYIGSRRGD	1423
YIGSRYIGSRYIGSRYIGSRYIGSR	1424
REDVEILDVYIGSRPDSGR	1425
YIGSRREDVEILDVPDSGR	1426

Tabla 29 - Péptidos moduladores de NGF

SEQ ID NO	Secuencia de la porción peptídica del producto de fusión de Fc-péptido
1427	TGYTEYTEEWPMGFGYQWSF
1428	TDWLSDFPFYEQYFGLMPPG
1429	FMRFPNPWKLVEPPQGWYYG
1430	VVKAPHFEFLAPPHFHEFPF
1431	FSYIWIDETPSNIDRYMLWL
1432	VNFPKVPEDVEPWPWSLKLY
1433	TWHPKTYEEFALPFFVPEAP
1434	WHFGTPYIQQQPGVYWLQAP
1435	VWNYGPFFMNFPDSTYFLHE
1436	WRIHSKPLDYSHVWFFPADF
1437	FWDGNQPPDILVDWPWNPPV
1438	FYSLEWLKDHSEFFQTVTEW
1439	QFMELLKFFNSPGDSSHHFL
1440	TNVDWISNNWEHMKSFFTED
1441	PNEKPYQMQSWFPPDWPVPY
1442	WSHTEWVPQVWWKPPNHFYV
1443	WGEWINDAQVHMHEGFISES
1444	VPWEHDHDLWEIISQDWHIA
1445	VLHLQDPRGWSNFPPGVLEL
1446	IHGCWFTEEGCVWQ

SEQ ID NO	Secuencia de la porción peptídica del producto de fusión de Fc-péptido
1447	YMQCQFARDGCPQW
1448	KLQCQYSESGCPTI
1449	FLQCEISGGACPAP
1450	KLQCEFSTSGCPDL
1451	KLQCEFSTQGCPDL
1452	KLQCEFSTSGCPWL
1453	IQGCWFTEEGCPWQ
1454	SFDCDNPWGHVLQSCFGF
1455	SFDCDNPWGHKLQSCFGF

Tabla 30 - Péptidos moduladores de TALL

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
LPGCKWDLLIKQWVCDPL-Λ-V1	1456
V1- Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL	1457
LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ -V1	1458
V1- Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL	1459
SADCYFDILTKSDVCTSS- Λ -V1	1460
V1- Λ - SADCYFDILTKSDVCTSS	1461
SADCYFDILTKSDVTSS- Λ - SADCYFDILTKSDVTSS - Λ -V1	1462
V1- Λ - SADCYFDILTKSDVTSS - Λ - SADCYFDILTKSDVTSS	1463
FHDCKWDLLTKQWVCHGL- Λ -V1	1464
V1- Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL	1465
FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ -V1	1466
V1- Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL	1467

Tabla 31 - Cuerpos peptídicos inhibidores de TALL-1

Cuerpo peptídico	SEQ ID NO del cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
TALL-1-8-1-a	1468	MPGTCFPFPW ECTHAGGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
TALL-1-8-2-a	1469	MWGACWPFPW ECFKEGGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
TALL-1-8-4-a	1470	MVPFCDLLTK HCFEAGGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VFLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDELT KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTPPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
TALL-1-12-4-a	1471	MGSRCKYKWD VLTKQCFHHG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-3-a	1472	MLPGCKWDLL IKQWVCDPLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF

Cuerpo peptídico	SEQ ID NO del cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
		LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-5-a	1473	MSADCYFDIL TKSDVCTSSG GGGG VDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-8-a	1474	MSDDCMYDQL TRMFICSNLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-9-a	1475	MDLNCKYDEL TYKEWCQFNG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-10-a	1476	MFHDCKYDLL TRQMVCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-11-a	1477	MRNHCFWDHL LKQDICPSPG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD

Cuerpo peptídico	SEQ ID NO del cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
		VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-14-a	1478	MANQCWWDSL TKKNVCEFFG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-consenso	1479	MFHDCKWDLL TKQWVCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1 12-3 dímero en tándem	1480	MLPGCKWDLL IKQWVCDPLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMLPGCKWDL LIKQWVCDPL GGGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK
TALL-1 dímero de consenso en tándem	1481	MFHDCKWDLL TKQWVCHGLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMFHDCKWDL LTKQWVCHGL GGGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP PKPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK

Cuerpo peptídico	SEQ ID NO del cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
		FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QYNSTYRVVS VLTVLHQDWL NGKEYKCKVS NKALPAPIEK TISKAKGQPR EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDSDGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLS PGK

Tabla 32 Péptidos inhibidores de Ang-2

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia peptídica
Con4-44	1482	PIRQEECDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	1483	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	1484	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	1485	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	1486	AATQEECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	1487	LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW
Con4-35	1488	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	1489	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	1490	WAAQEECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	1491	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	1492	GHSQEECGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	1493	QHWQEECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	1494	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	1495	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	1496	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	1497	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	1498	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM
Con4-25	1499	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	1500	HGQNMECEWDPWTCEHMFRY
Con4-38	1501	PRLQEECVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	1502	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	1503	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS
Con4-20	1504	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	1505	WAQQEECAWDPWTCDHMVGL
Con4-37	1506	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS
Con4-33	1507	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia peptídica
AC2-Con4	1508	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	1509	KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP
Con4-17	1510	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	1511	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	1512	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW
Con4-1	1513	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	1514	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	1515	TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	1516	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	1517	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	1518	VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ
Con4-16	1519	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	1520	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	1521	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	1522	TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT
Con4-15	1523	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	1524	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG
TN8-Con4*	1525	QEECEWDPWTCEHM

Tabla 33 Péptidos inhibidores de Ang-2

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia peptídica
L1-1	1526	QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT
L1-2	1527	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	1528	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	1529	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	1530	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	1531	TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG
L1-9	1532	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	1533	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	1534	QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS
L1-12	1535	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	1536	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	1537	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	1538	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG
L1-16	1539	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia peptídica
L1-17	1540	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ
L1-18	1541	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	1542	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	1543	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	1544	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL
L1-22	1545	YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA
AC6-L1	1546	TNYKPLDELDATLYEHWILQHS
L1-C1	1547	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	1548	TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1-C3	1549	TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR
L1	1550	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

Tabla 34 Péptidos inhibidores de Ang-2

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia
Con1-1	1551	AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA
Con1-2	1552	QTWDDPCMHILGPVTWRRCI
Con1-3	1553	APGQRPYDGMLGWPTYQRIV
Con1-4	1554	SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL
Con1-5	1555	FGDKRPLECMFGGPIQLCPR
Con1-6	1556	GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG
Con1	1557	KRPCEEIFGGCTYQ

Tabla 35 Péptidos inhibidores de Ang-2

Péptido	SEQ ID NO:	Secuencia
12-9-1	1558	GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT
12-9-2	1559	KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS
12-9-3	1560	LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9-4	1561	AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK
12-9-5	1562	LLDYCEGVQDPFTFGCENLD
12-9-6	1563	HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG
12-9-7	1564	MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM
12-9-C2	1565	LQDYCEGVEDPFTFGCENQR
12-9-C1	1566	LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR
12-9	1567	FDYCEGVEDPFTFGCDNH

5

Tabla 36 Péptidos de enlace a Ang-2

Péptido	SEQ ID NO	Secuencia
TN8-8	1568	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	1569	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	1570	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	1571	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	1572	FDYCEGVEDPFTFGCDNH
L1	1573	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ
C17	1574	QYGCDGFLYGCMIN

Tabla 37 Péptidos de enlace a Ang-2

Cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1575)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1576)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSG SGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1577)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGGKFNP LDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1578)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLDEL EETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1579)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1580)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSA THLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1581)
2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSG SGSATHQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1582)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:1583)
L1 (C) 1K	M-Fc-

Cuerpo peptídico	Secuencia peptídica
	GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLD ELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:1584)
2xL1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGG KFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:1585)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1586)
Con4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEW DPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1587)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc-GGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTA SSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1588)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGGKFNPLDELE ETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEG GGGG-Fc (SEQ ID NO:1589)
Con4-L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQGSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLD ELEETLYEQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1590)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVEDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:1591)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCMINLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:1592)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1593)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1594)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1595)

Tabla 38 Péptidos de enlace a Ang-2

Cuerpo peptídico madurado por afinidad derivado de Con4	Secuencia del cuerpo peptídico (SEQ ID NO)
Con4-44 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PIRQEECDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 1596)
Con4-40 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 1597)
Con4-4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 1598)
Con4-31 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 1599)
Con4-C5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 1600)
Con4-42 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LRHQEGCEWDPWTCEHMFDW-LE (SEQ ID NO: 1602)
Con4-35 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 1602)
Con4-43 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 1603)
Con4-49 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 1604)
Con4-27 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 1605)
Con4-48 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 1606)
Con4-46 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 1607)
Con4-41 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 1608)
Con4-36 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 1609)
Con4-34 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VKTQEHCDWDPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 1610)
Con4-28 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE (SEQ ID NO: 1611)

Con4-39 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 1612)
Con4-25 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 1613)
Con4-50 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFRY-LE (SEQ ID NO: 1614)
Con4-38 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQEECVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 1615)
Con4-29 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 1616)
Con4-47 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS-LE (SEQ ID NO: 1617)
Con4-20 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 1618)
Con4-45 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WAQQEECAWDPWTCDHMVGL-LE (SEQ ID NO: 1619)
Con4-37 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS-LE (SEQ ID NO: 1620)
Con4-33 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 1621)
AC2-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 1622)
Con4-32 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMVGP-LE (SEQ ID NO: 1623)
Con4-17 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 1624)
Con4-8 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 1625)
AC4-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1626)
Con4-1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 1627)
Con4-C1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 1628)
Con4-21 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TKGKSVCQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 1629)
Con4-C2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 1630)

Con4-18 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQ ID NO: 1631)
Con4-19 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VVQVGMCQWDPWTCKHMRLQ-LE (SEQ ID NO: 1632)
Con4-16 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 1633)
Con4-11 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 1634)
Con4-C4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 1635)
Con4-23 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TSQRVGCEWDPWTCQHLTYT-LE (SEQ ID NO: 1636)
Con4-15 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 1637)
Con4-9 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEQ ID NO: 1638)
Con4-10 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 1639)
Con4-22 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 1640)
Con4-3 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 1641)
Con4-5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 1642)
Con4-30 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 1643)
Con4-26 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 1644)
Con4-7 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 1645)
Con4-12 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 1646)
Con4-13 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1647)
Con4-14 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 1648)
Con4-2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1649)

Con4-6 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 1650)
Con4-24 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQ ID NO: 1651)
AC1-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1652)
AC3-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1653)
AC5-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1654)
Cuerpo peptídico madurado por afinidad derivado de L1	Secuencia del cuerpo peptídico (SEQ ID NO)
L1-7 (N)	MGAQ-TNFMPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1655)
AC6-L1 (N)	MGAQ-TNYKPLDELDATLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1656)
L1-15 (N)	MGAQ-QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1657)
L1-2 (N)	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1658)
L1-10 (N)	MGAQ-QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1659)
L1-13 (N)	MGAQ-QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1660)
L1-5 (N)	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1661)
L1-C2 (N)	MGAQ-TKFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1662)
L1-C3 (N)	MGAQ-TNFQPLDELDQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1663)
L1-11 (N)	MGAQ-QNFKPMDELEDTLYKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1664)
L1-17 (N)	MGAQ-VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1665)
L1-12 (N)	MGAQ-YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1666)

L1-1 (N)	MGAQ-QNYKPLDELDATLYEHFIFHYT LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1667)
L1-4 (N)	MGAQ-VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1668)
L1-20 (N)	MGAQ-EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1669)
L1-22 (N)	MGAQ-YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1670)
L1-14 (N)	MGAQ-SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1671)
L1-16 (N)	MGAQ-QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1672)
L1-18 (N)	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1673)
L1-3 (N)	MGAQ-TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1674)
L1-21 (N)	MGAQ-HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1675)
L1-C1 (N)	MGAQ-QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1676)
L1-19 (N)	MGAQ-QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1677)
L1-9 (N)	MGAQ-SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1678)
Cuerpo peptídico madurado por afinidad derivado de Con1	Secuencia del cuerpo peptídico (SEQ ID NO)
Con1-4 (C)	M-Fc-gggggaq-SGQLRPCEEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 1679)
Con1-1 (C)	M-Fc-gggggaq-AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 1680)
Con1-6 (C)	M-Fc-gggggaq-GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 1681)
Con1-3 (C)	M-Fc-gggggaq-APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 1682)
Con1-2 (C)	M-Fc-gggggaq-QTWDDPCMHILGPVTWRRCI-LE (SEQ ID NO: 1683)

Con1-5 (C)	M-Fc-gggggaq-FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 1684)
Padre: Con1 (C)	M-Fc-gggggaq-KRPCEEIFGGCTYQ-LE (SEQ ID NO: 1685)
Cuerpo peptídico madurado por afinidad derivado de 12-9	Secuencia del cuerpo peptídico (SEQ ID NO)
12-9-3 (C)	M-Fc-gggggaq-LQEWCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 1686)
12-9-7 (C)	M-Fc-gggggaq-MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 1687)
12-9-6 (C)	M-Fc-gggggaq-HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 1688)
12-9-C2 (C)	M-Fc-gggggaq-LQDYCEGVEDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 1689)
12-9-5 (C)	M-Fc-gggggaq-LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 1690)
12-9-1 (C)	M-Fc-gggggaq-GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 1691)
12-9-4 (C)	M-Fc-gggggaq-AQDYCEGMEDPFTFGCEMQK-LE (SEQ ID NO: 1692)
12-9-C1 (C)	M-Fc-gggggaq-LQDYCEGVEDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 1693)
12-9-2 (C)	M-Fc-gggggaq-KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 1694)
Padre: 12-9 (C)	M-Fc-gggggaq-FDYCEGVEDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 1695)

Además de los compuestos de TMP mencionados en la Tabla 6, la invención proporciona otros numerosos compuestos de TMP. En un aspecto, los compuestos de TMP comprenden la siguiente estructura general:

TMP_1-$(L_1)_n$-TMP_2

donde cada uno de TMP1 y TMP2 se selecciona independientemente del grupo de los compuestos que comprenden la estructura central:

X_2-X_3-X_4-X_5-X_6-X_7-X_8-X_9-X_{10},

donde

X2 se selecciona del grupo conformado por Glu, Asp, Lys y Val;

X3 se selecciona del grupo conformado por Gly y Ala;

X4 es Pro;

X5 se selecciona del grupo conformado por Thr y Ser;

X6 se selecciona del grupo conformado por Leu, Ile, Val, Ala y Phe;

X7 se selecciona del grupo conformado por Arg y Lys;

X8 se selecciona del grupo conformado por Gln, Asn y Glu;

X9 se selecciona del grupo conformado por Trp, Tyr y Phe;

X10 se selecciona del grupo conformado por Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met y Lys;

L1 es un enlazador como se describe en la presente invención; y

n es 0 ó 1;

y sus sales fisiológicamente aceptables.

En una forma de realización, L1 comprende (GLY)n, donde n es de 1 a 20, y cuando n es mayor que 1, hasta la mitad de los residuos Gly pueden ser sustituidos por otro aminoácido seleccionado de los 19 aminoácidos naturales restantes o uno de sus estereoisómeros.

Además de la estructura central X2-X10 indicada anteriormente para TMP1 y TMP2, otras estructuras relacionadas también son posibles, donde uno o más de los siguientes se añade a la estructura central de TMP1 y/o TMP2: X1 se enlaza al extremo N terminal y/o X11, X12, X13, y/o X14 se enlazan al extremo C terminal, donde X1, X12, X13, y X14 son los siguientes:

X1 se selecciona del grupo conformado por Ile, Ala, Val, Leu, Ser y Arg;

X11 se selecciona del grupo conformado por Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His y Glu;

X12 se selecciona del grupo conformado por Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser y Gln;

X13 se selecciona del grupo conformado por Arg, Lyx, Thr, Val, Asn, Gln y Gly; y

X14 se selecciona del grupo conformado por Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu y Gly.

Los compuestos de TMP de la invención están conformados por, es decir que comprenden, por lo menos 9 subunidades (X2-X10), donde X2-X10 comprenden la estructura central. Las subunidades X2-X14 son aminoácidos independientemente seleccionados entre los 20 aminoácidos naturales, sin embargo, la invención abarca los compuestos donde X2-X14 se seleccionan independientemente del grupo de aminoácidos atípicos, no naturales, bien conocidos en la técnica. Los aminoácidos específicos se encuentran identificados para cada posición. Por ejemplo, X2 puede ser Glu, Asp, Lys o Val. En la presente se utilizan abreviaturas tanto de tres letras como de una letra; en cada caso, las abreviaturas son las estándar que se utilizan para los 20 aminoácidos naturales o sus variantes conocidas. Estos aminoácidos pueden tener estereoquímica L ó D (con excepción de Gly, que no es L ni D), y los TMP (así como todos los otros compuestos de la invención) pueden comprender una combinación de las estereoquímicas. La invención también proporciona las moléculas TMP inversas (así

como para todos los demás péptidos divulgados en la presente invención), donde se invierte la secuencia amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos. Por ejemplo, la inversión de una molécula que tiene la secuencia normal X1-X2-X3 sería X3-X2-X1. La invención también proporciona moléculas TMP retro-inversas (así como para todas las demás moléculas de la invención descriptas en la presente) donde, como un TMP inverso, la secuencia amino terminal a carboxi terminal de los aminoácidos se invierte y los residuos que son normalmente enantiómeros "L" en TMP se alteran para adoptar la forma de estereoisómero "D".

Los compuestos de TMP ejemplares de la invención, por consiguiente, incluyen, a título enunciativo, los siguientes compuestos:

IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 993)

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cíclico)

|_____|

IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineal) (SEQ. ID NO: 994)

(SEQ. ID NO: 995)

IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ. ID NO: 996)

IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 997)

IEGPTLRQWLAARA GGGK(BrAc)GGGG-IEGPTLRQWLAARA

(SEQ. ID NO: 998)

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 999)

IEGPTLRQWLAARA-GGGK(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA

(SEQ. ID NO: 1000)

IEGPTLRQWLAARA-GGGC(PEG)GGGG-IEGPTLRQWLAARA

(SEQ. ID NO: 1001)

IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1002)

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA

|

|IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1003)

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1004)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1005)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ. ID NO: 1006)

IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA-Fc (SEQ. ID NO: 1007)

Fc-GG-IEGPTLRQWLAARA-GPNG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1008)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1009)

Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cíclico)
|_____| (SEQ. ID NO: 1010)

Fc-IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineal)
(SEQ. ID NO: 1011)

Fc-IEGPTLRQALAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQALAARA (SEQ. ID NO: 1012)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGKGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1013)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1014)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGNGSGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1015)

Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA
|
Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1016)

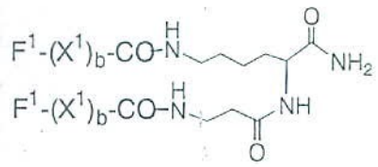
Fc-GGGGG-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA
(SEQ. ID NO: 1017)

Derivados

La invención también contempla derivar el péptido y/o la porción del vehículo (como se trata más adelante) de los compuestos. Dichos derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica y demás, de los compuestos. Como alternativa, las fracciones pueden eliminar o atenuar cualquier efecto colateral indeseable de los compuestos y similares. Los ejemplos de derivados incluyen compuestos en los cuales:

1. El compuesto o parte de éste es cíclico. Por ejemplo, la parte peptídica puede modificarse para contener dos o más residuos Cys (por ejemplo, en el enlazador), que se pueden ciclizar por la formación del enlace disulfuro. Para ver citas de referencias sobre la preparación de derivados ciclizados, véase la Tabla 2

2. El compuesto es reticulado o tiene la capacidad de reticularse entre las moléculas. Por ejemplo, la fracción peptídica puede modificarse para que contenga un residuo Cys y, por lo tanto, puede formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar. El compuesto también puede ser reticulado a través de su extremo C terminal, tal como en la molécula que se muestra más abajo.



3. Uno o más ligamientos peptidilo [-C(O)NR-] (enlaces) se reemplazan por un ligamiento no-peptidilo. Los ejemplos de ligaduras no-peptidilo son -CH2-carbamato [-CH2-OC(O)NR-], fosfonato, -CH2-sulfonamida [-CH2-S(O)2NR-], urea [-NHC(O)NH-], -CH2-amina secundaria y péptido alquilado [-C(O)NR6- donde R6 es alquilo inferior].

4. El extremo N terminal es derivado. Típicamente, el extremo N terminal puede acilarse o modificarse en una amina sustituida. Los ejemplos de grupos con extremo N terminal derivado incluyen -NRR1 (fuera de -NH2), -NRC(O)R1, -NRC(O)OR1, -NRS(O)2R1, -NHC(O)NHR1, succinimida, o benciloxicarbonilo-NH- (CBZ-NH-), donde R y R1 son cada uno, en forma independiente, hidrógeno o alquilo inferior y donde el anillo fenilo puede estar sustituido con 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consta de alquilo C1-C4, alcoxi C1-C4, cloro y bromo.

5. Se deriva el extremo C terminal libre. Típicamente, el extremo C-terminal se esterifica o amida. Por ejemplo, se pueden utilizar los métodos descriptos en la técnica para agregar (NH-CH2-CH2-NH2)2 a los compuestos de la presente invención. Del mismo modo, se pueden utilizar los métodos descriptos en la técnica para agregar -NH2 a los compuestos de la presente invención. Los ejemplos de grupos con extremo C-terminal derivado incluyen -C(O)R2, donde R2 es alcoxi inferior o -NR3R4, donde R3 y R4 son, en forma independiente, hidrógeno o alquilo C1-C8 (con preferencia alquilo C1-C4).

6. Un enlace disulfuro se reemplaza con otra fracción de reticulación, con preferencia más estable (por ejemplo, un alquileno). Ver, por ejemplo, Bhatnagar y colaboradores, (1996), J. Biol. Chem. 39: 3814-9; Alberts y colaboradores, (1993) Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9.

7. Se modifican uno o más residuos de aminoácidos individuales. Se sabe que son varios los agentes derivadores que reaccionan específicamente con las cadenas laterales o los residuos terminales seleccionados, tal como se describe más adelante.

8. Los polímeros heterobifuncionales son usados típicamente para enlazar proteínas. Un ejemplo es SMCC, o succinimidil-4-(N-maleimidometil) ciclohexano-1-carboxilato. El extremo NHS (N-hidroxilsuccinimida) reacciona con aminas primarias, que tras la conjugación a pH ~7 resulta óptimo. Una vez que se forma el complejo, la reacción de la porción maleimida de SMCC puede proseguir con otra proteína/péptido que contiene un grupo sulfhidrilo libre, que se produce a una velocidad mucho más rápida que la formación de la amida en la reacción inicial. El resultado es un enlace entre dos proteínas, por ejemplo, conjugados anticuerpo-enzimas. Se ilustra una aplicación mediante la preparación de fragmentos Fab' reticulados para peroxidasa de rábano picante (Ishikwa, y otros, 1983a, b; Yoshitake y otros, 1982a,b; Imagawa y otros; Uto y

otros, 1991). El uso de sulfo SMCC (sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexano-1-carboxilato) permite la solubilidad del agua de manera que no sea necesario un paso de solubilización orgánica, permitiendo la mayor flexibilidad y menor interrupción de la actividad al reaccionar con las proteínas.

Los residuos lisinilo y los residuos amino terminal pueden hacerse reaccionar con anhídrido de ácido succínico u otro anhídrido de ácido carboxílico, que invierten la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres, tales como metil picolinimidato; piridoxal fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4 pentanodiona; y reacción catalizada con transaminasa con glioxilato.

Los residuos arginilo pueden modificarse mediante la reacción con cualquiera o con una combinación de varios reactivos convencionales, incluso fenilglioxalo, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivación de los residuos arginilo requiere que la reacción se realice en condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo funcional guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina, así como con el grupo arginina épsilon-amino.

La modificación específica de los residuos tirosilo fue ampliamente estudiada, y se puso interés especial en la introducción de etiquetas espectrales en los residuos tirosilo mediante la reacción con compuestos de diazonio aromático o tetranitrometano. Lo más frecuente es que se utilicen N-acetilimidizol y tetranitrometano para formar especies O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.

Los grupos de cadenas laterales carboxilo (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse selectivamente mediante la reacción con carbodiimidas (R'-N=C=N-R'), tal como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil) carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4,4-dimetilpentil) carbodiimida. Además, los residuos aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos asparaginilo y glutaminilo mediante la reacción con iones amonio.

Los residuos glutaminilo y asparaginilo pueden desamidarse en los correspondientes residuos glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se desamidan bajo condiciones moderadamente ácidas. Cualquier forma de estos residuos se encuentra comprendida dentro del alcance de la presente invención.

Los residuos cisteinilo pueden reemplazarse por residuos de aminoácidos u otras fracciones para eliminar el enlace disulfuro o, por el contrario, para estabilizar la reticulación. Ver, por ejemplo, Bhatnagar y colaboradores, (1996), J. Biol. Chem. 39: 3814-9.

La derivación con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales en una matriz de soporte no-hidrosoluble o en otros portadores macromoleculares. Los agentes de reticulación que se usan habitualmente incluyen, por ejemplo: 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluso ésteres de disuccinimidilo, tales como 3,3'-

ditiobis(succinimidilpropionato) y maleimidas bifuncionales, tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Los agentes de derivación, tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]-propioimidato proporcionan sustancias intermedias foto-activables que tienen la capacidad de formar entrecruzamientos en la presencia de la luz. Como alternativa, las matrices no-hidrosolubles reactivas, tales como los carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos que se describen en la patentes estadounidenses números 3.969.287, 3.691.016, 4.195.128, 4.247.642, 4.229.537 y 4.330.440, se emplean para la inmovilización de proteínas.

Los grupos de carbohidratos (oligosacáridos) pueden unirse de manera conveniente a sitios que se conocen como sitios de glicosilación en proteínas. En general, los oligosacáridos con ligadura O- se unen a residuos serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos con ligadura N- se unen a residuos asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Con preferencia, X es uno de los diecinueve aminoácidos naturales fuera de la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos con ligadura N- u O- y los residuos azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (al que se hace referencia como ácido siálico). Usualmente, el ácido siálico es el residuo terminal de los oligosacáridos, tanto con ligamiento N- como con ligamiento O- y, en virtud de su carga negativa, pueden conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dichos sitios pueden incorporarse al enlazador de los compuestos de la presente invención y, con preferencia, se glicosilan a través de una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamíferos, tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, dichos sitios pueden, además, glicosilarse a través de procedimientos sintéticos o semisintéticos que son conocidos en la técnica

Otras posibles modificaciones incluyen la hidroxilación de prolina y lisina, fosforilación de grupos hidroxilo de residuos serilo o treonilo, oxidación del átomo de azufre en Cys, metilación de los grupos alfa-amino de lisina, arginina y cadenas laterales histidina. Creighton, Proteins:_ Structure and Molecule Properties (W. H. Freeman and Co., San Francisco), páginas 79-86 (1983).

Los compuestos de la presente invención también pueden cambiarse en el nivel de ADN. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede cambiarse en codones más compatibles con la célula hospedante elegida. Para E. coli, que es la célula hospedante preferida, en la técnica se conocen los codones optimizados. Los codones pueden sustituirse para eliminar los sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosa, que colaboran en el procesamiento de ADN en la célula hospedante seleccionada. El vehículo, el enlazador y las secuencias peptídicas de ADN pueden modificarse para incluir cualquiera de los cambios de secuencia que se indicaron previamente.

Derivados conjugados en isótopos y toxinas. Otro grupo de derivados de utilidad son las moléculas que se describieron previamente conjugadas en toxinas, trazadores o radioisótopos. Dicha conjugación resulta especialmente conveniente para las moléculas que comprenden secuencias peptídicas que se enlazan a células tumorales o patógenos. Dichas moléculas pueden emplearse como agentes terapéuticos o como un elemento auxiliar para la cirugía (por ejemplo, cirugía radioinmunoguiada o RIGS) o como agentes de diagnóstico (por ejemplo, radioinmunodiagnóstico o RID).

Como agentes terapéuticos, estos derivados conjugados presentan una cantidad de ventajas. Facilitan el empleo de toxinas y radioisótopos que serían tóxicos si se administrasen sin el enlace específico provisto por la secuencia peptídica. También pueden reducir los efectos colaterales que son inherentes al uso de radioterapia o quimioterapia porque facilitan la administración de menores dosis eficaces del compañero de la conjugación.

Entre los compañeros de la conjugación convenientes se incluyen:

- radioisótopos, tales como 90Itrio, 131Yodo, 225Actinio y 213Bismuto;
- toxina de ricino A, toxinas derivadas en forma microbiana, tal como endotoxina de pseudomonas (por ejemplo, PE38, PE40), y demás similares;
- moléculas compañeras en los sistemas de captura (ver más adelante);
- biotina, estreptavidina (que es útil como moléculas compañeras en los sistemas de captura o como trazadores, especialmente para su empleo con fines diagnósticos); y
- agentes citotóxicos (por ejemplo, dexorubicina).

Una adaptación útil de estos derivados conjugados es el empleo en un sistema de captura. En dicho sistema, la molécula de la presente invención comprende una molécula de captura benigna. Esta molécula de captura podría enlazarse específicamente a una molécula efectora separada que comprende, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo. Tanto la molécula conjugada en vehículo como la molécula efectora se administran al paciente. En dicho sistema, la molécula efectora tiene una semivida corta, excepto cuando está enlazada a la molécula de captura conjugada en vehículo, con lo cual se minimiza cualquier efecto colateral tóxico. La molécula conjugada en vehículo tiene una semivida relativamente larga, pero sería benigna y no-tóxica. Las porciones de enlace específicas de ambas moléculas pueden ser parte de un par de enlace específico conocido (por ejemplo, biotina, estreptavidina), o pueden ser el resultado de los métodos generadores de péptidos, tales como los que se describen en la presente.

Dichos derivados conjugados pueden elaborarse con métodos conocidos en la técnica. En el caso de moléculas efectoras de proteínas (por ejemplo, endotoxinas de pseudomonas), dichas moléculas pueden expresarse como proteínas de fusión de los constructos de ADN correlativos. Los derivados conjugados por radioisótopos pueden prepararse, por ejemplo, de la manera descripta para el anticuerpo BEXA (Coulter). Los derivados que comprenden agentes citotóxicos o toxinas microbianas pueden elaborarse, por ejemplo, según se describe para el anticuerpo BR96 (Bristol-Myers Squibb). Las moléculas

empleadas en los sistemas de captura pueden elaborarse, por ejemplo, de la manera descripta en las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones de NeoRx. Las moléculas empleadas para RIGS y RID pueden elaborarse, por ejemplo, de la manera descripta en las patentes, solicitudes de patentes y publicaciones de NeoProbe.

Vehículos

La invención requiere la presencia de por lo menos un vehículo unido a un péptido a través del extremo N terminal, el extremo C terminal o una cadena lateral de uno de los residuos de aminoácidos. También se pueden usar múltiples vehículos. En un aspecto, un dominio Fc es el vehículo. El dominio Fc puede fusionarse en el extremo N o C terminal de los péptidos o en ambos extremos N y C terminales.

En varias formas de realización de la invención, el componente Fc es un Fc natural o una variante de Fc. La fuente de inmunoglobulina del Fc natural es, en un aspecto, de origen humano, y puede, en formas de realización alternativas, ser de cualquier clase de inmunoglobulina. Los dominios Fc naturales se componen de polipéptidos monoméricos que se pueden enlazar en formas diméricas o multiméricas mediante la asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y/o no-covalentes. La cantidad de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc natural oscila de una a cuatro, según la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Un ejemplo de un Fc natural es un dímero con enlace disulfuro que es el resultado de la digestión de papaína de una IgG. (Ver Ellison y colaboradores, (1982), Nucleic Acids Res. 10: 4071-9).

Cabe destacar que los monómeros Fc se dimerizan espontáneamente cuando se encuentran presentes los residuos cisteína adecuados, salvo que existan otras condiciones en particular que impidan la dimerización a través de la formación de enlaces disulfuro. Aún si los residuos cisteína que normalmente forman enlaces disulfuro en el dímero Fc son eliminados o reemplazados por otros residuos, las cadenas monoméricas habrán de formar un dímero a través de interacciones no-covalentes. En la presente, el término "Fc" se utiliza para indicar cualquiera de estas formas: el monómero natural, el dímero natural (con enlace disulfuro), dímeros modificados (con enlaces disulfuro y/o no-covalentes), y monómeros modificados (por ejemplo, derivados).

Como se observa, las variantes de Fc son vehículos adecuados dentro del alcance de esta invención. Un Fc natural puede ser ampliamente modificado para formar una variante de Fc, siempre que se mantenga el enlace con el receptor de reciclaje, ver por ejemplo: WO 97/34631, WO 96/32478 y WO 04/110 472. En dichas variantes de Fc, se pueden eliminar uno o más sitios de un Fc natural que proporciona las características estructurales o actividad funcional que no requieren las moléculas de fusión de la presente invención. Se pueden eliminar estos sitios, por ejemplo, mediante la sustitución o eliminación de residuos, la inserción de residuos en el sitio o el truncamiento de partes que contienen el sitio. Los residuos insertos o sustituidos también pueden ser aminoácidos alterados, tales como péptido miméticos o aminoácidos D-. Las variantes de

Fc pueden resultar convenientes por una cantidad de razones, varias de las cuales se describen en la presente. Las variantes de Fc de ejemplo incluyen moléculas y secuencias en las cuales:

1. Se eliminan los sitios involucrados en la formación del enlace disulfuro. Dicha eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula hospedante que se utilizan para producir las moléculas de la invención. Para a este fin, el segmento que contiene cisteína en el extremo N terminal puede truncarse o bien los residuos cisteína se pueden eliminar o sustituir con otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). Aún cuando se eliminen los residuos cisteína, los dominios Fc monocatenarios pueden formar, igualmente, un dominio Fc dimérico, que se mantiene unido de manera no-covalente.

2. Un Fc natural se modifica para que sea más compatible con una célula hospedante seleccionada. Por ejemplo, se puede eliminar la secuencia PA cerca del extremo N terminal de un Fc natural típico, que se puede reconocer por una enzima digestiva en E. coli, tal como prolina iminopeptidasa. También se puede agregar un residuo metionina en el extremo N terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana, tal como E. coli.

3. Una parte del extremo N-terminal del Fc natural se elimina a fin de impedir la heterogeneidad del extremo N-terminal cuando se expresa en una célula hospedante seleccionada. Para este fin, se puede eliminar cualquiera de los primeros 20 residuos de aminoácidos en el extremo N terminal, particularmente en las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.

4. Se eliminan uno o más sitios de glicosilación. Los residuos que típicamente se glicosilan (por ejemplo, asparagina) pueden conferir respuesta citolítica. Dichos residuos se pueden eliminar o sustituir con residuos no glicosilados (por ejemplo, alanina).

5. Se eliminan los sitios involucrados en la interacción con el complemento, tal como el sitio de enlace C1q. Por ejemplo, uno puede eliminar o sustituir la secuencia EKK de la IgG1 humana. El reclutamiento del complemento puede no ser ventajoso para las moléculas de la presente invención y, así, se puede evitar con dicha variante de Fc.

6. Se eliminan los sitios que afectan el enlace con los receptores Fc fuera de un receptor de reciclaje. Un Fc natural puede tener sitios para la interacción con ciertos glóbulos blancos que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y, por ello, también se pueden eliminar.

7. Se elimina el sitio ADCC. Los sitios ADCC son conocidos en la técnica; consultar, por ejemplo, Molec. Immunol. 29 (5): 633-9 (1992), con respecto a los sitios ADCC en la IgG1. Tampoco estos sitios se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y, por ello, pueden eliminarse.

8. Cuando se deriva el Fc natural de un anticuerpo no-humano, el Fc natural puede humanizarse. Típicamente, para humanizar un Fc natural, se deben sustituir los residuos seleccionados en el Fc natural no-humano con residuos que normalmente se

encuentran en el Fc natural humano. Las técnicas para la humanización de anticuerpos son bien conocidas en la técnica.

Un vehículo alternativo puede ser una proteína, un polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto péptido mimético), que tiene la capacidad de enlazarse con un receptor de reciclaje. Por ejemplo, se puede usar como vehículo un polipéptido que se describe en la patente estadounidense número 5.739.277, emitida el 14 de abril de 1998 a Presta y colaboradores. Los péptidos también se pueden seleccionar por exhibición en fago para el enlace con el receptor de reciclaje FcRn. Dichos compuestos de enlace del receptor de reciclaje también se incluyen dentro del significado de "vehículo" y quedan bajo el alcance de la presente invención. Dichos vehículos deben seleccionarse para obtener una semivida más prolongada (por ejemplo, al evitar las secuencias reconocidas por proteasas) y una menor inmunogenicidad (por ejemplo, al favorecer las secuencias no-inmunogénicas, tal como se descubrió en la humanización de anticuerpos).

Las variantes, los análogos o los derivados de la porción Fc pueden construirse, por ejemplo, si se hacen varias sustituciones de residuos o secuencias.

Las variantes (o los análogos) de polipéptidos incluyen variantes de inserción, donde uno o más residuos de aminoácidos suplementan una secuencia de aminoácidos Fc. Las inserciones pueden ubicarse en cualquiera o en ambos de los extremos terminales de la proteína, o pueden ubicarse dentro de las regiones internas de la secuencia de aminoácidos Fc. Las variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales, pueden incluir, por ejemplo, proteínas de fusión y proteínas que incluyen etiquetas de aminoácidos. Por ejemplo, la molécula Fc opcionalmente puede contener un Met en el extremo N terminal, especialmente cuando la molécula se expresa en forma recombinante en células bacterianas, tal como E. coli.

En las variantes de eliminación de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácidos en un polipéptido Fc. Las eliminaciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido Fc, o con la eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos Fc. Por lo tanto, las variantes de eliminación incluyen todos los fragmentos de una secuencia de polipéptido Fc.

En las variantes de sustitución de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácidos de un polipéptido Fc y se reemplazan con residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservadora y las sustituciones conservadoras de este tipo son conocidas en la técnica. Como alternativa, la invención también comprende sustituciones no-conservadoras. Los ejemplos de sustituciones conservadoras se describen en Lehninger, [Biochemistry, segunda edición; Worth Publishers, Inc. Nueva York (1975), páginas 71-77] y se presentan a continuación.

Sustituciones conservadoras

Característica de la cadena lateral	Aminoácido
No-polar (hidrófoba)	
A. Alifática	A L I V P
B. Aromática	F W
C. Con contenido de azufre	M
D. Bajo potencial	G
No cargada-polar	
A. Hidroxilo	S T Y
B. Amidas	N Q
C. Sulfidrilo	C
D. Bajo potencial	G
Con carga positiva (básica)	K R H
Con carga negativa (ácida)	D E

Alternativamente, los ejemplos de sustituciones conservadoras se presentan a continuación.

Sustituciones conservadoras II

Residuo original	Ejemplo de sustitución
Ala (A)	Val, Leu, Ile
Arg (R)	Lys, Gln, Asn
Asn (N)	Gln, His, Lys, Arg
Asp (D)	Glu
Cys (C)	Ser
Gln (Q)	Asn
Glu (E)	Asp
His (H)	Asn, Gln, Lys, Arg
Ile (I)	Leu, Val, Met, Ala, Phe,
Leu (L)	Ile, Val, Met, Ala, Phe
Lys (K)	Arg, Gln, Asn
Met (M)	Leu, Phe, Ile
Phe (F)	Leu, Val, Ile, Ala
Pro (P)	Gly
Ser (S)	Thr
Thr (T)	Ser
Trp (W)	Tyr
Tyr (Y)	Trp, Phe, Thr, Ser

Val (V)	Ile, Leu, Met, Phe, Ala

Por ejemplo, los residuos cisteína pueden eliminarse o reemplazarse con otros aminoácidos para evitar la formación de algunos o todos los entrecruzamientos disulfuro de las secuencias Fc. Cada residuo cisteína puede eliminarse y/o sustituirse con otros aminoácidos, tales como Ala o Ser. A modo de otro ejemplo, también se pueden hacer modificaciones para introducir sustituciones de aminoácidos para (1) hacer la ablación del sitio de enlace con el receptor Fc; (2) hacer la ablación del sitio de enlace con el complemento (C1q); y/o (3) hacer la ablación del sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Dichos sitios son conocidos en la técnica, y toda sustitución conocida se encuadra dentro del alcance del Fc, tal como se lo emplea en la presente. Por ejemplo, ver Molecular Immunology, Vol. 29, número 5, 633-639 (1992) con respecto a los sitios ADCC en la IgG1.

Del mismo modo, uno o más residuos tirosina pueden reemplazarse por residuos fenilalanina. Sumado a ello, también se contemplan otras variantes de inserciones, eliminaciones y/o sustituciones de aminoácidos y se encuadran dentro del alcance de la presente invención. En general, se prefieren las sustituciones de aminoácidos conservadoras. Igualmente, las alteraciones pueden ser en la forma de aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o aminoácidos D-.

Las secuencias Fc del compuesto también se pueden derivar como se ha descrito en la presente invención para péptidos, es decir, haciendo modificaciones diferentes de inserción, eliminación o sustitución de residuos de aminoácido. Con preferencia, las modificaciones son de naturaleza covalente, e incluyen, por ejemplo, el enlace químico con polímeros, lípidos y otras fracciones orgánicas e inorgánicas. Los derivados de la invención pueden elaborarse de manera tal de aumentar la semivida circulante, o pueden diseñarse de manera tal de mejorar la capacidad de direccionamiento para el polipéptido a las células, los tejidos o los órganos previstos.

También es posible utilizar el dominio de enlace del receptor del reciclaje de la molécula Fc intacta como la parte Fc de un compuesto de la invención, tal como se describe en la WO 96/32478, denominada "Altered Polypeptides with Increased Half-Life". Los miembros adicionales de la clase de moléculas designadas como Fc en la presente son aquellos que se describen en la WO 97/34631, titulada "Immunoglobulin-Like Domains with Increased Half-Lives". Las dos solicitudes de PCT publicadas que se citan en este párrafo se incorporan a la presente por referencia.

Componentes del WSP

Los compuestos de la invención pueden incluir, además, por lo menos un WSP. La fracción del WPS de la molécula puede ser ramificada o no-ramificada. Para el uso terapéutico de la preparación final, el polímero es farmacéuticamente aceptable. En general, se selecciona un polímero conveniente según consideraciones tales como si el conjugado polimérico tendrá aplicación terapéutica, y en ese caso, la dosis conveniente,

el tiempo de circulación, la resistencia a la proteólisis y otros parámetros. En varios aspectos, el peso molecular promedio de cada polímero hidrosoluble es de entre 2 kDa y 100 kDa, aproximadamente; de entre 5 kDa y 50 kDa, aproximadamente; de entre 12 kDa y 40 kDa, aproximadamente; y de entre 20 kDa y 35 kDa. Aún en otro aspecto el peso molecular de cada polímero es de entre 6 kDa y 25 kDa, aproximadamente. El término "aproximadamente" que se utiliza en toda esta solicitud, indica que en las preparaciones de polímeros hidrosolubles, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular establecido. En general, cuanto más elevado es el peso molecular o mayor la cantidad de ramificaciones, mayor es la proporción polímero/proteína. Se pueden utilizar otros tamaños, según el perfil terapéutico conveniente, incluso por ejemplo, la duración de la liberación sostenida, los efectos, si los hay, de la actividad biológica; la facilidad de manipuleo; el grado de falta de antigenicidad y otros efectos conocidos de polímeros hidrosolubles sobre la proteína terapéutica.

El WSP se debería enlazar a un polipéptido o péptido, prestando consideración a los efectos en los dominios funcionales o antigénicos del polipéptido o péptido. En general, la derivación química puede realizarse en cualesquiera condiciones adecuadas para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los grupos activadores que se pueden utilizar para enlazar el polímero hidrosoluble a una o más proteínas incluyen sin limitación, sulfona, maleimida, sulfhidrilo, tiol, triflato, tresilato, azidrina, oxirano y 5-piridilo. Si está unido al péptido mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo, de manera que se controle el grado de polimerización.

Los polímeros hidrosolubles adecuados y químicamente aceptables incluyen, sin limitación, PEG, polietilenglicol propionaldehído, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, alcohol polivinílico (PVA), polivinil pirrolidona, poli-1, 3-dioxolano, poli-1,3,6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli (.beta.-aminoácidos) (homopolímeros o copolímeros aleatorios), poli(n-vinil pirrolidona)polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros óxidos de polialquileno, copolímeros de óxido de polipropileno/óxido de etileno, polioles polioxietilados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polioles polioxietilados, sorbitol polioxietilado o glucosa polioxietilada, ácidos colónicos u otros polímeros de carbohidratos, Ficoll o dextrano y sus mezclas.

Los polímeros hidrosolubles también se pueden elaborar de manera que sean térmicamente sensibles, como en la formación de geles térmicos inversos. Los ejemplos incluyen tetrónicos, con esqueletos armados con tetras, y copolímeros de PEG-PLGA. La hidrofilicidad de los polímeros puede modificarse sustituyendo las porciones hidrófobas en la cadena polimérica. Un ejemplo de esto se encuentra en la fabricación del PLGA, en el cual la proporción entre ácido láctico y ácido glicólico puede aumentarse para obtener una menor hidrosolubilidad. Los polímeros menos hidrosolubles pueden ser convenientes en ciertas aplicaciones, por ejemplo, para aumentar el potencial de interacción con

membranas celulares. Tras la reconstitución, una proporción adecuada de fosfolípidos se puede usar para inducir la formación de las micelas o liposomas en solución. La ventaja de dicho sistema puede ser la capacidad para incorporar parte de la proteína dentro de la micela, con el beneficio potencial de prolongar el suministro. Los fosfolípidos capaces de formar liposomas o micelas incluyen DMPG, DMPC, DOPC, DOPG y componentes de refuerzo de liposomas secundarios adecuados, tales como el colesterol. Ciertos excipientes, tales como DEA oleth-10 fosfato y oleth 10-fosfato, son capaces de formar micelas en solucion.

Los polímeros polisacáridos son otro tipo de polímero hidrosoluble que se puede utilizar para la modificación de proteínas o de péptidos. Al modificar proteínas o péptidos mediante la adición de polisacáridos, por ejemplo glicosilación, puede aumentar la semivida, disminuir la antigenicidad, aumentar la estabilidad y disminuir la proteólisis. Los dextranos son polímeros polisacáridos compuestos de subunidades individuales de glucosa, predominantemente ligadas mediante ligaduras α1-6. El dextrano propiamente dicho se encuentra disponible en muchos rangos de pesos moleculares, y se puede obtener fácil y rápidamente en pesos moleculares que oscilan entre 1 kD y 70 kD, aproximadamente. El dextrano es un polímero hidrosoluble adecuado que se utiliza en la presente invención como vehículo por sí mismo o bien en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Ver, por ejemplo WO 96/11953 y WO 96/05309. Se informó acerca del uso de dextrano conjugado en inmunoglobulinas que se utilizan con fines terapéuticos o de diagnóstico; ver, por ejemplo, la publicación de patente europea número 0 315 456, que se incorpora a la presente por referencia. Se prefiere el dextrano de 1 kD a 20 kD, aproximadamente, cuando el dextrano se utiliza como un vehículo según la presente invención.

En una forma de realización, el WSP es PEG y la invención contempla las preparaciones donde un compuesto es modificado para incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivar otras proteínas, tales como, a título enunciativo, mono-alcoxi (C1-C10) o ariloxi-polietilenglicol. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas de fabricación debido a su estabilidad en el agua. El grupo PEG puede tener cualquier peso molecular que resulte conveniente, y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio del PEG, cuyo empleo se contempla en la invención, oscila de 2 kDa a 100 kDa, aproximadamente; de 5 kDa a 50 kDa, aproximadamente; o de 5 kDa a 10 kDa, aproximadamente. En otro aspecto, la fracción PEG tiene un peso molecular aproximado de entre 6 kDa y 25 kDa. Los grupos PEG generalmente se unen a los péptidos o proteínas mediante la acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en la fracción PEG (por ejemplo, un grupo éster, aldehído, amino o tiol), con un grupo reactivo en el péptido o proteína diana (por ejemplo, un grupo éster, aldehído o amino). Con el empleo de los métodos que se describen en la presente, se puede elaborar una mezcla de moléculas conjugadas de polímero/péptido, y la ventaja que aporta la presente es la

capacidad de seleccionar la proporción de conjugado de polímero/péptido que se habrá de incluir en la mezcla. De esta manera, si resulta conveniente, una mezcla de péptidos con varios números de fracciones poliméricas unidas (es decir, cero, una o dos), puede elaborarse con una proporción predeterminada de conjugado de polímero/proteína.

Una estrategia útil para la PEGilación de péptidos sintéticos consta de la combinación, a través de la formación de un ligadura conjugada en la solución, de un péptido y una fracción PEG, cada uno de los cuales tiene una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva entre sí. Los péptidos pueden elaborarse fácilmente con la síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos son "preactivados" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan íntegramente antes de la reacción con la fracción PEG. La ligadura del péptido con PEG usualmente se realiza en fase acuosa y puede controlarse fácilmente mediante HPLC analítica en fase inversa. Los péptidos PEGilados pueden purificarse de manera sencilla mediante HPLC preparativa y pueden caracterizarse a través de HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masa con desorción inducida por láser.

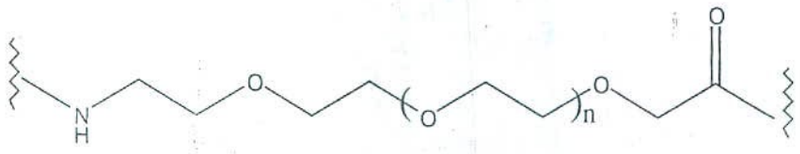
Enlazadores

Cualquier grupo "enlazador" es opcional, ya sea que se encuentre colocado entre péptidos, péptido y vehículo o vehículo y WSP. Cuando se encuentra presente, su estructura química no es crítica, dado que fundamentalmente funciona como un separador. Con preferencia, el ligador se conforma de aminoácidos ligados mediante enlaces peptídicos. Así, en las formas de realización preferidas, el ligador se compone de aproximadamente entre 1 y 20 aminoácidos ligados por enlaces peptídicos, donde los aminoácidos se seleccionan entre los 20 aminoácidos naturales. Algunos de estos aminoácidos pueden ser glicosilados, como bien saben los expertos en la técnica. En una forma de realización preferida, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan entre glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina y lisina. Aún con mayor grado de preferencia, un ligador se conforma de una mayoría de aminoácidos no impedidos en forma estérica, tales como glicina y alanina. Por consiguiente, los enlazadores recomendados son las poliglicinas (particularmente (Gly)4, (Gly)5, (Gly)8, poli(Gly-Ala), y polialaninas. Otros ejemplos específicos de enlazadores son:

(Gly)3Lys(Gly)4 (SEQ ID NO: 1018);
(Gly)3AsnGlySer(Gly)2 (SEQ ID NO: 1019);
(Gly)3Cys(Gly)4 (SEQ ID NO: 1020); y
GlyProAsnGlyGly (SEQ ID NO: 1021).

Para explicar la nomenclatura expresada precedentemente, por ejemplo, (Gly)3Lys(Gly)4 significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly. También se prefieren las combinaciones de Gly y Ala. Los enlazadores que se describen en la presente son meros ejemplos, ya que los enlazadores dentro del alcance de la presente invención pueden ser mucho más largos e incluir otros residuos.

También son posibles los enlazadores no-peptídicos. Por ejemplo, se pueden utilizar los enlazadores alquilo, tales como -NH-(CH2)s-C(O)-, donde s = 2-20. Estos enlazadores alquilo pueden estar sustituidos, además, por un grupo de impedimento no estérico, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH2, fenilo, etc. Un ligador no peptídico de ejemplo es un ligador PEG,



donde n es tal que el ligador tiene un peso molecular de entre 100 y 5000 kD, preferentemente de entre 100 y 500 kD. Los ligadores peptídicos pueden alterarse para formar derivados de la misma manera que se describió previamente.

Producción de polipéptidos y péptidos

Un péptido que ha sido identificado se puede elaborar en células hospedante transformadas usando técnicas de ADN recombinante. Si el componente del vehículo es un polipéptido, el polipéptido o producto de fusión péptido-vehículo se puede expresar como uno. Para hacerlo, una molécula de ADN recombinante que codifica el péptido se prepara primero usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, las secuencias que codifican los péptidos pueden extirparse del ADN con el uso de las enzimas de restricción adecuadas. Como alternativa, la molécula de ADN puede sintetizarse con el uso de técnicas de síntesis química, tales como el método de fosforamidato. Además, se puede utilizar una combinación de estas técnicas. La invención, por lo tanto, proporciona polinucleótidos que codifican un compuesto de la invención.

La invención también proporciona vectores que codifican los compuestos de la invención en un hospedante adecuado. El vector comprende el polinucleótido que codifica el compuesto enlazado operativamente a secuencias de control de la expresión adecuada. Los métodos para efectuar este enlace operativo, antes o después de que el polinucleótido se inserte en el vector, son bien conocidos. Las secuencias de control de expresión incluyen promotores, activadores, mejoradores, operadores, sitios de enlace ribosómico, señales de inicio, señales de finalización, señales de caperuza, señales de poliadenilación y otras señales involucradas en el control de la transcripción o traducción. El vector resultante que tiene el polinucléotido en sí mismo se usa para transformar un hospedante adecuado. Esta transformación se puede realizar con el empleo de métodos que son bien conocidos en la técnica.

Se puede utilizar cualquiera de una gran cantidad de células hospedantes disponibles y bien conocidas para poner en práctica la presente invención. La selección de un hospedante en particular depende de una cantidad de factores reconocidos en la técnica. Esto incluye, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la

toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la tasa de transformación, la facilidad para recuperar los péptidos, las características de expresión, la bioseguridad y los costos. Se debe procurar un equilibrio de estos factores teniendo en cuenta que no todos los hospedantes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN en particular. Dentro de estas pautas generales, los hospedantes microbianos que resultan de utilidad incluyen bacterias (tales como la especie E. coli), levadura (tales como la especie Saccharomyces) y otras células de hongos, insectos, vegetales y de mamíferos (incluso del ser humano) en cultivo u otros hospedantes conocidos en la técnica.

A continuación el hospedante transformado se somete a cultivo y se purifica. Las células hospedantes pueden cultivarse en condiciones convencionales de fermentación, de forma tal que se expresen los compuestos convenientes. Dichas condiciones de fermentación son bien conocidas en la técnica. Finalmente, los péptidos se purifican a partir de cultivos con métodos bien conocidos en la técnica.

Según la célula hospedante utilizada para expresar un compuesto de la invención, los grupos carbohidrato (oligosacáridos) pueden ser convenientemente enlazados a sitios conocidos por ser sitios de glicosilación en proteínas. En general, los oligosacáridos con ligadura O- se unen a residuos serina (Ser) o treonina (Thr), mientras que los oligosacáridos con ligadura N- se unen a residuos asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. Con preferencia, X es uno de los diecinueve aminoácidos naturales fuera de la prolina. Las estructuras de los oligosacáridos con ligadura N- u O- y los residuos azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es el ácido N-acetilneuramínico (al que se hace referencia como ácido siálico). Usualmente, el ácido siálico es el residuo terminal de los oligosacáridos, tanto con ligamiento N- como con ligamiento O-, y en virtud de su carga negativa, pueden conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Dichos sitios pueden incorporarse al enlazador de los compuestos de la presente invención y, con preferencia, se glicosilan a través de una célula durante la producción recombinante de los compuestos polipeptídicos (por ejemplo, en células de mamíferos, tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, dichos sitios pueden, además, glicosilarse a través de procedimientos sintéticos o semisintéticos que son conocidos en la técnica

Como alternativa, los compuestos también pueden elaborarse con el uso de métodos sintéticos. Por ejemplo, se pueden utilizar las técnicas de síntesis en fase sólida. Las técnicas adecuadas son bien conocidas, e incluyen las que se describen en Merrifield, Chem. Polypeptides, páginas 335-61 (Katsoyannis and Panayotis eds.); Merrifield (1963), J. Am. Chem. Soc. 85: 2149; Davis y colaboradores, (1985), Biochem. Intl. 10: 394-414; Stewart y Young (1969), Solid Phase Peptide Synthesis; patente estadounidense número 3.941.763; Finn y colaboradores, (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 105-253; y Erickson y colaboradores, (1976), The Proteins (3rd ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida es la

técnica preferida para elaborar los péptidos individuales, dado que es el método más eficaz desde el punto de vista de costos para elaborar péptidos pequeños.

Los compuestos que contienen péptidos derivados o que contienen grupos no-peptídicos son particularmente modificables a síntesis mediante técnicas de química orgánica bien conocidas.

Modificación de péptidos hidrosolubles (WSP)

Para obtener un compuesto enlazado covalentemente a un WSP, se emplea cualquier método descripto en la presente invención o conocido de otro modo en la técnica. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos o péptidos comprenderán, generalmente, los pasos de: (a) hacer reaccionar el péptido con la molécula del polímero activada (tal como un éster reactivo o derivado de aldehído de la molécula del polímero) en condiciones tales que el polipéptido llegue a enlazarse a una o más moléculas poliméricas; y b) obtener el o los productos de la reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán en base a parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la proporción de las moléculas poliméricas: proteína, mayor es el porcentaje de la molécula polimérica enlazada.

Una molécula biológicamente activa puede enlazarse a un polímero a través de cualquier grupo funcional disponible usando métodos estándar bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de los grupos funcionales en el polímero o en la molécula biológicamente activa que se puede usar para formar dichos enlaces incluyen grupos amina y grupos carboxi, grupos tiol tales como en los residuos de cisteína, aldehídos y cetonas, y grupos hidroxi como se pueden encontrar en los residuos serina, treonina, tirosina, hidroxiprolina e hidroxilisina.

El polímero se puede activar acoplando un grupo reactivo, tal como tricloro-s-triazina [Abuchowski y colaboradores, (1977), J. Biol. Chem.252:3582-3586, que se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad], carbonilimidazol [Beauchamp y otros (1983), Anal. Biochem. 131:25-33, que se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad], o succinato de succinimidilo [Abuchowski y otros (1984), Cancer Biochem. Biophys. 7:175-186, que se incorpora a la presente por referencia en su totalidad] para reaccionar con una funcionalidad amina en la molécula biológicamente activa. Otro método de acoplamiento comprende la formación de un grupo glioxililo en una molécula y un grupo aminooxi, hidrazida o grupo semicarbazida en la otra molécula que se va a conjugar [Fields y Dixon, (1968), Biochem. J. 108:883-887; Gaerther, y otros, (1992), Bioconjugate Chem. 3:262-268; Geoghegan y Stroh, (1992), Bioconjuate Chem. 3:138-146; Gaerther y colaboradores, (1994), J. Biol. Chem. 269:7224-7230, que en todos los casos se incorporan a la presente invención por referencia en su totalidad]. Otros métodos comprenden la formación de un éster activo en un grupo alcohol libre de la primera molécula que se va a conjugar usando cloroformato o disuccinimidilcarbonato, que entonces se puede conjugar con un grupo amina en la otra molécula que se va a acoplar [Veronese, y otros (1985), Biochem. and Biotech 11:141-152; Nitecki y otros,

patente estadounidense número 5.089.261; Nitecki, patente estadounidense número 5.281.698, que en todos los casos se incorporan a la presente invención por referencia en su totalidad]. Otros grupos reactivos que se pueden unir por medio de grupos alcohol libres se mencionan en Wright, EP 0539167A2 (que se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad), que también describe el uso de los imidatos para acoplamiento mediante los grupos amina libres.

Otra química comprende la acilación de las aminas primarias de una diana usando el éster NHS de metoxi-PEG (O-[(N-succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpolietileno gilicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS resulta en un enlace de amida que elimina la carga de la amina primaria original. Otros métodos utilizan la oxidación leve de una diana bajo condiciones seleccionadas para enfocar el diol pendiente del penúltimo ácido siálico de la unidad glicosilo para la oxidación de un aldehído. El glicoaldehído resultante luego se hizo reaccionar con una metoxi-PEG-hidrazida (O-(hidracinocarbonilmetil)-O'metilpolietilenglicol) para formar una hidrazona semiestable entre el PEG y la diana. Luego, la hidrazona se reduce mediante cianoborohidruro de sodio para producir un conjugado de PEG estable. Ver por ejemplo, la patente estadounidense número 6.586.398 (Kinstler y otros, 1 de julio del 2003), incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad.

En las aplicaciones específicas de las técnicas para modificación química, por ejemplo, la patente estadounidense número 4.002.531 (incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad) establece que la alquilación reductora se usó para unir las moléculas de polietilenglicol a una enzima. La patente estadounidense número 4.179.337 (incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad) divulga los conjugados de proteínas PEG que comprenden, por ejemplo, enzimas e insulina. La patente estadounidense número 4.904.584 (incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad) divulga la modificación del número de los residuos de lisina en las proteínas para la unión de las moléculas de polietilenglicol por medio de grupos amina reactivos. La patente estadounidense número 5.834.594 (incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad) divulga los conjugados sustancialmente no-inmunogénicos hidrosolubles de PEG : proteína, que comprenden por ejemplo, las proteínas IL-2, interferón alfa e IL-1ra. Los métodos de Hakimi y otros comprenden la utilización de los enlazadores únicos para conectar los diferentes grupos amino libres en la proteína a PEG. Las patentes estadounidenses números 5.824.784 y 5.985.265 (cada una de las cuales se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad) divulgan métodos que permiten seleccionar proteínas modificadas químicamente en el extremo N terminal y sus análogos, incluso G-CSF e interferón de consenso. Lo más importante es que estas proteínas modificadas tienen ventajas con respecto a la estabilidad de la proteína, además de proporcionar ventajas de procesamiento.

La modificación de WSP también se describe en Francis y otros: Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization

(Eds. Ahern., T. y Manning, M. C.) Plenum, N. Y., 1991. (que se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad). En otro aspecto, se emplea el método que se describe en Delgado y colaboradores, "Coupling of PEG to Protein By Activation With Tresyl Chloride, Applications In Immunoaffinity Cell Preparation", en: Fisher y colaboradores, eds., Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology, Plenum Press, N.Y., N.Y., 1989 páginas 211-213 (que incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad), que implica el uso de cloruro de tresilo, lo cual da como resultado que no haya ningún grupo entre la fracción WSP y la fracción polipeptídica de TMP. En otros aspectos, la unión de un WSP se efectúa a través del uso de ésteres N-hidroxi succinimidilo de carboximetil metoxi polietilenglicol, como bien se conoce en la técnica.

Para otras descripciones de la modificación de una diana con un WSP, ver, por ejemplo: la solicitud de patente estadounidense número 20030096400; EP 0 442724A2; EP 0154316; EP0401384; WO94/13322; las patentes estadounidenses números 5.362.852; 5.089.261; 5.281.698; 6.423.685; 6.635.646; 6.433.135; solicitud internacional WO 90/07938; Gaertner and Oxford, (1996), Bioconjugate Chem. 7:38-44; Greenwald y otros, Crit Rev Therap Drug Carrier Syst. 2000;17:101-161; Kopecek y otros, J. Controlled Release, 74:147-158,2001; Harris y otros, Clin Pharmacokinet. 2001;40(7):539-51; Zalipsky y otros, Bioconjug Chem. 1997;8:111-118; Nathan y otros, Macromolecules, 1992; 25:4476-4484; Nathan y otros, Bioconj Chem. 1993; 4:54-62; y Francis y otros, Focus on Growth Factors, 3:4-10 (1992), cuyas divulgaciones se incorporan a la presente invención por referencia en su totalidad.

Alquilación reductora

En un aspecto, el enlace covalente de un WSP se lleva a cabo mediante procedimientos de modificación química de alquilación reductora como se indica en la presente invención para modificar selectivamente el grupo α-amino del extremo N terminal, y probando el producto resultante con respecto a la característica biológica deseada, como los ensayos de actividad biológica proporcionados en la presente invención.

La alquilación reductora para la unión de un WSP a una proteína o péptido explota la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primario (por ejemplo, lisina en contraposición al extremo N terminal) disponible para la derivación en una proteína en particular. En condiciones de reacción adecuadas, se logra la derivación sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N terminal con un grupo carbonilo que contiene polímero.

Para la alquilación reductora, el o los polímeros seleccionados podrían tener un grupo aldehído reactivo único. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, polietilenglicol propionaldehído, que es estable en agua, o sus derivados mono alcoxi o ariloxi C1-C10 (ver la patente estadounidense número 5.252.714, incorporada a la presente invención por referencia en su totalidad). En un enfoque, se emplea la alquilación reductora para conjugar un PEG-aldehído (O-(3-Oxopropil)-O'metilpolietilenglicol) para una amina

primaria. Bajo condiciones adecuadas, se ha demostrado que este enfoque produce conjugados de PEG predominantemente modificados a través de la α-amina en el extremo N terminal de la proteína.

Una funcionalidad de aldehído útil para conjugar la molécula biológicamente activa se puede generar desde una funcionalidad que tiene grupos amino y alcohol adyacentes. En un polipéptido, por ejemplo, una serina, treonina o hidroxilisina con extremo N terminal se puede usar para generar una funcionalidad de aldehído por medio del clivaje oxidativo, en condiciones moderadas y usando periodato. Estos residuos, o sus equivalentes, normalmente se pueden presentar, por ejemplo en el extremo N terminal de un polipéptido, pueden ser expuestos por medio de la digestión química o enzimática, o se pueden introducir por medio de métodos recombinantes o químicos. Las condiciones de la reacción para generar el aldehído generalmente comprenden agregar un exceso molar de metaperiodato de sodio y bajo condiciones leves para evitar la oxidación en otras posiciones de la proteína. De preferencia, el pH es de aproximadamente 7. Una reacción típica comprende agregar 1,5 veces el exceso molar del metaperiodato de sodio, seguido de la incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

El grupo funcional aldehído se puede acoplar a un polímero activado que contiene una funcionalidad de hidrazida o semicarbazida para formar un enlace de hidrazona o semicarbazona. Los polímeros que contienen hidrazida se encuentran comercialmente disponibles y se pueden sintetizar, si es necesario, usando técnicas estándares. Las PEG hidracidas que se usan en la invención se pueden adquirir a Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Road, Huntsville, Ala. 35801 (ahora parte de Nektar Therapeutics, 150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070-6256). El aldehído se acopla al polímero mezclando la solución de los dos componentes juntos y calentándolo aproximadamente a 37°C hasta que la reacción se complete sustancialmente. Un exceso de la hidrazida del polímero generalmente se usa para aumentar la cantidad del conjugado obtenido. Un tiempo de reacción típico es 26 horas. Según la estabilidad térmica de los reaccionadores, la temperatura y el tiempo de la reacción se pueden modificar para proporcionar resultados adecuados. La determinación detallada de las condiciones de reacción tanto para la oxidación como para el acoplamiento se mencionan en Geoghegan y Stroh, (1992), Bioconjugate Chem. 3:138-146; y en Geoghegan, patente estadounidense número 5.362.852, cada una de las cuales se incorpora a la presente invención por referencia en su totalidad.

Con el empleo de alquilación reductora, el agente reductor debe ser estable en solución acuosa y, con preferencia, debe tener la capacidad de reducir sólo la base de Schiff formada en el procedimiento inicial de alquilación reductora. Los agentes reductores se seleccionan, sin limitación, de: borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, borato de dimetilamina, borato de trimetilamina y borato piridina.

El pH de la reacción afecta la relación entre polímero y proteína que se habrá de utilizar. En general, si el pH de la reacción es menor que el pKa de un grupo reactivo diana, será

conveniente un mayor exceso de polímero respecto de la proteína. Si el pH es más elevado que el pKa diana, la proporción entre polímero y proteína no debe ser tan grande (es decir, existen grupos más reactivos disponibles, con lo cual sólo se necesitan unas pocas moléculas poliméricas).

En tal sentido, la reacción se realiza en un aspecto a un pH que permite aprovechar las diferencias de pKa entre los grupos ε-amino de los residuos lisina y aquellas de los grupos α-amino del residuo terminal N de la proteína. Mediante la derivación selectiva, se controla la unión de un polímero hidrosoluble a una proteína; la conjugación con el polímero se realiza predominantemente en el extremo N terminal de la proteína y no se produce ninguna modificación significativa de otros grupos reactivos, tal como los grupos amino de la cadena lateral lisina.

Por lo tanto, en un aspecto, se proporcionan métodos para la unión covalente de un WSP a un compuesto diana y que proporciona una preparación sustancialmente homogénea de WSP/moléculas conjugadas de proteínas, en ausencia de una mayor purificación, tal como se requiere con el empleo de otras técnicas de modificación química. Más específicamente, si se utiliza polietilenglicol, los métodos descriptos permiten la producción de una proteína PEGilada en el extremo N terminal que, posiblemente, carece de grupos de enlace antigénico, es decir, que la fracción de polietilenglicol está acoplada directamente a la fracción de proteína sin que haya subproductos potencialmente tóxicos.

Según el método de unión de WSP elegido, la proporción de moléculas de WSP unidas al péptido o la molécula de proteína diana puede variar, como también lo harán sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la proporción óptima (en términos de eficiencia de reacción en cuanto a que no existe exceso de proteína o polímero no reaccionado) se determina a través del peso molecular del WSP seleccionado. Además, cuando se utilizan métodos que implican la unión no específica y la posterior purificación de una especie conveniente, la proporción puede depender de la cantidad de grupos reactivos (típicamente grupos amino) que haya disponible.

Purificación

El método para obtener una preparación modificada por WSP sustancialmente homogénea es, por un lado, mediante la purificación de una especie predominantemente única del compuesto modificado a partir de una mezcla de especies. A modo de ejemplo, una especie sustancialmente homogénea primero se separa mediante cromatografía por intercambio de iones para obtener material que tenga una característica de carga de una especie única (aún cuando puedan estar presentes otras especies que tengan la misma carga aparente), y luego la especie conveniente se separa con el empleo de cromatografía por exclusión de tamaño. En la invención se informan y se contemplan otros métodos, entre los que se incluyen, por ejemplo, PCT WO 90/04606, publicada el 3 de mayo de 1990, que describe un procedimiento para fraccionar una mezcla de PEG-aductos de proteínas que comprenden la división de PEG/aductos de proteínas en un sistema bifásico acuoso que contiene PEG.

De esta manera, un aspecto de la presente invención es un método para preparar un conjugado del compuesto modificado por WSP que comprende: (a) hacer reaccionar un compuesto que tiene más de un grupo amino con una fracción polimérica hidrosoluble bajo condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para activar selectivamente el grupo α-amino en el extremo amino terminal de la fracción de la proteína, de manera que dicho polímero hidrosoluble selectivamente se une a dicho grupo α-amino; y b) obtener el producto de la reacción. En forma opcional, y particularmente para un producto terapéutico, los productos de reacción se separan de las fracciones no-reaccionadas.

Como se ha establecido mediante el mapeo del péptido y el secuenciamiento del extremo N terminal, se proporciona una preparación que comprende por lo menos 50% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado. En otras formas de realización, se proporcionan preparaciones que comprenden por lo menos 75% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado; por lo menos 85% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado; por lo menos 90% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado; por lo menos 95% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado; y por lo menos 99% de péptido PEGilado en una mezcla de péptido PEGilado y péptido no reaccionado.

El propósito de los siguientes ejemplos no es limitar la presente invención, sino solamente ejemplificar sus formas de realización.

Ejemplo 1

Ensamblaje del constructo de expresión de mFc-TMP

Un polinucleótido que codifica una proteína de fusión de TMP que comprende una región de Fc murino (mFc-TMP) se construyó combinando secuencias de nucleótidos que individualmente codifican el Fc murino y un TMP (descripto en la EP01124961A2). En la primera vuelta de la PCR, el componente que codifica el Fc murino se amplificó con los cebadores PCR 3155-58 (SEQ ID NO: 1022) y 1388-00 (SEQ ID NO: 1023).

3155-58: CCGGGTAAAGGTGGAGGTGGTGGTATCGA (SEQ ID NO: 1024)

3155-59: CCACCTCCACCTTTACCCGGAGAGTGGGAG (SEQ ID NO: 1025)

En una reacción separada, un polinucleótido que codifica TMP se amplificó con los cebadores 1209-85 (SEQ ID NO: 1026) y 3155-59 (SEQ ID NO: 1027).

1209-85: CGTACAGGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 1028)

1388-00: CTAGTTATTGCTCAGCGG (SEQ ID NO: 1029)

Los fragmentos de PCR resultantes fueron purificados en gel y combinados en un tubo simple para realizar una segunda vuelta de PCR con los cebadores 1209-85 (SEQ ID NO: 1030) y 1388-00 (SEQ ID NO: 1031). 1031). El producto de PCR de esta segunda vuelta de amplificación se purificó en gel y se digirió con enzimas de restricción NdeI y XhOI. El fragmento de la digestión se purificó y se enlazó en el vector pAMG21, previamente digerido con las mismas enzimas. La mezcla ligadora se transformó por medio de electroporación en E. coli y fue colocada en placas de cultivo con un medio de LB +

Kanamicina. Las colonias se analizaron mediante PCR y secuenciamiento de ADN. Se identificó y se diseñó un clon positivo con una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1032) que codifica la proteína de fusión mFc-TMP (SEQ ID NO: 1033), y se designó como 6397.

Polinucleótido que codifica la proteína de fusión Fc murino-TMP (SEQ ID NO: 1034)

1 GATTTGATTC TAGATTTGTT TTAACTAATT AAAGGAGGAA TAACAT

RF abierta:

ATGGTCGACGGTTG TAAGCCATGC ATTTGTACAG TCCCAGAAGT ATCATCTGTC

101 TTCATCTTCC CCCCAAAGCC CAAGGATGTG CTCACCATTA CTCTGACTCC

151 TAAGGTCACG TGTGTTGTGG TAGACATCAG CAAGGATGAT CCCGAGGTCC

201 AGTTCAGCTG GTTTGTAGAT GATGTGGAGG TGCACACAGC TCAGACGCAA

251 CCCCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACTTTC CGCTCAGTCA GTGAACTTCC

301 CATCATGCAC CAGGACTGGC TCAATGGCAA GGAGTTCAAA TGCAGGGTCA

351 ACAGTGCAGC TTTCCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA

401 GGCAGACCGA AGGCTCCACA GGTGTACACC ATTCCACCTC CCAAGGAGCA

451 GATGGCCAAG GATAAAGTCA GTCTGACCTG CATGATAACA GACTTCTTCC

501 CTGAAGACAT TACTGTGGAG TGGCAGTGGA ATGGGCAGCC AGCGGAGAAC

551 TACAAGAACA CTCAGCCCAT CATGGACACA GATGGCTCTT ACTTCGTCTA

601 CAGCAAGCTC AATGTGCAGA AGAGCAACTG GGAGGCAGGA AATACTTTCA

651 CCTGCTCTGT GTTACATGAG GGCCTGCACA ACCACCATAC TGAGAAGAGC

701 CTCTCCCACT CTCCGGGTAA AGGTGGAGGT GGTGGTATCG AAGGTCCGAC

751 TCTGCGTCAG TGGCTGGCTG CTCGTGCTGG TGGTGGAGGT GGCGGCGGAG

801 GTATTGAGGG CCCAACCCTT CGCCAATGGC TTGCAGCACG CGCATAA

Secuencia 3':

TCTCGAGGATCCG CGGAAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAAGCCCG AAAGG

Secuencia de proteína Fc murino-TMP (SEQ ID NO: 1035)

1 MVDGCKPCIC TVPEVSSVFI FPPKPKDVLT ITLTPKVTCV VVDISKDDPE

51 VQFSWFVDDV EVHTAQTQPR EEQFNSTFRS VSELPIMHQD WLNGKEFKCR

101 VNSAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP PPKEQMAKDK VSLTCMITDF

151 FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG SYFVYSKLNV QKSNWEAGNT

201 FTCSVLHEGL HNHHTEKSLS HSPGKGGGGG IEGPTLRQWL AARAGGGGGG

251 GGIEGPTLRQ WLAARA*

Ejemplo 2

Fermentación de la cepa 6397

La fermentación de la cepa 6397 se inició mediante la inoculación de 500 mL de caldo de Luria esterilizado con un cultivo de semilla de la cepa en un matraz con agitador. Cuando la densidad celular alcanzó 0,9 a 600 nM, el contenido se usó para inocular 15 L de fermentador que contenía 10 L del medio de crecimiento basado en el complejo (800 g de

glicerol; 500 g de tripticasa; 3 g de citrato de sodio; 40 g de KH2PO4; 20 g de (NH4)2SO4; 5 ml de Fluka P-2000 antiespuma); 10 ml de metales traza (27 g/L de cloruro férrico; 2 g/L de cloruro de zinc; 2 g/L de cloruro de cobalto; 2 g/L de molibdato de sodio; 1 g/L de cloruro de calcio; 1,90 g/L de sulfato cúprico; 0,50 g/L de ácido bórico; 1,60 g/L de cloruro de manganeso; 73,5 g/L de dihidrato de citrato sódico), 10 mL de vitaminas (0,060 g/L de biotina; 0,040 g/L de ácido fólico; 0,42 g/L de riboflavina; 1,40 g/L de clorhidrato de piridoxina; 6,10 g/L de niacina; 5,40 g/L de ácido pantoténico; 5,30 ml/L de hidróxido de sodio), y se agregó agua para obtener 10 L. El fermentador se mantuvo a 37°C y el pH a 7, con niveles de oxígeno disuelto que se mantuvieron en un mínimo de 30% de saturación. Cuando la densidad celular alcanzó 13,1 unidades OD a 600 nM, el cultivo fue inducido mediante el agregado de 0,5 mg/ml de N-(3-oxo-hexanoil) lactona homoserina [10 mL]. Seis horas después de la inducción posterior, el caldo se enfrió a 10°C, y las células se recogieron mediante centrifugación a 4550 g durante 60 minutos a 5°C. Luego, se almacenó la pasta celular a -80°C.

Ejemplo 3

Replegamiento de proteínas

La pasta de E-coli (300 g) de la cepa 6397 que expresa mFc-TMP se disolvió en 2250 ml de una solución amortiguadora para lisis (50 mM de clorhidrato de Tris; 5 mM de EDTA, a pH 8) y se pasó dos veces a través de un microfluidizador enfriado a 13,000 PSI. Luego se centrifugó el producto homogenizado a 11,300 g durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el pellet se volvió a suspender en 2400 mL de agua usando un homogeneizador de tejidos. Luego se centrifugó el producto homogeneizado a 11,300 g durante 60 minutos a 4°C. El sobrenadante se desechó, y el pellet se volvió a suspender en volúmenes de 200 mL de agua usando un homogeneizador de tejidos. El producto homogeneizado luego se centrifugó a 27.200 g durante 30 minutos a 4°C, y se descartó el sobrenadante. Aproximadamente 12,5% del pellet se volvió a suspender en 28 ml de clorhidrato de Tris [20 mM], a pH 8, con 35 mg de lisozima de la clara de huevo de gallina (Sigma, San Luis, MO) usando un homogeneizador de tejidos, y se incubó a 37°C durante 20 minutos. Tras la incubación, la suspensión se centrifugó a 27,200 g durante 30 minutos a 22°C, y el sobrenadante se desechó. El pellet se volvió a suspender en 35 mL de clorhidrato de guanidina [8M] y 50 mM de clorhidrato de Tris, a pH 8, después de lo cual se agregaron 350 µl de DTT [1M] (Sigma, San Luis, MO), y el material se incubó a 37°C durante 30 minutos. Luego, la solución se centrifugó a 27,200 g durante 30 minutos a 22°C. Seguidamente, el sobrenadante se transfirió a 3,5 L de la solución amortiguadora para replegamiento (50 mM de base Tris, 160 mM de clorhidrato de arginina, 3 M de urea, 20% de glicerol a pH 9,5, 1 mM de cisteína, 1 mM de clorhidrato de cistamina), en un caudal de 1 ml/minuto con agitación suave a 4°C.

Ejemplo 4

Purificación de la construcción

Después de aproximadamente 40 horas de incubación a 4ºC con agitación suave, la solución replegada que se describe en el Ejemplo 3 se concentró a 500 µl usando un dispositivo de ultrafiltración de flujo tangencial con un cartucho de 30 kDa (Satorius, Goettingen, Alemania) seguido por la diafiltración contra 3 L de Q-solución amortiguadora A (20 mM de clorhidrato de Tris, a pH 8). El material concentrado se filtró a través de un filtro Whatman GF/A y se cargó a una columna de flujo rápido Q-Sefarosa de 86 ml (diámetro interno de 2,6 cm) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ), en un caudal de 15 ml/minuto. Después de lavar la resina con varios volúmenes de columna de Q-solución amortiguadora A, la proteína se eluyó usando un gradiente lineal de volumen de 20 columnas a 60% del Q-solución amortiguadora B (20 mM de clorhidrato de Tris, 1M de NaCl, a pH 8), en un caudal de 10 ml/minuto. Las fracciones pico se mancomunaron, y el grupo se pasó a través de un filtro de jeringa Mustang E (Pall Corporation, East Hills, Nueva York), en un caudal de 1 ml/minuto. El material filtrado se filtró por segunda vez a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 µm y se almacenó a una temperatura de -80ºC.

Ejemplo 5

PEGilación de proteínas

A una solución agitada y enfriada a 4ºC de mFc-TMP (3,5 ml; 0,8 mg/ml) en 100 mM de una solución amortiguadora de acetato sódico, a pH 5, que contenía 20 mM de NaCNBH3, se agregó un exceso molar de 3,8 veces de metoxipolietilenglicol aldehído (MPEG) (peso molecular promedio, 20 kDA) (Nektar). La agitación de la mezcla de la reacción continuó a la misma temperatura. El alcance de la modificación de la proteína durante el curso de la reacción se controló por SEC HPLC (cromatografía en fase líquida de alta resolución por exclusión molecular) con el empleo de una columna Superose 6 HR 10/30 (Amersham Biosciences), y la elusión se realizó con 0,05 M de solución reguladora de fosfato, 0,15 M de NaCl, a pH 7, en un caudal de 0,4 ml/min. Después de 16 horas, el análisis mediante SEC HPLC indicó que la mayoría de las proteínas se había conjugado en MPEG. En ese momento, se hizo el intercambio de la solución amortiguadora de la mezcla de reacción por 20 mM de solución amortiguadora Tris/HCl, a pH 8,12. Los conjugados de MPEG-mFc-AMP2 se aislaron por cromatografía de intercambio iónico usando una columna Hi Trap HP Q de 1 ml (Amersham Biosciences) equilibrada con 20 mM de una solución amortiguadora Tris/HCl, a pH 8,12. La mezcla de la reacción se cargó en la columna en un caudal de 0,5 ml/minuto y el aldehído MPEG no reaccionado se eluyó con tres volúmenes de columna de la solución amortiguadora iniciadora. Un gradiente de volumen de 20 columnas de 0% a 100% de 20 mM de solución amortiguadora Tris/HCl, a pH 8,12 que contenía 0,5 M de NaCl, se usó para eluir los conjugados de la proteína-polímero. Las fracciones (2 mL) recogidas durante la

separación por cromatografía de intercambio iónico se analizaron mediante SEC HPLC como se ha descripto anteriormente. Una fracción que contenía los conjugados mono y di-MPEG-mFc-TMP en una proporción aproximada de 2,3 a 1 (como se ha determinado mediante SEC HPLC) se concentró, y se filtró en forma esterilizada.

Ejemplo 6

Pruebas in vivo

Los ratones BDF1 (Charles River Laboratorios, Wilmington, Massachusetts) se dividieron en grupos de 10, y se les se inyectó -por vía subcutánea en los días 0, 21 y 42- el agente diluyente (PBS Dulbecco con 0,1% de albúmina de suero de bovino) o el agente diluyente con 50 µg de la proteína del conjugado mono y di-MPEG-mFc-TMP de prueba (como se ha descripto anteriormente) por kilo de animal. Cada grupo se dividió por la mitad y se les provocó una hemorragia (140 µl) del seno retro-orbital en puntos de tiempo alternos (días 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 19, 24, 26, 28, 31, 33, 40, 45, 47, 49, 52 y 59). El día 59, los ratones fueron anestesiados con isoflurano antes del sangrado. La sangre recolectada se analizó para realizar un recuento completo y diferencial usando un analizador de sangre automatizado ADVIA 120 con software murino (Bayer Diagnostics, Nueva York, Nueva York).

Ejemplo 7

Fc humano-TMP liofilizado

Estudios de tamizaje de la formulación liofilizada inicial

El cuerpo peptídico Fc humano-TMP descripto en el Ejemplo 7 de la presente corresponde a una forma dimérica de la SEQ ID NO: 1017, donde el Fc humano es SEQ ID NO:1, que tiene una metionina iniciadora en el extremo N terminal.

La estabilidad de Fc-TMP fue evaluada por varias técnicas cromatográficas: HPLC en fase inversa, HPLC por intercambio de cationes, HPLC de exclusión por tamaño y SDS-PAGE, que en todos los casos fueron indicadores de la estabilidad a temperatura elevada. Las formulaciones que oscilan en concentraciones de entre 0,1 y 40 mg/ml se examinaron tanto con respecto a la degradación química como física a temperatura acelerada, refrigerada y congelada. La estabilidad de Fc-TMP se evaluó con respecto a la variación del pH y la inclusión de manitol o glicina como agentes formadores de torta y sacarosa como un lioprotector. El manitol y la sacarosa se escogieron finalmente para una mayor optimización después de que el otro candidato (glicina) no mostró ninguna mejora en la estabilidad de la proteína. También quedó en evidencia que el Tween-20 (polisorbato 20) inhibió la agregación tras la liofilización en un rango de concentración de 0,002% a 0,1%. Las siguientes soluciones amortiguadoras se examinaron en los tamizajes en un rango de pH de 4 a 8: glicina, succinato, histidina, fosfato y Tris. De estos tamizajes, se demostró que el Fc-TMP formulado en la solución amortiguadora de histidina a pH 5 con el

agregado de una pequeña cantidad de Tween-20 (0,004%), era mejor en cuanto a la estabilidad.

Validación de la sacarosa y Tween-20 en la formulación Fc-TMP

Los posteriores esfuerzos de desarrollo se enfocaron sobre la validación del nivel de sacarosa, manitol y Tween-20 en la formulación, en una concentración de proteínas de aproximadamente 0,5 mg/ml (para dar cabida a los requerimientos de dosificación anticipada en la etapa clínica). El efecto de la sacarosa, el manitol y el Tween-20 en la optimización de la estabilidad quedó demostrado con estos estudios. Se iniciaron también estudios de seguimiento para prever problemas e inquietudes relacionados con la fabricación.

La sacarosa es beneficiosa para minimizar la degradación química a temperatura elevada

Se probó el efecto de variar las concentraciones de sacarosa y manitol sobre la estabilidad de Fc-TMP. La proteína se formuló a 0,3 y 2 mg/ml para clasificar el rango de concentración anticipada en la clínica. Además, se prepararon muestras con y sin 0,004% de Tween-20. La proporción de sacarosa:manitol se cambió, variando la cantidad de sacarosa y regulando el nivel de manitol en cada concentración de sacarosa para mantener la isotonicidad. Se examinaron las siguientes proporciones de sacarosa:manitol (expresadas como porcentaje en peso por volumen): 0,2:5,1; 0,5:4,8; 1:4,5; 1,5:4,3 y 2:4. Se muestra que las proporciones más altas de sacarosa:manitol minimizan la degradación química cuando se realiza el monitoreo mediante HPLC en fase inversa y por intercambio de cationes. Como se presenta en la Tabla 39, el pico principal porcentual se compara inicialmente y después del almacenamiento a temperatura elevada del Fc-TMP durante 18 semanas a 37°C. La pérdida más grande del pico principal por intercambio de cationes se produce en la formulación líquida (Fc-TMP formulada en 10 mM de acetato; 5% de sorbitol a pH 5), seguido por las formulaciones liofilizadas con 0,2; 0,5 y 1% de sacarosa, respectivamente. El efecto protector de la sacarosa al minimizar la degradación química también se observó mediante el análisis de HPLC en fase inversa de las muestras después del almacenamiento a temperatura elevada (Tabla 39). El pico principal porcentual (determinado a partir del análisis del HPLC en fase inversa de Fc-TMP) disminuye significativamente a los niveles bajos de sacarosa, pero no parece cambiar significativamente en las formulaciones con concentraciones de sacarosa mayores que 1%. Interpretados en conjunto, estos resultados indican que mantener los niveles de sacarosa en el 1,5% o más alto, resulta crítico para la estabilidad de Fc-TMP tras la liofilización.

Tabla 39

Fc-TMP en 10 mM de Histina, amortiguado a pH 5 con Tween-20

Pérdida de RP y pico principal de CEX-HPLC después de 18 semanas a 37ºC

Formulación	RP-HPLC		CEX-HPLC	
	Tiempo cero	18 semanas	Tiempo cero	18 semanas
0,2% Sacarosa, 5,1% Manitol	78,6	72,2	79,8	62,6
0,5% Sacarosa, 4,8% Manitol	77,3	73,1	78,9	71,6
1% Sacarosa, 4,5% Manitol	78,4	78,0	80,5	73,9
1,5% Sacarosa, 4,3% Manitol	73,2	79,8	80,5	78,7
2% Sacarosa, 4% Manitol	79,2	81,3	78,6	78,9
10mM Acetato, 5% Sorbitol, pH 5 (Control Liquido)	74,7	42,8	75,5	34,1

Mientras que el Fc-TMP en el control líquido (10 mM de acetato, 5% de sorbitol, formulación a pH 5) tiene un crecimiento significativo en el área pre- y pos-pico principal, la proteína muestra más degradación en la región posterior del pico principal, tras el análisis de las muestras liofilizadas con menores cantidades de sacarosa. El trabajo previo con las muestras de estabilidad líquida (después del almacenamiento a temperatura elevada) ha demostrado que la desamidación surge de la glutamina y arginina en la proteína, lo cual contribuye al crecimiento en la región pre-pico de las muestras líquidas.

A temperatura refrigerada, la degradación química no se observa mediante el intercambio de cationes y HPLC en fase inversa en la formulación liofilizada después del almacenamiento a largo plazo. Por ejemplo, los cromatogramas por intercambio de cationes no mostraron cambios aparentes bajo temperaturas variadas (-80ºC, 4ºC y temperatura ambiente controlada durante seis meses). Debido a la falta de degradación química en la formulación liofilizada durante el tiempo a temperatura ambiente controlada y más baja, gran parte del trabajo de desarrollo de la formulación se centró en minimizar la agregación física asociada con el secado por congelamiento.

El Tween-20 minimiza la agregación inducida por liofilización

Se necesita la inclusión de Tween-20 a una baja concentración (0,004%) para minimizar una pequeña cantidad de agregación que es evidente tras la liofilización. Esto puede ser demostrado al examinar los resultados relevantes de los diversos estudios de estabilidad en los que las muestras se evalúan para medir la estabilidad, con y sin el agregado de Tween-20.

Una concentración más alta de proteínas de Fc-TMP se usó primero para explorar un rango amplio de Tween-20, a fin de determinar la cantidad necesaria para minimizar la agregación. La concentración Fc-TMP en este estudio fue de 20 mg/ml, con niveles de Tween-20 fijados en 0,002; 0,004; 0,006 y 0,01%. Después del almacenamiento durante un año a 4°C, la agregación se limitó a <0,1% en todas las formulaciones con Tween-20. Los resultados de seis meses tampoco mostraron agregación significativa. Se escogió Tween-20 a 0,004% para hacer una mayor consideración en los estudios de la formulación, como se trata en la presente, definido para Fc-TMP en un nivel de 0,5 mg/ml. La Tabla 40 muestra el nivel de agregación en Fc-TMP controlada a tiempo cero, 3 y 11 meses después del almacenamiento a 4°C. En este estudio, el Fc-TMP se liofilizó a 0,5 mg/ml en la formulación mencionada anteriormente y en formulaciones con proporciones variables de sacarosa:manitol sin Tween-20 agregado. Además, se siguió la estabilidad en la formulación actual sin Tween-20 y se amortiguó a un pH de 4,5; 5 y 5,5. Los resultados muestran que solamente la formulación mencionada anteriormente tiene una agregación mínima a pH 5. En las formulaciones sin Tween-20, la agregación varía de 0,5% a aproximadamente 5%. La agregación también es más alta a pH 4,5 y 5,5 comparada a la que se detectó a pH 5. Las proporciones de sacarosa:manitol más bajas (0,2; 0,5 y 1% de las formulaciones de sacarosa) tienen mayor agregación, cuando los niveles están generalmente alrededor de 5%. Durante un tiempo, el nivel de agregación permanece constante en la formulación mencionada anteriormente y en la formulación sin Tween-20 durante un año.

Tabla 40

Fc-TMP en 10mM de histidina, formulaciones variadas, 0.5 mg/ml

Agregación porcentual medida por SEC-HPLC

Formulación	Tiempo Cero	3 meses	11 meses1
2% Sacarosa; 4% Manitol; pH 5 (con 0,004% Tween-20)	<0,1	<0,1	<0,1
2% Sacarosa; 4% Manitol; pH 4,5	2,4	2,9	-
2% Sacarosa; 4% Manitol; pH 5	0,5	1,6	0,8
2% Sacarosa; 4% Manitol; pH 5,5	2,3	2,5	-
0,2% Sacarosa; 5,1% Manitol; pH 5	4,8	7,3	-
0,5% Sacarosa; 4,8% Manitol; pH 5	5,1	4,4	-
1% Sacarosa; 4,5% Manitol; pH 5	4,5	4,3	-

1 Las muestras de la formulación optimizada se seleccionaron para la evaluación en el período de tiempo de 11 meses.

Se diseñaron estudios adicionales de la formulación para confirmar el efecto beneficioso del Tween-20 para minimizar la agregación. Todas las muestras en estos estudios se formularon a pH 5 con y sin 0,004% de Tween-20. La Tabla 41 indica la agregación porcentual despues del almacenamiento a 4°C para los intervalos de tiempo de 0, 18 semanas y un año en estabilidad. En tiempo cero, inmediatamente después de la liofilización, la agregación se minimiza en todas las muestras con 0,004% de Tween-20. Se observaron pequeños niveles de agregación en las muestras sin Tween-20, y el más alto se encontró en la formulación con 0,2% de sacarosa. La eficacia de Tween-20 para minimizar la agregación también se extiende al punto de tiempo de 18 semanas, habiéndose encontrado que la agregación porcentual más alta se presenta en las muestras que carecen de Tween-20 y con bajas proporciones de sacarosa:manitol. Después del almacenamiento durante un año a 4°C, la agregación también se mantiene baja en las muestras que contienen Tween-20.

Tabla 41

Fc-TMP en 10 mM de histidina, formulaciones variadas, 0.3 mg/ml,

Agregación porcentual medida por SEC-HPLC después del almacenamiento a 4°C, a pH 5

Formulación	Tiempo Cero	4 meses	1 año1
2% Sacarosa; 4% Manitol (con 0,004% Tween-20)	<0,1	0,2	<0,1
2% Sacarosa, 4% Manitol	0,2	0,2	-
0,2% Sacarosa; 5,1% Manitol (con 0,004% Tween-20)	<0,1	<0,1	<0,1
0,2% Sacarosa; 5,1% Manitol	1,1	1,3	-
0,5% Sacarosa; 4,8% Manitol (con 0,004% Tween-20)	<0,1	0,2	<0,1
0,5% Sacarosa; 4,8% Manitol	0,2	0,8	-
1% Sacarosa; 4,5% Manitol (con 0,004% Tween-20)	<0,1	<0,1	<0,1
1% Sacarosa; 4,5% Manitol	0,1	0,3	-
1,5% Sacarosa; 4,8% Manitol (con 0,004% Tween-20)	<0,1	<0,1	<0,1
1,5% Sacarosa; 4,8% Manitol	0,1	0,3	-

1 Las muestras con Tween-20 se seleccionaron para la evaluación en el punto de tiempo de un año.

Otro estudio de estabilidad, diseñado con el objetivo de probar la eficacia de los antioxidantes para minimizar la degradación química, reforzó el efecto protector de Tween-20. Los antioxidantes no tuvieron impacto para minimizar la degradación química luego del almacenamiento a temperatura elevada. Sin embargo, la formulación mencionada anteriormente, con 0,004% de Tween-20 y a una concentración de Fc-TMP de 0,2 mg/ml, tuvo <0.1% de agregación a tiempo cero y 0,1% después de 5 meses de almacenamiento a 4°C. La misma formulación sin Tween-20 tuvo 0,4% de agregación a tiempo cero y 1% de agregación después del almacenamiento durante cinco meses.

Los resultados del estudio de estabilidad presentados en las Tablas II, III y los estudios antes mencionados ilustran el efecto protector de Tween-20 para minimizar la agregación después de la liofilización. El crecimiento de la agregación durante el transcurso del tiempo es mínimo, a medida que los puntos de tiempo que se extienden a un año a 4°C no muestran ningún aumento significativo en la agregación de las muestras formuladas con 0,004% de Tween-20. Basado en estos resultados del estudio de estabilidad que muestran que el agregado de Tween-20 minimiza la agregación tras la liofilización, el trabajo a escala se inició con la formulación recomendada.

Estudios a Escala

La agregación depende de la concentración

Se diseñó un estudio a escala inicial para simular las condiciones de fabricación y examinar la solidez de la formulación con respecto a la tensión y estabilidad del despacho tras la reconstitución. Se cambió la solución amortiguadora del Fc-TMP por la solución amortiguadora de la formulación usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial, similar a los procesos a mayor escala. La proteína se diluyó posteriormente a concentraciones de 0,5 mg/ml y 0,1 mg/ml con Tween-20, también agregado antes del paso de la filtración final. Después de llenar las muestras, se llevó a cabo la liofilización. A continuación se describe un ejemplo del proceso de liofilización:

Pasos de tratamiento térmico

	Temperatura	Tiempo	Rampa/Espera
Paso 1	-50	120	R
Paso 2	-50	120	H
Paso 3	-13	60	R
Paso 4	-13	360	H
Paso 5	-50	60	R
Paso 6	-50	60	H

Temperatura de congelamiento	-50C
Congelamiento adicional	0 minuto
Punto de fijación del condensador	-60 C

Punto de fijación al vacío 100 m Torr

Pasos de Secado Primario

	Temperatura	Tiempo	Vacío	Rampa/ Espera
Paso 1	-50	15	100	H
Paso 2	-25	120	100	R
Paso 3	-25	600	100	H
Paso 4	-25	600	100	H
Paso 5	0	800	100	R
Paso 6	25	800	100	R
Paso 7	25	800	100	H
Paso 8	25	800	100	H
Paso 9	25	0	100	H
Paso 10	25	0	100	H
Paso 11	25	0	100	H
Paso 12	25	0	100	H
Paso 13	25	0	100	H
Paso 14	25	0	100	H
Paso 15	25	0	100	H
Paso 16	25	0	100	H
Calentamiento posterior	25	100	100	H

Temperatura Secundaria 28°C.

El almacenamiento pasivo a 4°C resultó en una mayor agregación a una baja concentración de Fc-TMP (0,1 mg/ml). En tiempo cero, mediante SEC-HPLC se determinó que la agregación era de 0,4% en 0,1 mg/ml de la formulación, mientras que se detectó 0,1% de agregación en la proteína formulada en un nivel de 0,5 mg/ml. Después de seis meses de almacenamiento a temperatura refrigerada, la agregación permaneció en los mismos niveles que se observaron en las muestras en tiempo cero para ambas concentraciones de Fc-TMP, según los resultados de los estudios previos de estabilidad. Debido a la mayor agregación observada a la concentración más baja (0,1 mg/ml) se decidió que 0,5 mg/ml sería la concentración más adecuada para el trabajo a escala adicional.

La agregación no aumenta cuando se simula el esfuerzo cortante

Las muestras liofilizadas (no reconstituidas) del estudio a escala inicial también se sometieron a una simulación de transporte terrestre y aéreo con ayuda del equipo de simulación de tensión. Brevemente, se respetó el protocolo definido por la ASTM

(American Society of Testing Methods), para el método D-4728. Se logró simular el transporte terrestre y aéreo usando una tabla de vibración electrodinámica, modelo S202 y un amplificador de potencia, modelo número TA240 (Unholtz-Dickie Corporation, Wallingford, CT). Después de la tensión del transporte, la apariencia física de las tortas liofilizadas se comparó con los controles pasivos, y el resultado de ello fue que no resultó obvio ningún cambio morfológico de la torta. Tanto la estabilidad química como la física fueron aceptables, y la agregación fue pareja en las muestras cizalladas y en los controles pasivos (<0.1% en las muestras de 0,5 mg/ml comparadas con 0,4% en las muestras de 0,1 mg/ml).

La estabilidad tras la reconstitución se examinó en este estudio preparando muestras recientemente reconstituidas e incubando durante 3, 7 y 14 días también pasivamente, con tamboreación lenta o con agitación enérgica. La Tabla 42 muestra los resultados para las formulaciones de 0,1 y 0,5 mg/ml. Como se esperaba, el nivel de agregación se minimiza en las formulaciones con 0,5 mg/ml. Si se compara la tamboreación lenta durante un tiempo con las muestras sin tamboreación, no se presentó ningún aumento significativo en la agregación durante el período de 14 días. La cantidad de dimerización en estas formulaciones (con y sin tamboreación) también es pareja. De manera interesante, los resultados de la agitación parecen presentar una tendencia; es decir, la agregación disminuye a niveles más bajo que los detectables después del tiempo cero, tanto en muestras de 0,1 como de 0,5 mg/ml. Mientras tanto, hay un aumento correspondiente en la cantidad de dimerización observada en la mayoría de las muestras agitadas en cada punto de tiempo, sugiriendo que existe cierta reversibilidad al ir desde la agregación al estado del dímero, luego de someter el Fc-TMP a cizallamiento.

Tabla 42

Fc-TMP en 10 mM de histidina, con 2% de sacarosa, 4% de manitol y 0,004% de Tween-20, a pH 5

Agregación porcentual medida por SEC-HPLC y dimerización después de almacenamiento en 4°C

0.1 mg/ml	Agregación al tiempo cero, dímero	Agregación a los 3 días, dímero	Agregación a los 7 días, dímero	Agregación a los 14 días, dímero
Sin tamboreación	0,4; 0,3	1,2; 0,6	1,1; 0,4	1,0; 0,4
Tamboreación	0,4; 0,3	0,7; 0,4	0,7; 0,3	1,1; 0,3
Agitación	0,4; 0,3	<0,1; 0,9	<0,1; 1,1	<0,1; 1,6
0.5 mg/ml				
Sin tamboreación	0,1; 0,5	0,2; 0,5	0,2; 0,5	0,2; 0,6

0.1 mg/ml	Agregación al tiempo cero, dímero	Agregación a los 3 días, dímero	Agregación a los 7 días, dímero	Agregación a los 14 días, dímero
Tamboreacón	0,1; 0,5	0,2; 0,6	0,1; 0,6	0,1; 0,6
Agitación	0,1; 0,5	<0,1; 0,9	<0,1; 1,0	<0,1; 2,2

El secado secundario durante 12 horas en el ciclo de liofilización es suficiente para minimizar la humedad residual

Se realizó un segundo estudio a escala, donde se intercambió la solución amortiguadora del Fc-TMP, y se diluyó a 0,5 mg/ml en la formulación recomendada. La liofilización se alcanzó con un ciclo constante de un paso de congelamiento inicial a -50°C, seguido de recocido a -13°C. Se bajó abruptamente la temperatura -50°C, se mantuvo durante una hora, y se inició el secado primario a -50°C con un punto de ajuste al vacío de 100 mTorr. Después de un breve periodo de mantenimiento a -50°C, la temperatura se llevó a -25°C a lo largo de 2 horas, se mantuvo a -25°C durante 20 horas, y luego se elevó gradualmente a 25°C después de alrededor de 27 horas, para dar comienzo al secado secundario. El secado secundario continuó durante un mínimo de 12 horas a 25°C. Durante el ciclo de liofilización, las muestras se retiraron después de 12, 18 y 24 horas del secado secundario con el fin de verificar la estabilidad y comparar el nivel de humedad residual. Los resultados mostraron que la humedad residual, medida mediante la titulación de Karl Fisher, fue de alrededor de 0,6% o menos (Tabla 43) en todas las muestras examinadas. La humedad es similarmente baja en las tortas con solución amortiguadora placebo. En base a este trabajo, el tiempo de secado secundario del ciclo de liofilización se puede acortar a un rango de 12 a 18 horas.

Tabla 43

Humedad residual en Fc – TMP

Tiempos de secado secundario mantenidos a 12, 18 y 24 horas

Tiempo de secado secundario	Humedad porcentual de Karl Fisher
12 horas	0,23
12 horas	0,38
Placebo amortiguador	0,43
18 horas	0,63
18 horas	0,28
Placebo amortiguador	0,3
24 horas	0,46
24 horas	0,37
Placebo amortiguador	0,31

Los resultados de estabilidad también fueron comparables en este rango de tiempo de secado secundario, dado que las muestras no tienen diferencias con respecto a la estabilidad química o física. Por ejemplo, la cantidad de agregación es <0.1% para todas las muestras examinadas, mientras que el dímero porcentual se encuentra invariablemente en el 0,1%. Estos resultados confirman que el tiempo del secado secundario se puede acortar a menos de 24 horas sin afectar la estabilidad inicial de la proteína.

Se hizo un trabajo adicional para evaluar la solidez de la formulación con respecto a las diferentes concentraciones de excipientes. Dado que el trabajo de estabilidad previo había demostrado que la sacarosa, por ejemplo, puede tener un impacto sobre la estabilidad, fue necesario examinar la solidez de Fc-TMP luego de cambios menores en los niveles de excipientes.

Estudio estadístico de Fc-TMP

Solidez de la formulación

Se ha diseñado un estudio estadístico inicial para examinar cambios menores en las variables de la formulación, tales como el pH de la formulación, resistencia de la solución amortiguadora de histidina y la proporción de sacarosa:manitol, para lo cual se utilizó un paquete de software E-chip. Estas muestras se liofilizaron, pero se usó un ciclo no óptimo de secado por congelamiento, el cual resultó en una mayor agregación que lo típicamente observado. El estudio fue un tamizaje, asumiendo una superficie de respuesta lineal. Los resultados de la evaluación de estabilidad mostraron que el pH (4,7 a 5,3) y la resistencia de la solución amortiguadora de histidina, (que varió de 5 a 15 mM), tuvo poco impacto en la estabilidad de Fc-TMP. Con el fin de verificar la contribución de Tween-20 y la proporción de sacarosa:manitol en la estabilidad total de Fc-TMP, se inició un estudio de diseño estadístico de seguimiento usando el ciclo de liofilización más óptimo.

Estudio de estabilidad estadístico cuadrático

El segundo estudio de diseño estadístico examinó variaciones de Tween-20 (0,001%, 0,0045% y 0,008%), la proporción de sacarosa:manitol (1,7:4,2; 2:4 y 2,3:3,8), y variaciones en la concentración de proteínas (0,3; 0,65 y 1 mg/ml). El pH de las formulaciones también se ajustó a 4,7; 5 y 5,3, y la resistencia de la solución amortiguadora de histidina varió entre 7, 10 y 13 mM. Las muestras se prepararon y liofilizaron usando un liofilizador Virtis (SP Industries, Inc., Gardiner, NY), con un ciclo conservador optimizado usado para los estudios de estabilidad previos. Los resultados de estabilidad se interpretaron usando E-chip (paquete de software de diseño estadístico, Hockessin, DE) en dos formas: una evaluación del impacto de las variables de la formulación sobre la cantidad de agregación y dimerización observadas en tiempo cero, y el efecto de las variables de la formulación sobre la estabilidad de almacenamiento a temperatura elevada (37°C), medida mediante las velocidades de cambio desde el tiempo cero.

Resultados de la formulación en tiempo cero del estudio estadístico cuadrático

Los resultados de la evaluación en tiempo cero mostraron que, como se esperaba, el Tween-20 minimiza la agregación, sin embargo, la concentración de proteínas también fue significativa para reducir la tendencia a la agregación luego del secado por congelamiento. El programa de software E-chip evalúa los efectos que las diferentes variables de entrada (las condiciones de la formulación) tienen sobre la agregación y la dimerización de Fc-TMP durante el secado por congelamiento. Con respecto a la dimerización de Fc-TMP en tiempo cero, se consideró que ningún excipiente de la formulación (en base a los resultados obtenidos con el software E-chip) tenía un efecto significativo. Diversas variables de la formulación tuvieron un impacto en la cantidad de agregación observada luego del secado por congelamiento de Fc-TMP. En base al resumen de los resultados proporcionados por E-chip, la concentración de Fc-TMP tuvo el efecto más grande sobre el grado de agregación observado en tiempo cero, seguido por el nivel de Tween-20. Se observa que la agregación es la más alta, en tiempo cero, en las muestras de baja concentración. Del mismo modo, las cantidades más altas de Tween-20 tienen mayor efecto protector al minimizar la agregación en tiempo cero, a pesar de que esta tendencia no es tan significativa como el efecto de la concentración de proteína. Se observaron cantidades más altas de agregación en este estudio en comparación con los resultados del estudio previo, y se observó alrededor de 0,5% de agregación en algunas muestras que tenían las concentraciones de proteínas más bajas con Tween-20.

Se observó que la variabilidad en la agregación disminuye a medida que aumenta la concentración de proteínas. En concentraciones de 0,5% mg/ml y más altas, el Fc-TMP tiene una agregación promedio menor que en las muestras formuladas en un nivel de 0,3 mg/ml o más bajo.

<u>El Tween-20 en un nivel de 0,004% es eficaz para minimizar la agregación luego del almacenamiento a temperatura elevada</u>

El estudio de diseño estadístico también se usó para evaluar cambios luego del almacenamiento a temperatura elevada. Las velocidades de agregación se compararon en las variadas condiciones de la formulación después de 16 días a 37°C restando los resultados de la temperatura elevada de los resultados iniciales (tiempo cero) y normalizando al tiempo de un mes. Las velocidades que son negativas se refieren a una aparente pérdida de la propiedad medida en el tiempo. Las variables de la respuesta (correspondientes a los resultados de los ensayos) se determinaron a través de RP-HPLC (pureza porcentual del pico principal y porcentaje pre-pico), HPLC por intercambio de cationes (pureza porcentual del pico principal), HPLC por exclusión de tamaño (agregación y formación de dímero) y NIR-agua (humedad residual mediante espectroscopia infrarroja, que se correlacionó con los resultados de la titulación de Karl Fisher en algunas muestras para verificar la exactitud).

Los resultados de una comparación de las velocidades de cambio obtenidas de cada técnica de ensayo mostraron que los cambios en la agregación y la oxidación por RP-

HPLC fueron estadísticamente significativos con respecto a la concentración de Fc-TMP y la concentración al cuadrado de Tween-20, entre dos desviaciones estándar. Es muy probable que el término Tween-20 al cuadrado surja de la naturaleza cuadrática del estudio que asume una superficie de respuesta curva. En este caso, el término Tween-20 al cuadrado se ajusta mejor al modelo, además de sugerir posiblemente que existe un efecto interactivo con sí mismo que afecta la estabilidad. Las otras respuestas medidas, como la pureza del pico principal considerada por HPLC por intercambio de cationes o las variadas condiciones de pH, por ejemplo, no presentaron ninguna respuesta significativa en cuanto al efecto sobre la estabilidad de la proteína.

Como es el caso en el estudio a escala inicial previamente tratado (las muestras con tamboreación, sin tamboreación y agitadas), la cantidad de agregación es menor después del almacenamiento a alta temperatura. La velocidad de cambio en estas muestras se usó para hacer predicciones en base al modelo estadístico (estudio cuadrático) para anticipar el efecto protector de Tween-20. La Tabla 44 muestra las predicciones para la cantidad de agregación esperada, en base al modelo de diseño estadístico, en la medida en que la concentración de Tween-20 aumenta de 0 a 0,008%. Como se muestra, la velocidad de agregación, normalizada a un mes a 37°C, es negativa (indicando la pérdida de agregado en estas condiciones) con la excepción de 0% de Tween-20, en cuyo caso se predeciría un aumento de la agregación. La velocidad de pérdida de agregado muestra ser igual en las concentraciones de Tween-20 de 0,002% y más, lo cual sugiere que el Tween-20 a niveles bajos (0,002%-0,006%) es suficiente para minimizar la degradación física. La velocidad de crecimiento de dímero, por consiguiente, es similar bajo estas condiciones y no se correlacionó estadísticamente con ningún excipiente de la formulación, como se mencionó anteriormente.

Tabla 44

Predicciones del modelo cuadrático estadístico

Concentración variada de Tween-20 y de Fc-TMP

Basado en 16 días de incubación a 37°C (normalizado a un mes)

% de Tween-20	Fc-TMP (mg/ml)	% SEC Adición	Límites de predicción	% de Oxidación por RP-HPLC	Límites de predicción
0	0,5	0,09	(-0,32; 0,50)	0,47	(-2,59;1,65)
0,002	0,5	-0,35	(-0,69; -0,0)	-0,68	(-2,44;1,08)
0,004	0;5	-0,53	(-0,87; -0,19)	-0,58	(-2,32;1,17)
0,006	0,5	-0,45	(-0,78; -0,12)	-0,17	(-1,86;1,52)
0,008	0,5	-0,12	(-0,46; 0,21)	0,54	(-1,18;2,26)
0,004	0,3	-0,59	(-0,94; -0,25)	0,58	(-1,18;2,34)

0,004	0,1	-0,63	(-1,10; -0,16)	2,69	(0,28;5,09)

La velocidad de cambio en la oxidación medida por RP-HPLC a 0,5 mg/ml, asumiendo que esto corresponde a los cambios en la región pre-pico de cada cromatograma, no es estadísticamente significativa con respecto al término Tween-20 al cuadrado. En este caso, el modelo (como se muestra en la Tabla 44) predice que a medida que la concentración de Tween-20 varía, la velocidad de oxidación coincide con los límites de los intervalos de predicción. La concentración de proteína afecta la oxidación, a medida que la velocidad de crecimiento aumenta de 0,58 a 2,69 y la concentración de proteína disminuye de 0,3 mg/ml a 0,1 mg/ml (mientras se mantiene el Tween-20 en un valor constante de 0,004%).

Los resultados sugieren que mantener la concentración de Tween-20 entre 0,002% y 0,006% es conveniente desde el punto de vista de la estabilidad. La cantidad de proteína también es importante, ya que la estabilidad empeora a concentraciones por debajo de 0,5 mg/ml.

Estabilidad de la temperatura refrigerada

Considerando lo antes mencionado, se usó la siguiente formulación para evaluar la estabilidad de la temperatura refrigerada del Fc-TMP liofilizado: 0,5% mg/ml de Fc-TMP en 10 mM de histidina amortiguada a pH 5, 2% de sacarosa, 4% de manitol, y 0,004% de Tween-20.

La formulación se monitoreó con respecto a la estabilidad de la temperatura refrigerada durante un periodo de un año. La Tabla 45 muestra los resultados de estabilidad de este estudio, con resultados que corresponden al tiempo cero, 3 meses y 1 año. Como se muestra, la pureza porcentual del pico principal, como se midió mediante HPLC en fase inversa y por intercambio de cationes, no parece disminuir con el tiempo. Las pequeñas diferencias en la pureza de pico principal durante el transcurso del tiempo son típicas de la variación normal en la resolución de las columnas cromatográficas y también se observan en el estándar congelado. La agregación porcentual es constante y no parece aumentar después de un año.

Tabla 45

Pico principal porcentual - HPLC en fase inversa

	Punto de Tiempo		
Concentración	0	3 meses	1 año
0,3	81,0	82,5	82,4
0,5	69,0	82,7	83,4
1,0	80,6	82,4	83,2
Material de Inicio Congelado	82,4	84,0	84,5

Pico principal porcentual - HPLC por intercambio de cationes

	Punto de Tiempo		
Concentración	0	3 meses	1 año
0,3	67,0	71,8	81,8
0,5	73,5	83,1	80,0
1,0	74,2	79,7	80,5
Material iniciador congelado	75,3	77,0	83,6

Agregación porcentual - HPLC por Exclusión de Tamaño

	Punto de Tiempo		
Concentración	0	3 meses	1 año
0,3	<0,1	0,1	0,1
0,5	<0,1	<0,1	0,1
1,0	<0,1	<0,1	<0,1
Material iniciador congelado	0,1	0,1	<0,1

El Fc-TMP se formula en 10 mM de histidina, amortiguada a pH 5 con 2% de sacarosa, 4% de manitol y 0,004% de Tween-20. Se ha demostrado que el pH 5 es más óptimo para la estabilidad, y que la proporción de sacarosa:manitol es importante para minimizar la degradación química luego del almacenamiento a temperatura elevada para este sistema de proteína. Se necesita Tween-20 en una baja concentración para minimizar el nivel de agregación que se produce como resultado del proceso de liofilización. Los estudios de estabilidad para las aplicaciones a escala sustentan estas conclusiones. También se han diseñado estudios estadísticos que validan el nivel de cada excipiente en la formulación, incluso la necesidad de que la concentración de proteína sea de 0,5 mg/ml. La estabilidad a temperatura refrigerada de la formulación recomendada no muestra degradación significativa después del almacenamiento durante un año a 4°C.

Ejemplo 8

Péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang

Con el fin de determinar la formulación óptima para el péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang-2, se llevaron a cabo análisis que evaluaron la agregación del péptido que se enlaza a Fc-Ang-2 y la estabilidad a diversos niveles de pH, concentraciones de excipiente y concentraciones de proteínas.

El péptido que se enlaza a Fc-Ang-2 consta de dos moléculas polipéptidas farmacéuticamente activas unidas al extremo C terminal de la porción Fc de una molécula del anticuerpo IgG1. La molécula está compuesta por 574 residuos de aminoácidos con un peso molecular total de 63,511 Daltons. El pI de la molécula es 5,45. Existen dos enlaces disulfuro en cada uno de los polipéptidos activos. Hay un total de 20 residuos

cisteína en toda la molécula, la mayoría de los cuales se oxida en puentes de disulfuro. La secuencia del péptido que se enlaza a Fc-Ang-2 es la siguiente:

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYV
DGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKA
KGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVL
DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGAQQ
EECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO: 2)

La porción Fc de la IgG1 termina en K228. G229-G233 compone una secuencia enlazadora. El polipéptido activo se inicia en A234 y se extiende hasta el resto de la secuencia.

Análisis del pH del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang-2

El análisis de pH probó la estabilidad de un péptido que se enlaza a Fc-Ang-2 a pH 4, 7 y 8. A pH 4, las soluciones amortiguadoras analizadas incluyeron ácido glutámico, citrato de sodio y succinato de sodio, cada una a una concentración de 10 mM. A pH 7, las soluciones amortiguadoras analizadas fueron histidina y tris, ambas en una concentración de 10 mM. También se analizaron histidina y Tris a pH 8, cada uno en un nivel de 10mM. Cada una de las soluciones amortiguadoras contenía 4% de manitol como agente de endurecimiento y liofilización y 2% de sacarosa como un excipiente. Además, se examinó la solución amortiguadora de histidina a pH 7 con y sin la presencia de un tensioactivo: 0,01% de Tween-20 (peso/peso). La proteína se diluyó a 5 mg/ml con cada uno de los amortiguadores de la formulación. Esta solución luego se dializó en cada uno de los amortiguadores de la formulación usando tubos de diálisis con un límite de exclusión por peso molecular de 10,000 Da, donde se realizó un total de 6 intercambios con un mínimo de 4 horas de equilibrio entre los intercambios. Después de la diálisis, la proteína se dividió en alícuotas en viales de vidrio de 3 cc con un volumen de relleno de 1 ml. Estos viales luego se liofilizaron usando un instrumento de secado por congelamiento a escala de laboratorio. Después de la liofilización, los viales se sellaron y almacenaron para incubación a 4°C, 29°C y 37°C, donde los viales individuales se retiraron y analizaron a diversos puntos durante el transcurso del tiempo, empezando inmediatamente después de la liofilización y extendiéndose hasta un periodo de 24 meses. Las muestras se reconstituyeron con el volumen de agua adecuado y se analizaron con respecto a la estabilidad de las proteínas, con el empleo de cromatografía líquida por exclusión de tamaño y electroforesis en gel (que detectan la agregación, dimerización y clivaje proteolítico), cromatografía líquida de intercambio de aniones (que detecta la oxidación). Además, se analizaron las propiedades de la torta, como los tiempos de reconstitución y la humedad, como así también las propiedades de la solución líquida reconstituida (por ejemplo, el pH).

Estudio del excipiente del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang-2

El análisis de excipiente se realizó en un sólo amortiguador, 10mM de histidina, a pH 7. Los dos excipientes comparados en este estudio fueron 0,85% de arginina y 1% de sacarosa. El agente de aglomeración usado con arginina fue 4% de manitol, y el agente de aglomeración usado con sacarosa fue 2% de glicina. Cada una de las formulaciones se probó a las concentraciones de proteína de 1 mg/ml, 30 mg/ml, y 60 mg/ml. Además, se probó una formulación que contiene una combinación de manitol y sacarosa a 30 mg/ml. Cada una de las formulaciones contenía 0,01% de Tween-20. Primero, se concentró la proteína a 70 mg/ml y se dializó en la formulación adecuada usando un dispositivo a escala de laboratorio de ultrafiltración/dialfiltración. La proteína luego se diluyó para cada una de las tres concentraciones con la solución amortiguadora de la formulación adecuada. Luego, la proteína se dividió en alícuotas en viales de vidrio de 3 cc con un volumen de relleno de 1 ml. Los viales luego se liofilizaron usando un instrumento a escala de laboratorio de secado por congelamiento. Después de la liofilización, los viales se sellaron y almacenaron para incubación a 4°C, 29°C, 37°C y 52°C, donde los viales individuales se retiraron y analizaron a diversos puntos durante el transcurso del tiempo, empezando inmediatamente después de la liofilización y extendiéndose hasta un periodo de 24 meses. Las muestras se analizaron con respecto a la estabilidad de las proteínas, con el empleo de cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de aniones y SDS-PAGE. Además, se analizaron las propiedades de la torta liofilizada y las soluciones líquidas reconstituidas.

Análisis de la concentración del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang-2

El análisis de la concentración se realizó en 10 mM de histidina a pH 7,2; con 4% de manitol como el agente de endurecimiento y 2% de sacarosa como un excipiente. La proteína se concentró a aproximadamente 140 mg/ml y se dializó en la formulación, usando un dispositivo a escala de laboratorio de ultrafiltración/dialfiltración. La proteína dializada luego se diluyó a 30 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml en la solución amortiguadora de la formulación. Luego, las soluciones se dividieron en alícuotas en viales de vidrio de 3 cc a un volumen de relleno de 1 ml. Los viales luego se liofilizaron usando un instrumento a escala de laboratorio de secado por congelamiento. Después de la liofilización, los viales se sellaron y almacenaron para incubación a 4°C, 29°C, 37°C y 52°C, donde los viales individuales se retiraron y analizaron a diversos puntos durante el transcurso del tiempo, empezando inmediatamente después de la liofilización y extendiéndose hasta un periodo de 24 meses. Las muestras se analizaron con respecto a la estabilidad de las proteínas, con el empleo de cromatografía por exclusión de tamaño, cromatografía de intercambio de aniones y SDS-PAGE. Además, se analizaron las propiedades de la torta liofilizada y las soluciones líquidas reconstituidas.

Conclusión

Considerando lo antedicho, las formulaciones óptimas comprenden 10 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa, 0,01% de Tween-20, a pH 7.

Ejemplo 9

Péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3

Con el fin de determinar la formulación óptima para el péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Ang-3, se llevaron a cabo análisis para evaluar la agregación del péptido que se enlaza a Fc-Ang-3 y la estabilidad a diversos niveles de pH, concentraciones de excipiente y concentraciones de proteína.

El péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 es un cuerpo peptídico enlazado a N contra el factor de activación de los linfocitos B (BAFF), cuyo objetivo son las enfermedades relacionadas con los linfocitos B. El cuerpo peptídico se compone de dos polipéptidos enlazados a disulfuro no-glicosilados con una masa total de ~63,6 kD. Se ha estimado que el punto isoeléctrico para este cuerpo peptídico es a pH 7,36.

SECUENCIA de Fc (SEQ ID NO: 1696):

VDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCV VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVV SVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPRE PQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSPGK

SECUENCIA DEL PÉPTIDO DE ENLACE a Agp-3 (SEQ ID NO: 1697):

GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLP GCKWDLLIKQWVCDPLGGGGG

De este modo, la secuencia del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 es la siguiente:

GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLP GCKWDLLIKQWVCDPLGGGGGVDKTHTCPPCPAPELLGGPS VFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLT CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 1698)

Barrido amplio del pH del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3 en un nivel de 10 mg/ml

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), que fue la estabilidad indicada a temperaturas elevadas. Para evaluar la estabilidad y las propiedades de reconstitución del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3 en el rango de pH de 3,85 a 7,6; se formularon 10 mg/ml del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 en varios amortiguadores [10 mM] en presencia de 2,5% de manitol y 2% de sacarosa. Las siguientes soluciones amortiguadoras se probaron en incrementos de pH en unidades aproximadas de 0,5: acetato, succinato, histidina, pirofosfato, fosfato y Tris.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones amortiguadoras de la formulación adecuadas y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. El paso de recocido se llevó a cabo a -20°C y duró 4 horas para permitir la cristalización de manitol. El secado primario se realizó a temperatura de almacenamiento de -25°C durante 20 horas. El secado primario llegó a su término a -25°C, dado que no se observó ningún pico en el vacío cuando la temperatura de almacenamiento se elevó a 0°C. No se observó ningún colapso significativo y las muestras se siguieron analizando satisfactoriamente durante el secado secundario, primero a 0°C, y luego a 25°C. Tras la reconstitución, las formulaciones a pH 7 o superior resultaron ligeramente turbias, mientras que todas las demás formulaciones eran claras. Esto se explicó por la proximidad de las formulaciones con alto pH al punto isoeléctrico del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 (pI=7.36). El análisis SE-HPLC reveló un dímero como la especie principal de alto peso molecular. Se observó que el dímero relativo porcentual era fuertemente dependiente del pH con la acumulación más baja a pH 5 y debajo de éste. La cantidad de agregados solubles también demostró cierta dependencia del pH. No se observaron agregados solubles en las muestras antes de la liofilización. Por el contrario, una pequeña cantidad de dímero estaba presente en todas las formulaciones antes de la liofilización y aumentó aún más en las muestras reconstituidas, después de la liofilización. No se observó ningún recorte significativo en ninguna de las formulaciones. La mayor cantidad del monómero intacto fue en el caso de las formulaciones de acetato, succinato e histidina a pH 5 y menor que éste.

Barrido amplio del pH del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3 en un nivel de 30 mg/ml: efecto estabilizante de la sacarosa y el manitol

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), que fue la indicadora de estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de 2,5% de manitol y 3,5% de sacarosa sobre la estabilidad y las propiedades de reconstitución del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3 en el rango de pH de 4,5 a 7,5, se formularon 30 mg/ml del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 en soluciones amortiguadoras de 10 mM de succinato, histidina y fosfato. Las soluciones amortiguadoras de pirofosfato y Tris se excluyeron de este estudio debido al deficiente rendimiento en el tamizaje amplio de pH previo. Se excluyó la solución amortiguadora de acetato debido a la posibilidad de cambios de pH en las muestras reconstituidas como resultado de la sublimación del acetato durante el secado por congelamiento.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones amortiguadoras de la formulación adecuadas y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. El paso de recocido se llevó a cabo a -20°C y duró 5 horas para permitir una más completa cristalización del manitol. El secado primario se realizó a temperatura de almacenamiento de -25°C durante 20 horas. El secado primario no se

completó íntegramente a -25°C, y no se observó ningún pico en el vacío cuando la temperatura de almacenamiento se elevó a 0°C. No se observó ningún colapso significativo y las muestras se siguieron analizando satisfactoriamente durante el secado secundario, primero a 0°C, y luego a 25°C. Tras la reconstitución, las formulaciones a pH de alrededor de 7 fueron ligeramente turbias, mientras que todas las demás formulaciones eran claras. Como se mencionó anteriormente, esto se puede explicar por la proximidad de las formulaciones con alto pH al punto isoeléctrico del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3. El análisis por SE-HPLC reveló un dímero como la especie principal con alto peso molecular. Nuevamente, se observó que el porcentaje relativo de dímero tenía una estrecha dependencia del pH, con la acumulación más baja a pH 5 y menor que éste. La cantidad de agregados solubles también demostró clara dependencia del pH. No se observaron agregados solubles en las muestras antes de la liofilización. Se observó ~0.6% de dímero en el material volumétrico sin GMP antes de la formulación y aumentó hasta 3% para las formulaciones con alto pH antes de la liofilización como resultado del intercambio/concentración de la solución amortiguadora.

También se confirmó la dependencia de pH de la acumulación de dímero mediante la directa correspondencia de la cantidad relativa de dímero con un pH determinado, independientemente del tipo de solución amortiguadora. El porcentaje de dímero no aumentó significativamente después de la liofilización, como se evidencia en las muestras en T=0. La única excepción fueron las muestras que no contenían ni sacarosa ni manitol, lo cual demostró evidente incremento de ~0,25% a 0,5% en el porcentaje de dímero. En presencia de sacarosa, la pérdida del pico principal fue mínima incluso después del intercambio/liofilización de la solución amortiguadora para las formulaciones de succinato e histidina con un pH de 4,1 y 4,7, respectivamente. En comparación con éstos, todas las formulaciones de fosfato mostraron pérdida de ~3% del pico principal antes de la liofilización. A pesar de que se formó la torta incluso en ausencia de sacarosa y manitol, el correspondiente pico principal disminuyó en 0,5%-0,7% en comparación con las formulaciones que contienen azúcar. Además, la reconstitución de las formulaciones sin azúcar duró mucho más (> 2 minutos) y requirió un poco de agitación. Con el fin de asegurar la solidez de la torta, se incluyó manitol o glicina como agente de carga en todas las formulaciones posteriores aún cuando se demostró que solo la sacarosa confería suficiente estabilidad de proteína.

<u>Barrido estrecho del pH del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Agp-3 en un nivel de 30 mg/ml</u>

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC) y HPLC en fase inversa (RP-HPLC), que fueron los indicadores de estabilidad a temperaturas elevadas. Dado que el porcentaje de recuperación del pico principal fue mayor a pH 5 y por debajo de este nivel, la solución amortiguadora de fosfato se omitió del barrido estrecho de pH. Además de las sustancias amortiguadoras de succinato e histidina, que tuvieron buen rendimiento en los barridos amplios de pH, el barrido estrecho

de pH incluyó 10 mM de glutamato, a pH 4-6. Las formulaciones se probaron a incrementos unitarios de pH de 0,2. El contenido de sacarosa y manitol se mantuvo constante a 3,5% y 2,5%, respectivamente, excepto para las dos formulaciones de succinato a pH 4,5 con 2% y 5% de sacarosa. Asimismo, se probaron seis lioformulaciones genéricas potenciales en cada incremento unitario de pH, tal como:

1) 20 mM de histidina, 2% de glicina, 1% de sacarosa a pH 5
2) 20 mM de histidina, 2% de glicina, 1% de sacarosa a pH 6
3) 20 mM de histidina, 2% de glicina, 1% de sacarosa a pH 7
4) 20 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 5
5) 20 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 6
6) 20 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 7

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones amortiguadoras de la formulación adecuadas y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. Posteriormente, se modificó el ciclo de liofilización. El paso de recocido se llevó a cabo a -15°C para permitir la cristalización de glicina, y duró 5 horas. El secado primario se realizó inicialmente a -30°C durante un corto periodo de tiempo (4 horas). Luego, la temperatura de almacenamiento se elevó a -25°C y se mantuvo constante durante 24 horas. Sin embargo, el secado primario no se completó íntegramente a -25°C como queda demostrado mediante un pequeño pico en el vacío cuando la temperatura de almacenamiento se elevó hasta 0°C. De todas maneras, no se observó ningún colapso significativo y las muestras continuaron analizándose satisfactoriamente durante el secado secundario, primero a 0°C, y luego a 25°C. Se generaron datos de estabilidad del estado liofilizado de hasta 6 meses a 37°C para evaluar la estabilidad a largo plazo del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3. El aumento en el pH ocasiona la pérdida del pico principal para todas las formulaciones de histidina. Sólo se evaluaron las formulaciones genéricas hasta 6 meses, pero la ventaja de un pH de aproximadamente 5 era obvia para los puntos de tiempo de 1 y 3 meses. Más aún, los datos de 6 meses para las formulaciones genéricas sugieren que las formulaciones de manitol+sacarosa son más estables que las de glicina+sacarosa, especialmente a pH 6 y mayor que éste.

En el caso de formulaciones de glutamato y succinato, también hubo un claro incremento dependiente del pH en la cantidad de dímero, el principal producto de degradación, en la medida que el pH se vuelve menos ácido. Una dependencia similar del pH se observa en los agregados. La mayor recuperación del pico principal se observó para un pH 5 y menor que éste. La pérdida inicial del pico principal para T=0 se puede explicar mediante la degradación de proteínas durante el intercambio de solución amortiguadora y la concentración, como se demuestra mediante una pérdida similar para las formulaciones antes de la liofilización. Sin embargo, los datos de estabilidad de 3 meses sugieren que las formulaciones de glutamato tenían una estabilidad física mayor que sus contrapartes

de succinato (con el mismo pH). Hay que tener en cuenta que en este estudio también hemos probado el efecto de las elevadas concentraciones de sacarosa sobre la estabilidad de las formulaciones de succinato. Además del 3,5% de sacarosa, hemos comparado las formulaciones con 2% y 5% de sacarosa en succinato, a pH 4,5. El aumento de la sacarosa disminuyó las especies con alto peso molecular en cierta medida, pero esto no afectó significativamente la cantidad del pico principal. Por consiguiente, se consideró óptimo el 3,5% de sacarosa dado que dichas formulaciones coincidieron más con la tonicidad fisiológica.

Se observó mediante RP-HPLC una de las especies "clip" que se desarrollaba a un pH bajo. Una significativa parte del recorte (clipping) dependiente de pH en las formulaciones liofilizadas se realizó antes de la liofilización, como resultado de los pasos de intercambio de soluciones amortiguadoras y de concentración de proteínas que insumen tiempo. Después de la liofilización no se observó ningún incremento significativo en la cantidad de clips, ni siquiera después del almacenamiento de 3 a 6 meses a 37°C. En general, los datos sugieren usar formulaciones con un pH más alto para mitigar el recorte, dado que esto no se puede observar a un pH de 6 y más. Sin embargo, la cantidad de dímero es significativa a un pH mayor y puede ser tan alta como 2,5% a 4,5% a un pH de 6 y superior a éste. Por consiguiente, se puede llegar a un acuerdo al formular un péptido que se enlaza a Fc-Agp-3 a pH 5, donde el recorte es moderado, especialmente en las soluciones amortiguadoras de glutamato e histidina, y cuando la formación de dímero aún está suficientemente suprimida.

Conclusión

Los niveles de 2,5% de manitol y 3,5% de sacarosa han proporcionado suficiente estabilidad de la torta y de la proteína, como se confirma en el estudio de almacenamiento de 6 meses a 37°C. Por lo tanto, se pueden usar 10 mM de histidina, 2,5% de manitol, 3,5% de sacarosa a pH 5; y 10 mM de glutamato, 2,5% de manitol, 3,5% de sacarosa a pH 5, para formular 30 mg/ml del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3. Además, este estudio demuestra que 20 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 5 también se hace sin problemas y se puede considerar como una posible lioformulación genérica para los cuerpos peptídicos.

Ejemplo 10

Péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo

A fin de determinar la formulación óptima para el péptido que se enlaza a Fc-Myo liofilizado, se realizaron análisis que evaluaron la agregación del péptido que se enlaza a Fc-Myo y la estabilidad a diversos valores de pH, concentraciones de excipiente y concentraciones de proteína.

El péptido que se enlaza a Fc-Myo es un cuerpo peptídico enlazado a C contra la proteína de miostatina para combatir las enfermedades relacionadas a atrofia muscular. El cuerpo peptídico se compone de dos polipéptidos enlazados a disulfuro no-glicosilados con una

masa total de ~59,1 kD. Se ha estimado que el punto isoeléctrico para este cuerpo peptídico es el pH 6,88.

SECUENCIA de Fc (SEQ ID NO: 1699):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGK

SECUENCIA DEL PÉPTIDO QUE SE ENLAZA A MIOSTATINA (SEQ ID NO:1700):

GGGGGAQLADHGQCIRWPWMCPPEGWE

De este modo, la secuencia del péptido que se enlaza a Fc-Myo es la siguiente:

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV
VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPR
EPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ
PENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM
HEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGAQLADHGQCIRWPWMCP
PEGWE (SEQ ID NO:1701)

Determinación de la condición del pH para el péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC), que fue la estabilidad que se indica a temperaturas elevadas. Se diseñó y llevó a cabo un barrido del pH para determinar el pH de la formulación óptimo en el estado líquido antes de la liofilización. La proteína se formuló a pH 4,5; 4,75; 5; 5,5 y 6 con agentes de amortiguación de acetato e histidina, y sacarosa como estabilizador (o lioprotector). Los viales formulados se almacenaron a 29°C durante 1 año, como máximo. Se verificó la estabilidad usando la técnica de SE-HPLC. Los constantes de la velocidad de agregación se calcularon para cada una de las condiciones de la formulación. Se encontró que la velocidad de agregación a pH 4,5 era el mínimo, por lo tanto se seleccionó un pH de 4,5 como la condición de pH recomendada para la formulación.

Estudio del agente amortiguador del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo en un nivel de 30 mg/mL

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), que fue la indicadora de estabilidad. Se investigó una forma de dosificación de 30 mg/mL usando tres diferentes agentes de amortiguación: 10 mM de glutamato, 10 mM de histidina y 10 mM de succinato a pH 4,5. Todas las formulaciones contienen 0,004% de polisorbato 20.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones de la formulación adecuadas, y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo

conservador. La formulación de la proteína liofilizada presentó una torta aceptablemente elegante. Tras la reconstitución, las formulaciones resultaron transparentes.

El péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo se almacenó a 4, 29, 37 y 52°C. Los estudios de estabilidad en tiempo real se llevaron a cabo a 4°C, y se encontró que eran comparables para estas formulaciones durante 3 meses, como máximo. Sin embargo, en almacenamiento a 52°C durante 3 meses, la formulación que contenía histidina fue ligeramente mejor que la formulación que contenía glutamato. La formulación que contenía succinato fue significativamente menos estable que las otras dos formulaciones. En base a estos resultados, la histidina y el glutamato se consideraron los agentes amortiguadores recomendados para la formulación final del péptido que se enlaza a Fc-Myo.

Estudio del excipiente del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo en un nivel de 30 mg/ml: efecto estabilizador de la sacarosa, la trehalosa y el almidón de hidroxietilo

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), que fue la indicadora de estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de trehalosa, almidón de hidroxietilo y sacarosa sobre la estabilidad del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo, se formuló el péptido que se enlaza a Fc-Myo en un nivel de 30 mg/mL en 10 mM de solución amortiguadora de glutamato con 4% de manitol. La concentración de trehalosa y sacarosa usada fue del 2%, se agregó 1% de almidón de hidroxietilo a la formulación de sacarosa para obtener la formulación final con 10 mM de glutamato, 4% de manitol, 2% de sacarosa, 1% de almidón de hidroxietilo. Todas las formulaciones contenían 0,004% de polisorbato 20.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones amortiguadoras de la formulación adecuadas, y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. La formulación de la proteína liofilizada presentó una torta aceptablemente elegante. Tras la reconstitución, las formulaciones resultaron transparentes

La estabilidad de estas formulaciones se controló con el empleo de la técnica de SE-HPLC.

El péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo se almacenó a 4, 29, 37 y 52°C. Se encontró que la estabilidad de la condición del tiempo de almacenamiento en tiempo real (4°C) resultó comparable entre estas formulaciones durante un máximo de 3 meses. Sin embargo, en almacenamiento a 52°C durante 3 meses, la formulación que contenía sacarosa fue ligeramente mejor que la formulación que contenía trehalosa. Además, el almidón de hidroxietilo no presentó ningún efecto negativo sobre la estabilidad. Basado en estos resultados, se consideró que la sacarosa era el estabilizador recomendado para la formulación final del péptido que se enlaza a Fc-Myo.

Estudio de excipiente del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo en un nivel de 30 mg/ml: efecto estabilizador de la sacarosa y el manitol

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), que fue la indicadora de estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de una cantidad variable de manitol y sacarosa sobre la estabilidad y las propiedades de reconstitución del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo en el rango de manitol de 4 a 8% y el rango de sacarosa de 1% a 4%, el péptido que se enlaza a Fc-Myo se formuló en un nivel de 30 mg/mL en 10 mM de solución amortiguadora de glutamato. Todas las formulaciones contenían 0,004% de polisorbato 20.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. El material se dializó en las soluciones amortiguadoras de la formulación adecuadas, y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. La formulación de la proteína liofilizada presentó una torta aceptablemente elegante. Tras la reconstitución, las formulaciones resultaron transparentes

La estabilidad de estas formulaciones se controló con el empleo de la técnica de SE-HPLC. El péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo se almacenó a 4, 29, 37 y 52°C. Se encontró que la estabilidad de la condición del tiempo de almacenamiento en tiempo real (4°C) resultó comparable entre estas formulaciones durante un máximo de 3 meses. Sin embargo, cuando se almacenó a 52°C durante 3 meses, se halló que un aumento en la cantidad de sacarosa contribuye al aumento de la estabilidad frente a la agregación. Debido a una preocupación por mantener la condición isotónica para la formulación final de manera que limite la cantidad total de disacáridos y mantener una proporción adecuada de manitol y sacarosa para preservar la propiedad de la torta liofilizada, 4% de manitol y 2% de sacarosa fueron los excipientes recomendados para la formulación final.

Estudio de excipiente del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo en un nivel de 1, 30 y 85 mg/mL:

La estabilidad se evaluó principalmente mediante HPLC por exclusión de tamaño (SE-HPLC), que fue la indicadora de estabilidad. Para evaluar el efecto de la concentración de la proteína sobre la estabilidad y las propiedades de reconstitución del péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo, el péptido que se enlaza a Fc-Myo se formuló en niveles de 1, 30, 85 mg/mL en 10 mM de solución amortiguadora de glutamato con 4% de manitol y 2% de sacarosa. Todas las formulaciones contenían 0,004% de polisorbato 20.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material volumétrico purificado en 30 mg/ml de la formulación líquida congelada. Se intercambió la solución amortiguadora del material por las soluciones amortiguadoras de la formulación apropiadas usando UF/DF, y se liofilizó en un liofilizador Virtis usando un ciclo conservador. La formulación de la proteína liofilizada presentó una torta aceptablemente elegante. Tras la reconstitución, las formulaciones resultaron transparentes

La estabilidad de estas formulaciones se controló con el empleo de la técnica de SE-HPLC. El péptido liofilizado que se enlaza a Fc-Myo se almacenó a 4, 29, 37°C. Se encontró que la estabilidad de las condiciones de la vida en estantería en tiempo real (4°C) era comparable entre estas formulaciones durante un máximo de 6 meses. La estabilidad probablemente sea aceptable para todas las concentraciones estudiadas como la formulación del producto comercial.

Conclusión

Los niveles de 4% de manitol y 2% de sacarosa han proporcionado suficiente estabilidad a la torta y a la proteína, como se confirma en el estudio de almacenamiento de 12 meses a 4°C. Por lo tanto, se pueden usar 10 mM de histidina, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 4,5; y 10 mM de glutamato, 4% de manitol, 2% de sacarosa a pH 4,5, para formular 1 a 100 mg/ml del péptido que se enlaza a Fc-Agp-3.

La presente invención se ha descripto en términos de formas de realización particulares encontradas o que se proponen para comprender los modos recomendados para su puesta en práctica.

Los expertos en la técnica podrán apreciar que, de acuerdo con la explicación que aquí se brinda, se pueden hacer diversas modificaciones y cambios en las formas de realización particulares ejemplificadas sin alejarse del alcance previsto de la invención.

REIVINDICACIONES SOLICITUD DIVISIONAL

1. Una composición liofilizada de pepticuerpos terapéuticos, que comprende un regulador, un agente de carga, un agente estabilizante y un surfactante, donde el pepticuerpo terapéutico comprende SEQ ID NO: 1698; dicho regulador es 10 mM de histidina o glutamato, el pH es 5,0; dicho agente de carga es 2,5% de manitol y dicho agente estabilizante es 3,5% de sacarosa; y dicho surfactante es 0,004% de polisorbato 20.

2. La composición de la reivindicación 2, donde la concentración del pepticuerpo terapéutico se selecciona del grupo formado por 1, 10, 30 y 100 mg/ml.

RESUMEN

La presente invención proporciona formulaciones estables a largo plazo de un cuerpo peptídico terapéutico liofilizado y métodos para elaborar una composición liofilizada que comprende un cuerpo peptídico terapéutico.

188

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO
NIT : 800.176.089-2
- / -

Industria y Comercio
SUPERINTENDENCIA

RECIBO DE CAJA

No. 15 - 0015373

Bogotá D.C., Febrero 06 de 2015 - 15:18:47

RECIBIDO DE : CASTELLANOS Y Y CO NI 800.174.641

*** Soporte del Pago ***

TIPO PAGO	BANCO	CUENTA	No. PAGO	FECHA PAGO	VR.PAGO
CONSIGNACION	BANCO DE BOGOTA	062754387	686327751	06/02/2015	478.000.00

*** Conceptos Pagados ***

CANT.	RENTISTICO	CONCEPTO	Vr.UNDITARIO	Vr.CONCEPTO
1	50005-01-01 SOLICITUDES	2205 DIVISIONAL SOLICITUD DE PATENTE DE INVENCION CONT. DERE	478.000.00	478.000.00
				$478.000.00

SON: **CUATROCIENTOS SETENTA Y OCHO MIL PESOS MONEDA CORRIENTE***

Responsable: _____
****

Recibo de Caja Aplicado al Expediente No. _____

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-024738- -00000-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-121925-A-00010-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO

No. 08-121925-A-00010-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:08 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 851 DIVISIONAL Folios: 189

SUPERINTENDENCIA DE INDUSTRIA Y COMERCIO6

No. 15-024738- -00000-0000

Fecha: 2015-02-06 15:35:09 Dep. 2020 DIR.NUEVASCR
Tra. 11 PATENTEIYII Eve: 378 FASENACIONALI
Act. 411 PRESENTACION Folios: 189

PATENT

- ☐ Indicación que se solicita una patente.
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Descripción de la invención
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (De ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

PATENTE DE INVENCIÓN PCT ☐ **MODELO DE UTILIDAD PCT** ☐ **Art.33 Decisión 486/00, Circular Única**

- ☐ Indicación que se solicita una PCT
- ☐ Copia de la solicitud en español, tal como fue presentada inicialmente (capítulo descriptivo, reivindicatorio, resumen)
- ☐ Dibujos de ser estos pertinentes
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas (de ser el caso formato de descuento)

Completa ☐ Incompleta ☐

DISEÑO INDUSTRIAL ☐ **(Art. 119 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita 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 ☐ **(Art. 92 Decisión 486/00)**

- ☐ Indicación que se solicita un esquema de trazado
- ☐ Datos de identificación del solicitante o de la persona que presenta la solicitud
- ☐ Representación gráfica de un esquema de trazado
- ☐ Comprobante de pago de las tasas establecidas

Completa ☐ Incompleta ☐