



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 270 893**

51 Int. Cl.:
C12N 15/62 (2006.01)
A61K 47/48 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C07K 7/08 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Número de solicitud europea: **00988373 .7**
86 Fecha de presentación : **22.12.2000**
87 Número de publicación de la solicitud: **1240337**
87 Fecha de publicación de la solicitud: **18.09.2002**

54 Título: **Procedimiento y composiciones para prolongar la vida media de compuestos bioactivos.**

30 Prioridad: **24.12.1999 US 173048 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
16.04.2007

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
16.04.2007

73 Titular/es: **GENENTECH, Inc.**
1 DNA Way
South San Francisco, California 94080-4990, US

72 Inventor/es: **Delano, Warren, L.;**
Dennis, Mark, S. y
Lowman, Henry, B.

74 Agente: **Ponti Sales, Adelaida**

ES 2 270 893 T3

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

DESCRIPCIÓN

Procedimiento y composiciones para prolongar la vida media de compuestos bioactivos.

5 **Campo de la invención**

Esta invención se refiere a nuevos compuestos denominados ligandos peptídicos que se unen a una proteína plasmática. Es aspectos concretos, la invención se refiere a composiciones que comprenden una molécula híbrida que comprende un dominio de ligando peptídico y un dominio activo tal como una molécula biológicamente activa. El dominio activo puede comprender una molécula útil para propósitos diagnósticos o terapéuticos. En realizaciones preferidas, las composiciones híbridas que comprenden el dominio de ligando peptídico y el dominio activo tienen propiedades farmacocinéticas o farmacológicas mejoradas. La invención proporciona además medios para la investigación, y uso diagnóstico y terapéutico del ligando peptídico, e incluye composiciones tales como composiciones farmacéuticas que comprenden moléculas del ligando peptídico.

15 **Descripción de los descubrimientos relacionados**

La exhibición sobre fagos proporciona un medio para generar bibliotecas de péptidos restringidas y no restringidas (Devlin *et al.*, *Science*, 249:404-406 (1990); Cwirla *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 87:6378-6382 (1990); Lowman, *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.*, 26:401-424 (1997)). Estas bibliotecas pueden usarse para identificar y seleccionar ligandos de péptido que pueden unirse a una molécula diana predeterminada (Lowman (1997), ver más arriba); Clackson y Wells, *Trends Biotechnol.*, 12:173-184 (1994); Devlin *et al.*, (1990) ver más arriba). La técnica se ha usado para identificar motivos de péptido que dirigen hacia una diana celular (Arap *et al.*, *Science*, 279:377-380 (1998)); que se unen al receptor del tipo I humano de la interleucina 1 (IL-1) bloqueando la unión de la IL-1 (Yanofsky *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 93:7381-7386 (1996)); que se unen al receptor de la citocina eritropoyetina (EPO) y lo activan (Wrighton *et al.*, *Science*, 273:458-463 (1996)); que se unen al receptor de la trombopoyetina humana y compiten con la unión del ligando natural, la trombopoyetina (TPO) (Cwirla *et al.*, *Science*, 276:1696-1699 (1996)), o para generar ligandos de péptido con afinidad mejorada o madurada a partir de ligandos de proteína nativos (Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 30:10832-10838 (1991)).

Usando bibliotecas de péptidos estructuralmente restringidos, generadas mediante exhibición en fagos monovalentes, se han aislado péptidos de 14 aminoácidos que se unen específicamente a las proteínas unidoras del factor 1 de crecimiento parecido a la insulina (IGFBP) (Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 37:8870-8878 (1998)). Los péptidos contienen una estructura en hélice y se unen a las IGFBPs *in vitro*, liberando la actividad del factor-a de crecimiento parecido a la insulina (IGF-1) (Lowman *et al.*, (1998) ver más arriba). Utilizando la selección *in vivo* en fagos, se han identificado péptidos capaces de mediar la localización selectiva en varios órganos, tales como el cerebro y el riñón (Pasqualini y Ruoslohti, *Nature*, 380:364-366 (1996)), así como péptidos que se dirigen hacia determinados tipos de tumores portadores de las integrinas $\alpha_5\beta_3$ o $\alpha_V\beta_5$ (Arap *et al.*, *Science*, 279:377-380 (1998)). La Patente Estadounidense 5.627.263 describe péptidos que son reconocidos por la $\alpha_5\beta_1$ integrina y se unen a ella. Los ejemplos de proteínas con afinidad o especificidad mejorada incluyen la hormona del crecimiento humana, los dedos de zinc, los inhibidores de proteasas, el factor natriurético atrial, y los anticuerpos (Wells, J. y Lowman H., *Curr. Opin. Struct. Biol.*, 2:597-604 (1992); Clackson, T. y Wells, J., *Trends Biotechnol.*, 12:173-184 (1994); Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 30(10):832-838 (1991); Lowman y Wells J., *J. Mol. Biol.*, 234:564-578 (1993); Dennis M. y Lazarus R., *J. Biol. Chem.*, 269(22):137-144 (1994)).

Se ha sugerido que las farmacodinámicas de la insulina están alteradas si se une a la albúmina del suero. La acilación de la insulina con ácidos grasos que contenían 10-16 átomos de carbono produce insulina con afinidad por la albúmina (Kurtzhals, P., *et al.*, *Biochem. J.*, 312:725-731 (1995)). Las diferencias en la afinidad de unión a la albúmina entre las insulinas aciladas se correlacionaron con el ritmo de los efectos de disminución de la glucosa en sangre de las diversas moléculas después de inyectarlas subcutáneamente en ratones. Una unión más intensa a la albúmina se correlacionó con un retraso en la disminución de la glucosa en sangre, debido posiblemente a que la albúmina acilada se unía a la albúmina en el tejido subcutáneo, resultando en una menor velocidad de absorción de las insulinas aciladas en comparación con la insulina no acilada.

Se ha descrito un conjugado de albúmina del suero-CD4 en el que los dominios V1 y V2 del CD4 se fusionaron a la albúmina del suero (Yeh, P., *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:1904-1908 (1992)). El tiempo medio de la eliminación del conjugado fue de 140 veces la de un CD4 soluble (sCD4) en un modelo experimental en conejo.

Se han descrito vidas medias *in vivo* extendidas del receptor del complemento de tipo I soluble humano (sCR1) fusionado a los dominios unidores de albúmina de la proteína G estreptococal (Makrides, S., *et al.*, *J. Pharmacol. Exptl. Ther.*, 277:532-541 (1996)). Las construcciones contenían dominios unidores de albúmina de la proteína G que tenían aproximadamente 80 aminoácidos (fragmento BA), y aproximadamente 155 aminoácidos (fragmento BABA).

Las farmacocinéticas de un dominio unidor de IgG marcado, derivado del dominio Z de una proteína A, que tenía aproximadamente 60 aminoácidos, y de un dominio unidor de albúmina de suero derivado de la proteína G estreptococal (dominio B), que tiene aproximadamente 200 aminoácidos, han sido descritas (EP 0.486.525).

Resumen de la invención

La presente invención proporciona compuestos nuevos que se unen a proteínas del plasma. Los compuestos de la presente invención (denominados como ligandos de péptido) son, por ejemplo, péptidos o derivados peptídicos tales como los péptidos miméticos y los análogos de péptidos. De acuerdo con aspectos preferidos de la invención, los compuestos son secuencias de aminoácidos que no ocurren de forma natural y que se unen a la albúmina del suero. Preferiblemente, el ligando peptídico es una secuencia de aminoácidos que no ocurre de forma natural de entre aproximadamente 10 y 20 residuos aminoácidos.

Tales compuestos preferiblemente se unen a la albúmina del suero con una afinidad caracterizada por una constante de disociación, K_d , que es inferior a $100 \mu\text{M}$, preferiblemente inferior a aproximadamente 100 nM , y que preferiblemente no se unen sustancialmente a otras proteínas del plasma. Los ejemplos específicos de tales compuestos incluyen los péptidos lineales o cíclicos, especialmente los péptidos cíclicos, preferiblemente de entre aproximadamente 10 y 20 residuos aminoácidos de longitud, y combinaciones de los mismos, así como sus sales y derivados, análogos funcionales de los mismos y cadenas peptídicas extendidas portadoras de aminoácidos o polipéptidos en el extremo de las secuencias.

Los ligandos peptídicos preferidos que unen la albúmina del suero incluyen los péptidos lineales y cíclicos, preferiblemente compuestos peptídicos cíclicos que comprenden la siguiente fórmula:



en donde la fórmula general comprende además $(\text{Xaa})_x$ en el extremo N-terminal y $(\text{Xaa})_z$ en el extremo C-terminal.

Se prefieren los compuestos peptídicos de la fórmula general en donde Xaa es un aminoácido y x y z son un número entero mayor o igual que 0 (cero), generalmente inferior a 100, preferiblemente inferior a 10, y más preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5, y más preferiblemente 4 ó 5, y Xaa_1 se selecciona de entre el grupo consistente en Ile, Phe, Tyr y Val.

En aspectos concretos, la invención está dirigida a combinaciones de un ligando peptídico con un compuesto bioactivo para formar una molécula híbrida que comprende un dominio de ligando peptídico y un dominio activo. Los compuestos bioactivos de la invención incluyen cualquier compuesto útil como un agente terapéutico o de diagnóstico. Los ejemplos no limitantes de compuestos bioactivos incluyen los polipéptidos, tales como los enzimas, hormonas, citocinas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, así como compuestos orgánicos tales como analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes antivíricos, fármacos antifúngicos, fármacos cardiovasculares, fármacos que afectan la función renal y el metabolismo de electrolitos, fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, y fármacos quimioterapéuticos, para mencionar tal sólo unos pocos.

En realizaciones preferidas, las moléculas híbridas que comprenden el dominio de ligando peptídico y el dominio activo tienen propiedades farmacocinéticas o farmacológicas mejoradas en comparación con la misma molécula bioactiva que comprende el dominio de ligando peptídico. Las propiedades farmacocinéticas o farmacodinámicas mejoradas de los híbridos proporcionan de ese modo medios para formulaciones farmacéuticas de baja dosis y nuevas composiciones farmacéuticas. En ciertos aspectos, la invención proporciona procedimientos para usar las nuevas composiciones, incluyendo el uso terapéutico o diagnóstico de las moléculas híbridas.

En aspectos particulares, la invención se dirige a combinaciones de ligandos peptídicos con compuestos bioactivos que tienen tiempos medios de eliminación relativamente cortos. Las combinaciones se preparan teniendo presentes varios objetivos, incluyendo el mejorar la eficacia terapéutica o diagnóstica del compuesto bioactivo en aspectos de la invención que implican el uso *in vivo* del compuesto bioactivo, mediante, por ejemplo, el incremento en el tiempo medio de eliminación del compuesto bioactivo. La fusión o unión (es decir, "conjugación") del ligando peptídico dirigido contra la albúmina del suero a un compuesto bioactivo proporciona composiciones con tiempos medios de eliminación incrementados. Tales combinaciones o fusiones se realizan de forma conveniente en células huésped recombinantes, o mediante el uso de agentes entrecruzadores bifuncionales.

La presente invención se extiende además a las aplicaciones terapéuticas y diagnósticas de las composiciones descritas en la presente invención. Por tanto, la invención incluye composiciones farmacéuticas que comprenden un excipiente farmacéuticamente aceptable y las moléculas híbridas de la invención.

Descripción resumida de las figuras

Figura 1. Ensayo ELISA competitivo con fagos que muestra la unión de la IgG a partículas fagómidos-Fab anti-VEGF etiquetado con ligando peptídico. Se muestran cuatro construcciones diferentes: pY0192-569 (círculos rellenos grandes), pY0192-570 (círculos vacíos grandes), PY0317-569 (círculos rellenos pequeños), y pY0317-570 ("x").

Figura 2. Análisis mediante BIAcore™ de la unión de la IgG a Fab Y0317-570 anti-VEGF etiquetado con ligando peptídico (etiquetado; panel superior), Y0317 Fab (control; panel inferior). Un esquema ilustrado en la parte superior muestra un modelo para los sucesos de unión observados en el experimento con Fab etiquetado.

ES 2 270 893 T3

Figura 3. En la figura se presenta la concentración en suero promedio del grupo respecto el tiempo (\pm SD) para el Fab-Y0317-570 y el Fab-Y0317.

Figura 4. Las secuencias de péptidos exhibidas por los clones de fagos seleccionados para la unión a la albúmina de conejo, humana o de rata se muestran en la Figura 4. También se indica la capacidad de los clones individuales de fagos para unirse a las 3 especies de albúmina inmovilizada.

Figura 5A a 5F. Las secuencias identificadas a continuación de una aleatorización suave se muestra en la Figura junto con su especificidad por especie tal como se determinó mediante ELISA con fagos.

Figura 6. Se halló mediante ELISA que los clones que se originaban a partir de la biblioteca de aleatorización suave RB se unían a cada una estas especies de albúmina y que eran específicos para la albúmina en base a su incapacidad para unirse a la ovoalbúmina y caseína.

Figura 7. Los clones que se unen a múltiples especies de albúmina (unidores multi-especies) se listan en la Figura 7.

Figura 8A a 8E. Las secuencias procedentes de bibliotecas seleccionadas contra la albúmina de rata, conejo y humana se muestran respectivamente en las Figura 8A, 8B y 8C.

Figura 9. Se sintetizaron los péptidos correspondientes a secuencias de fago identificadas y se midió su afinidad por la albúmina de rata, conejo o ratón usando el ensayo de unión de SA08b.

Figura 10. Se sintetizó un péptido correspondiente a la secuencia de fago identificada SA06, y se midió su afinidad por la albúmina de rata, conejo o ratón usando el ensayo de unión de SA08b.

Figura 11. La secuencia SA06 se añadió al extremo carboxilo de la cadena ligera (D3H44-L) o de la cadena pesada (D3H44-Ls) del Fab. Además, se prepararon construcciones similares con el disulfuro dentro de cadena remplazado por alaninas (D3H44-Ls y D3H44-Hs, respectivamente) tal como se ilustra en la Figura 11.

Figura 12. Las fusiones D3H44 purificadas retenían su capacidad para unir el TF, tal y como se midió usando el ensayo de activación del FX.

Figura 13. Las fusiones D3H44 purificadas retenían su capacidad para unir el TF tal y como se midió usando un ensayo temporal con protrombina que mide la prolongación de la coagulación dependiente del factor de tejido.

Figura 14. A diferencia del D3H44 que carece de la secuencia de unión a la albúmina (WT), ambos, el D3H44-L y el D3H44-Ls son capaces de unirse a la albúmina según se midió en el ensayo de unión de SA08b.

Figura 15. Ambas fusiones de D3H44 y péptido unidor de la albúmina son capaces de unir el TF y la albúmina simultáneamente, según se dedujo mediante un ensayo de unión de biotina-TF.

Figura 16. La fusión del péptido unidor de la albúmina con la D3H44 resulta en una proteína que tiene parámetros farmacocinéticos mejorados.

Figura 17. La fusión del péptido unidor de la albúmina con la D3H44 resulta en una proteína que tiene parámetros farmacocinéticos mejorados.

Descripción detallada de las realizaciones preferidas

I. Definiciones

El término "ligando peptídico" en el contexto de la presente invención se pretende que se refiera a secuencias de aminoácidos que no ocurren de forma natural, y que funcionan para unirse a una particular molécula diana. Los ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención son secuencias de aminoácidos que generalmente están restringidas (es decir, tienen algún elemento estructural como, por ejemplo, la presencia de aminoácidos que inician un giro β o una lámina plegada β , o, por ejemplo, forman un ciclo debido a la presencia de residuos Cys unidos por enlace disulfuro), o no están restringidas (lineales), de menos de aproximadamente 50 residuos aminoácidos, y preferiblemente menos de aproximadamente 40 residuos aminoácidos. De los ligandos peptídicos con menos de aproximadamente 40 residuos aminoácidos, los preferidos son los ligandos peptídicos de entre aproximadamente 10 y aproximadamente 30 residuos aminoácidos, y especialmente los ligandos peptídicos de aproximadamente 20 residuos aminoácidos. No obstante, después de leer la presente descripción, el especialista capacitado reconocerá que no es la longitud de un determinado ligando peptídico, sino su capacidad para unirse a una molécula diana particular, lo que distingue el ligando peptídico de la presente invención. Por tanto, es igualmente probable que los ligandos peptídicos de 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24 y 25 residuos aminoácidos, por ejemplo, sean ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención.

Un ligando peptídico de la presente invención unirá una molécula diana con suficiente afinidad y especificidad si el ligando peptídico “se dirige” a, “se une” o “apunta a” una molécula diana tal como un tipo celular específico portador de la molécula diana *in vitro* y, preferiblemente, *in vivo* (ver, por ejemplo, el uso del término “dirige a”, “dirigiéndose” y “apunta a” en Pasqualini y Ruoslahti, *Nature*, 380:364-366 (1996) y Arap *et al.*, *Science*, 279:377-380 (1998)). En general, el ligando peptídico se unirá a una molécula diana con una afinidad caracterizada por una constante de disociación, K_d , de menos de aproximadamente 1 μM , preferiblemente menos de aproximadamente 100 nM, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 nM. Sin embargo, es igualmente probable que los ligandos peptídicos que tienen una afinidad por una molécula diana de menos de aproximadamente 1 nM, y preferiblemente entre aproximadamente 1 μM y 1 nM, sean ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención. En general, un ligando peptídico que se une a una molécula diana particular tal como se ha descrito más arriba, puede aislarse e identificarse mediante cualquiera de un cierto número de técnicas estándares en el campo, tal como se describe en la presente invención.

Los ligandos peptídicos son secuencias de aminoácidos, tal y como se ha descrito más arriba, que pueden contener residuos de aminoácidos que ocurren de forma natural así como de forma no natural. Por tanto, los denominados “péptido miméticos” y “análogos de péptidos”, los cuales pueden incluir estructuras químicas que no son aminoácidos y que imitan la estructura de un determinado aminoácido o péptido, pueden ser ligandos peptídicos en el contexto de la invención. Tales miméticos o análogos se caracterizan generalmente por presentar características físicas, tales como el tamaño, la carga o la hidrofobicidad, presentes en la orientación espacial apropiada: tal y como se hallan en sus péptidos homólogos. Un ejemplo específico de un compuesto péptido mimético es un compuesto en el que el enlace amida entre uno o más de los aminoácidos es remplazado por, por ejemplo, un enlace carbono-carbono u otro enlace, tal y como es bien conocidos en el estado de la técnica (ver, por ejemplo, Sawyer, en *Peptide Based Drug Design*, pp. 378-422 (ACS, Washington DC, 1995)).

Por tanto, el término “aminoácido” en el ámbito de la presente invención se usa en su sentido más amplio, y se pretende que incluya L α -aminoácidos o residuos que ocurren de forma natural. En la presente invención se usan las abreviaturas de una y tres letras comúnmente usadas para aminoácidos que ocurren de forma natural (Lehninger, A.L., *Biochemistry*, 2^a ed., pp. 71-92, (1975), Worth Publishers, New York). Las correspondencias entre los códigos estándares de una letra y los códigos estándares de tres letras son bien conocidas por los especialistas capacitados, y se reproducen aquí: A = Ala; C = Cys; D = Asp; E = Glu; F = Phe; G = Gly; H = His; I = Ile; K = Lys; L = Leu; M = Met; N = Asn; P = Pro; Q = Gln; R = Arg; S = Ser; T = Thr; V = Val; W = Trp; Y = Tyr. El término incluye D-aminoácidos así como como aminoácidos modificados químicamente, tales como los análogos de aminoácidos, los aminoácidos que ocurren de forma natural y no usualmente no se incorporan en las proteínas, tales como la norleucina, y los compuestos sintetizados químicamente que tienen propiedades conocidas en la técnica como características de un aminoácido. Por ejemplo, se incluyen dentro de la definición de aminoácido los análogos o miméticos de la fenilalanina o prolina, que permiten la misma restricción conformacional de los compuestos peptídicos que la Phe o Pro natural. Tales análogos y miméticos se denominan en la presente invención como “equivalentes funcionales” de un aminoácido. Otros ejemplos de aminoácidos son enumerados por Roberts y Vellaccio, *The Peptides: Analysis, Synthesis, Biology*, editores Gross y Meiehofer, Vol. 5, p. 341, Academic Press, Inc., N.Y. 1983, la cual se incorpora en la presente invención por referencia.

Los ligandos peptídicos sintetizados mediante, por ejemplo, técnicas de síntesis en fase sólida, no se limitan a los aminoácidos codificados por genes. Los aminoácidos hallados comúnmente que no son codificados por el código genético incluyen, por ejemplo, los descritos en la Publicación Internacional N° WO 90/01940, tales como, por ejemplo, el ácido 2-amino adípico (Aad) para Glu y Asp; el ácido 2-aminopimélico (Apm) para Glu y Asp; el ácido 2-aminobutírico (Abu) para Met, Leu, y otros aminoácidos alifáticos; ácido 2-aminoheptanoico (Ahe) para Met, Leu y otros aminoácidos alifáticos; ácido 2-aminoisobutírico (Aib) para Gly; ciclohexilalanina (Cha) para Val, y Leu y Ile; homoarginina (Har) para Arg y Lys; ácido 2,3-diaminopropiónico (Dpr) para Lys, Arg y His; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, y Ala; N-etilglicina (EtGly) para Gly, Pro, y Ala; N-etilasparagina (EtAsn) para Asn, y Gln; Hidroxililina (Hyl) para Lys; alohidroxililina (AHyl) para Lys; 3-(y 4)-hidroxiprolina (3Hyp, 4Hyp) para Pro, Ser, y Thr; alo-isoleucina (AIlle) para Ile, Leu, y Val; r-amidinofenilalanina para Ala; N-metilglicina (MeGly, sarcosina) para Gly, Pro, y Ala; N-metilisoleucina (Melle) para Ile; Norvalina (Nva) para Met y otros aminoácidos alifáticos; Norleucina (Nle) para Met y otros aminoácidos alifáticos; Ornitina (Orn) para Lys, Arg e His; Citrulina (Cit) y sulfóxido de metionina (MSO) para Thr, Asn y Gln; N-metilfenilalanina (MePhe), trimetilfenilalanina, halo (F, Cl, Br, y I) fenilalanina, trifluorilfenilalanina, para Phe.

Los ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención pueden estar “diseñados”, es decir, son ligandos peptídicos no nativos o no ocurren de forma natural. Por “no nativo” o “que no ocurre de forma natural” se quiere indicar que la secuencia de aminoácidos del ligando peptídico particular no se halla en la naturaleza. Es decir, las secuencias de aminoácidos de los ligandos peptídicos no nativos o que no ocurren de forma natural no corresponden con una secuencia de aminoácidos de una proteína o polipéptido que ocurre de forma natural. Los ligandos peptídicos de esta variedad podrían producirse o seleccionarse usando una variedad de técnicas bien conocidas por el especialista capacitado. Por ejemplo, podrían generarse aleatoriamente bibliotecas de péptidos restringido o no restringidos, y exhibirse sobre fagos utilizando técnicas estándares en el campo, por ejemplo, Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 37:8870-8878 (1998).

Los ligandos peptídicos, cuando se usan en el contexto de la presente invención, pueden estar “conjugados” a una sustancia terapéutica o de diagnóstico. El término “conjugado” se usa en su sentido más amplio para abarcar todos los procedimientos de anclaje o unión que se conocen en el estado de la técnica. Por ejemplo, en una realización típica,

la sustancia terapéutica o de diagnóstico es una proteína (denominada en la presente invención como una “proteína terapéutica”), y el ligando peptídico será una extensión de aminoácidos del Cor N-terminal de la proteína terapéutica. Además, entre la proteína terapéutica y el ligando peptídico puede hallarse una secuencia corta de aminoácidos de engarce. En este escenario, el ligando peptídico, el engarce opcional, y la proteína terapéutica estarán codificados por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica la proteína terapéutica unida operativamente a (en el sentido de que la secuencias de ADN son contiguas y en pauta de lectura), una secuencia de engarce opcional que codifica un polipéptido corto tal y como se ha descrito más arriba, y una secuencia que codifica el ligando peptídico. En esta escenario típico, el ligando peptídico se considera que está “conjugado” con la proteína terapéutica, opcionalmente a través de una secuencia de engarce. En una realización relacionada, la secuencia de aminoácidos del ligando peptídico puede interrumpir o remplazar una sección de la secuencia de aminoácidos de la proteína terapéutica, a condición, por supuesto, de que la inserción de la secuencia de aminoácidos de ligando peptídico no interfiera con la función de la proteína terapéutica. En esta realización, el “conjugado” podría estar codificado por un ácido nucleico que comprende una secuencia que codifica una proteína terapéutica interrumpida por una secuencia que codifica el ligando peptídico y operativamente unida a la misma. En una realización típica adicional, el péptido estará unido, por ejemplo, mediante conjugación química, a la proteína terapéutica u otro agente terapéutico opcional a través de una secuencia de engarce. Típicamente, de acuerdo con esta realización, el ligando peptídico estará unido a la proteína terapéutica a través de una cadena lateral de un aminoácido, en algún lugar en medio de la proteína terapéutica que no interfiere con la actividad terapéutica. De nuevo, aquí el péptido se considera que está “conjugado” con el agente terapéutico.

Tal como se usa en el contexto de la presente invención, el término “molécula diana” incluye las proteínas, los péptidos, las glicoproteínas, los glicopéptidos, los glicolípidos, los polisacáridos, los oligosacáridos, los ácidos nucleicos, y similares. Las moléculas diana incluyen, por ejemplo, las moléculas extracelulares tales como varios factores del suero, incluyendo, pero no limitándose, a proteínas plasmáticas tales como la albúmina del suero, las inmunoglobulinas, las apolipoproteínas o la transferrina, o proteínas que se hallan sobre la superficie de los eritrocitos o linfocitos, a condición, por supuesto, de que la unión del ligando peptídico a la proteína de la superficie celular no interfiera sustancialmente con el funcionamiento normal de la célula.

Los “anticuerpos” y las “inmunoglobulinas” son usualmente glicoproteínas heterotetraméricas de aproximadamente 150.000 daltones, compuestas por dos cadenas ligeras (L) idénticas y dos cadenas pesadas (H) idénticas.

La digestión con papaína de los anticuerpos produce dos fragmentos unidores de antígeno idénticos, denominados fragmentos o regiones “Fab”, cada uno con un único sitio de unión de antígeno, y un fragmento o región “Fc” residual. Aunque los límites de la región Fc de una cadena pesada de inmunoglobulina pueden variar, la región Fc de la cadena pesada de la IgG humana se define usualmente que abarca desde un residuo aminoácido en la posición Cys226, o desde Pro230, hasta el extremo carboxilo-terminal de la misma.

El tratamiento con pepsina proporciona un fragmento $F(ab')_2$ que tiene dos sitios de combinación con antígeno, y es todavía capaz de entrecruzar el antígeno. El fragmento Fab' contiene el dominio constante de la cadena ligera y el primer dominio constante de la cadena pesada (CH1).

“Tratamiento” se refiere tanto al tratamiento terapéutico como a las medidas profilácticas o preventivas. Los que precisan el tratamiento incluyen aquéllos que ya presentan el trastorno, así como aquéllos en los que debe prevenirse el trastorno.

Mamífero, para los propósitos de tratamiento, se refiere a cualquier animal clasificado como un mamífero, incluyendo los humanos, los animales domésticos y de granja, de zoológicos y de deportes, o los animales de compañía, tales como los perros, los caballos, los gatos, las vacas, etc. Preferiblemente, el mamífero es un humano.

Un “trastorno” es cualquier condición que se beneficiaría de un tratamiento con las composiciones que comprenden los ligandos peptídicos de la invención. Esto incluye los trastornos crónicos y agudos, o las enfermedades, incluyendo aquellas condiciones patológicas que predisponen el mamífero al trastorno en cuestión.

“Tiempo medio de eliminación” se usa en su sentido ordinario, tal y como se describe en Goodman y Gilman, *The Pharmaceutical Basis of Therapeutics*, 21-25 (editores Alfred Goodman Gilman, Louis S. Goodman, y Alfred Gilman, 6ª ed., 1980). En resume, se pretende que el término abarque una medida cuantitativa del curso temporal de la eliminación de la droga. La eliminación de la mayoría de los fármacos es exponencial (es decir, sigue una cinética de primer orden), puesto que las concentraciones de fármacos usualmente no se acercan a las requeridas para la saturación de los procesos de eliminación. La velocidad de un proceso exponencial puede expresarse por su constante de velocidad, k , la cual expresa el cambio fraccional por unidad de tiempo, o por su tiempo medio, $t_1/2$, el tiempo requerido para que se complete el 50% del proceso. Las unidades de estas dos constantes son tiempo⁻¹ y tiempo, respectivamente. Una constante de velocidad de primer orden y el tiempo medio de la reacción están relacionados de forma sencilla ($k \times t_1/2 = 0,693$) y, por consiguiente, pueden intercambiarse. Puesto que las cinéticas de eliminación de primer orden dictan que se pierde una fracción constante de fármaco por unidad de tiempo, una representación del logaritmo de la concentración del fármaco frente al tiempo es lineal en todo momento a continuación de la fase de distribución (es decir, una vez de han completado la absorción y la distribución del fármaco). La vida media para la eliminación del fármaco puede determinarse con precisión a partir de tal gráfica.

La “transfección” se refiere a la captura de un vector de expresión por parte de una célula huésped, sin importar si de hecho se expresa algún secuencia codificante. Hay numerosos procedimientos de transfección conocidos por el especialista ordinariamente capacitado, por ejemplo, la precipitación con CaPO_4 y la electroporación. La transfección exitosa generalmente se reconoce cuando ocurre cualquier indicación de la operación de este vector dentro de la célula huésped.

“Transformación” significa introducir ADN en un organismo de tal forma que el ADN es replicable, bien como un elemento extracromosómico o mediante integración cromosómica. Dependiendo de la célula huésped usada, la transformación se realiza usando técnicas estándares apropiadas para tales células. El tratamiento con calcio empleando cloruro cálcico, tal y como se describe en la Sección 1.82 de Sambrook *et al.*, *Molecular Cloning* (2ª edición), Cold Spring Harbor Laboratory, NY (1989), generalmente se usa para los procariotas u otras células que contienen barreras sustanciales en forma de pared celular. La infección con *Agrobacterium tumefaciens* se usa para la transformación de ciertas células vegetales, tal y como se describe en Shaw *et al.*, *Gene*, 23:315 (1983) y en WO 89/05859, publicada el 29 de junio de 1989. Para las células de mamífero sin tales paredes celulares, se prefiere el procedimiento de precipitación con fosfato cálcico descrito en las Secciones 16.30-16.37 de Sambrook *et al.*, ver más arriba. Los aspectos generales de las transformaciones de sistemas huéspedes de células de mamífero han sido descritos por Axel en Patente Estadounidense N° 4.399.216 concedida el 16 de agosto de 1983. Las transformaciones en levaduras típicamente se llevan a cabo de acuerdo con el procedimiento de Van Solingen *et al.*, *J. Bact.*, 130:946 (1977) y Hsiao *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 76:3829 (1979). Sin embargo, también pueden usarse otros procedimientos para introducir el ADN en las células, tales como mediante la inyección nuclear, la electroporación, o mediante la fusión de protoplastos.

Tal y como se usa en la presente invención, el término “administración pulmonar” se refiere a la administración de una formulación de la invención a través de los pulmones mediante inhalación. Tal y como se usa en la presente invención, el término “inhalación” se refiere a la inspiración de aire hacia los alvéolos. En ejemplos específicos, la inspiración puede ocurrir mediante autoadministración de una formulación de la invención mientras se inhala, o mediante la administración a través de un respirador, por ejemplo, a un paciente con un respirador. El término “inhalación” usando en relación a una formulación de la invención es sinónimo de “administración pulmonar”.

Tal y como se usa en la presente invención, el término “parenteral” se refiere a la introducción de un compuesto de la invención dentro del cuerpo por vía distinta a los intestinos y, en particular, por rutas intravenosa (i.v.), intraarterial (i.a.), intraperitoneal (i.p.), intramuscular (i.m.), intraventricular, y subcutánea (s.c.).

Tal y como se usa en la presente invención, el término “aerosol” se refiere a una suspensión en el aire. En particular, aerosol se refiere a la disgregación de la formulación de la invención y a su suspensión en el aire. De acuerdo con la presente invención, una formulación en aerosol es una formulación que comprende un compuesto de la presente invención, que es apropiado para su “aerosolización”, es decir, su disgregación y suspensión en el aire, para su inhalación o administración pulmonar.

II. Modos para llevar a cabo la invención

A. Ligandos peptídicos

Los ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención se unen a una diana, la albúmina de suero, y pueden identificarse en un ensayo de detección directa, o por su capacidad para competir por la unión a la diana con un ligando conocido de la diana. Los ligandos peptídicos preferidos que se unen a la albúmina del suero incluyen los péptidos lineales y cíclicos, preferiblemente compuestos peptídicos cíclicos que comprenden la siguiente fórmula Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEC. N° ID.: 116), y en donde la fórmula general comprende $(\text{Xaa})_x$ en el extremo N-terminal y $(\text{Xaa})_z$ en el extremo C-terminal. Se prefieren los compuestos peptídicos de la fórmula general en donde Xaa es un aminoácido y x y z son un número entero mayor o igual que 0 (cero), generalmente inferior a 100, preferiblemente inferior a 10, y más preferiblemente 0, 1, 2, 3, 4 ó 5, y más preferiblemente 4 ó 5, y Xaa₁ se selecciona de entre el grupo consistente en Ile, Phe, Tyr y Val.

De acuerdo con este aspecto de la invención, se hace referencia a las Figuras, y especialmente a las Figuras 5A y 5B, 8A, 8B y 8C y a la Figura 9, para péptidos de ejemplo y aminoácidos apropiados para seleccionar ligandos peptídicos que se unen a una albúmina de suero de mamífero. En un aspecto preferido, se hace referencia a la Figura 9 para seleccionar ligandos peptídicos que se unen a través de varias especies de albúmina de suero.

Los compuestos preferidos de acuerdo con este aspecto de la invención incluyen:

Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEC. N° ID.: 120).

Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (SEC. N° ID.: 121).

Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe (SEC. N° ID.: 122).

ES 2 270 893 T3

Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val (SEC. N° ID.: 123).

5 Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val-Lys
(SEC. N° ID.: 124).

10 Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 125).

Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 126).

15 Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 127).

En otro aspecto preferido de la invención, los ligandos peptídicos de la presente invención se unen a la albúmina de suero humano, y pueden identificarse por su capacidad para competir por la unión a la albúmina de suero humana en un ensayo *in vitro* con ligandos peptídicos que tienen la fórmula general:

20 Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEC. N° ID.: 116)

en donde la fórmula general comprende además (Xaa)_x en el extremo N-terminal y (Xaa)_z en el extremo C-terminal, y en donde Xaa es un aminoácido y x y z son preferiblemente 4 ó 5.

25 En realizaciones particulares, los ligandos peptídicos de la presente invención que unen la albúmina de suero humana competirán con cualquiera de los ligandos peptídicos representados en la SEC. N° ID.: 120-131 descrita en la presente invención más arriba, y preferiblemente competirán con la SEC. N° ID.: 122 por la unión a la albúmina de suero humana.

30 Tal como se apreciará a partir de lo precedente, el término “compite” y “capacidad para competir” son términos relativos. Por tanto, los términos, cuando se usan para describir los ligandos peptídicos de la presente invención, se refieren a ligandos peptídicos que producen un 50% de inhibición de la unión de, por ejemplo, la SEC. N° ID.: 122, cuando están presente a 50 μ M, preferiblemente cuando están presentes a 1 μ M, más preferiblemente a 100 nM, y preferiblemente cuando están presentes a 1 nM o menos, en un ensayo de competición estándar tal y como se describe en la presente invención. Sin embargo, es igualmente probable que los ligandos peptídicos que tienen una afinidad por una proteína del suero, tal como la albúmina del suero, de menos de aproximadamente 1 nM, y preferiblemente entre aproximadamente 1 μ M y 1 nM, sean ligandos peptídicos en el contexto de la presente invención.

35 Para los sistemas de ensayo *in vitro* destinados a determinar si un péptido u otro compuesto tienen la “capacidad” de competir con un ligando peptídico por la unión a una albúmina de suero, tal como se ha mencionado en la presente invención, el especialista capacitado puede emplear cualquiera de un cierto número de ensayos de competición estándares. Los ensayos de unión competitiva se basan en la capacidad de un estándar marcado para competir con el analito de la muestra de ensayo por la unión con una cantidad limitada de ligando. La cantidad de analito en la muestra de ensayo es inversamente proporcional a la cantidad de estándar que pasa a estar unido a ligando.

40 Por tanto, el especialista capacitado puede determinar si un péptido u otro compuesto tiene la capacidad de competir con un ligando peptídico por la unión a la albúmina de suero empleando procedimientos que incluyen, pero no se limitan a los sistemas de ensayo competitivos usando técnicas tales como los radioinmunoensayos (RIA), inmunoensayos con enzimas (EIA), preferiblemente el ensayo inmunosorbente unido a enzima (ELISA), inmunoensayos en “sándwich”, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, y ensayos de inmunoelectroforesis, por citar tan sólo unos pocos.

45 Para estos propósitos el ligando peptídico seleccionado se marcará con un grupo detectable (denominándose el ligando peptídico marcado partir de ahora “trazador”) y se usará en un ensayo de competición con un compuesto candidato para la unión a la diana. Hay disponibles numerosas marcas detectables, las cuales pueden agruparse preferiblemente en las siguientes categorías:

50 (a) radioisótopos, tales como ³⁵S, ¹⁴C, ¹²⁵I, ³H, y ¹³¹I. El compuesto peptídico puede marcarse con el radioisótopo usando las técnicas descritas en Coligen *et al.*, editores, *Current Protocols in Immunology*, Volúmenes 1 y 2 (1991), Wiley-Interscience, Nueva York, N.Y., por ejemplo, y la radiactividad puede medirse usando el recuento de centelleo.

65 (b) Están disponibles las marcas fluorescentes, tales como los quelatos de tierras raras (quelatos de europio) o la fluoresceína y sus derivados, la rodamina y sus derivados, el dansilo, la lisamina, la ficoeritrina y el Rojo de Texas. Las marcas fluorescentes pueden conjugarse a los compuestos peptídicos usando, por ejemplo, las técnicas descritas en *Current Protocols in Immunology*, ver más arriba. La fluorescencia puede cuantificarse usando un fluorímetro.

(c) Hay varias marcas enzima-sustrato disponible y la Patente Estadounidense N° 4.275.149 proporciona una revisión de algunas de ellas. El enzima preferiblemente cataliza una alteración química del sustrato cromogénico, la cual puede medirse usando varias técnicas. Por ejemplo, el enzima podría catalizar un cambio de color en un sustrato, el cual puede medirse espectrofotométricamente. Alternativamente, el enzima puede alterar la fluorescencia o la quimioluminiscencia del sustrato. Las técnicas para cuantificar un cambio en la fluorescencia se describen más arriba. El sustrato quimioluminiscente para estar excitado electrónicamente por una reacción química, y puede a continuación emitir luz, la cual puede medirse (usando, por ejemplo, un quimioluminómetro) o donar energía a un aceptor fluorescente. Los ejemplos de marcas enzimáticas incluyen las luciferasas (por ejemplo, la luciferasa de luciérnaga y la luciferasa bacteriana; Patente Estadounidense N° 4.737.456), la luciferina, las 2,3-dihidroftalazinedionas, la malato deshidrogenasa, la ureasa, la peroxidasa tal como la peroxidasa de rábano silvestre (HRP), la fosfatasa alcalina, la β -galactosidasa, la glucoamilasa, la lisozima, las sacárido oxidasas (por ejemplo, la glucosa oxidasa, la galactosa oxidasa, y la glucosa-6-fosfato deshidrogenasa), las oxidasas heterocíclicas (tales como la uricasa y la xantina oxidasa), la lactoperoxidasa, la microperoxidasa, y similares.

Los ejemplos de combinaciones enzima-sustrato incluyen, por ejemplo:

- (i) la peroxidasa de rábano silvestre (HRP) con la hidrógeno peroxidasa como sustrato, en donde la hidrógeno peroxidasa oxida un precursor del colorante (por ejemplo, el ABTS, la ortofenilendiamina (OPD) o el 3,3',5,5'-tetrametil bencidina hidrocloreuro (TMB));
- (ii) la fosfatasa alcalina (AP) con para-nitrofenil fosfato como sustrato cromogénico; y
- (iii) la β -D-galactosidasa (β -D-Gal) con un sustrato cromogénico (por ejemplo, p-nitrofenil- β -D-galactosidasa) o un sustrato fluorogénico como la 4-metilumbeliferil- β -D-galactosidasa.

De acuerdo con un ensayo determinado, el trazador se incuba con la diana inmovilizada en presencia de concentraciones variables de compuesto candidato sin marcar. Las concentraciones crecientes de compuesto candidato exitoso compiten efectivamente con la unión del trazador a la diana inmovilizada. La concentración de compuesto candidato sin marcar a la que se desplaza el 50% del máximo de trazador unido se denomina como la "IC₅₀".

Por tanto, un compuesto candidato con una IC₅₀ de 1 mM presenta una interacción sustancialmente más débil con la diana que un compuesto candidato con una IC₅₀ de 1 μ M.

En algunos ensayos ELISA con exhibición en fagos, la afinidad de unión de una secuencia mutada ("mut") se comparó directamente con un péptido control ("con") usando los procedimientos descritos en B.C. Cunningham, D.G. Lowe, B. Li, B.D. Bennett, y J.A. Wells, *EMBO J.*, 13:2508 (1994) y caracterizado por el parámetro EC₅₀. Los ensayos se realizaron en condiciones en las que EC₅₀(con)/EC₅₀(mut) se aproximaría a K_d(con)/K_d(mut).

En consecuencia, la invención proporciona compuestos que "tienen la capacidad de competir" por la unión a la albúmina de suero humana en un ensayo *in vitro* según se describe. Preferiblemente, el compuesto tiene una IC₅₀ para la albúmina de suero humana de menos de 1 μ M. Los preferidos entre esos compuestos son los compuestos que tienen una IC₅₀ de menos de aproximadamente 100 nM, y preferiblemente menos de aproximadamente 10 nM o menos de aproximadamente 1 nM. En otras realizaciones preferidas según este aspecto de la invención, los compuestos presentan una IC₅₀ por la albúmina de suero humana de menos de aproximadamente 100 pM, y más preferiblemente menos de aproximadamente 10 pM.

Un ensayo *in vitro* preferido para la determinación de la capacidad de un compuesto candidato para competir con un ligando peptídico descrito en la presente invención, es como sigue, y se describe más detalladamente en los Ejemplos. En las realizaciones preferidas el compuesto candidato es un péptido. La capacidad de un compuesto candidato para competir con un trazador de ligando peptídico marcado por la unión a la albúmina de suero humana se monitoriza usando un ELISA. Las diluciones de un compuesto candidato en tampón se añaden a placas de microvaloración recubiertas con albúmina de suero humana (tal como se describe en las Secciones de Ejemplos) junto con el trazador durante 1 hora. Se lava la placa de microvaloración con tampón de la vado y se mide la cantidad de trazador unido a la albúmina de suero humana.

B. Combinaciones de ligando peptídico

De acuerdo con la presente invención, el ligando peptídico está opcionalmente unido a un compuesto bioactivo para formar una molécula híbrida que comprende un dominio de ligando peptídico y un dominio activo. Los compuestos bioactivos de la invención incluyen cualquier compuesto útil como un agente terapéutico o de diagnóstico. Los ejemplos no limitantes de compuestos bioactivos incluyen los polipéptidos, tales como los enzimas, hormonas, citocinas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpo, así como compuestos orgánicos tales como analgésicos, antipiréticos, agentes antiinflamatorios, antibióticos, agentes antiviricos, fármacos antifúngicos, fármacos cardiovasculares, fármacos que afectan la función renal y el metabolismo de electrolitos, fármacos que actúan sobre el sistema nervioso central, fármacos quimioterapéuticos, etc. Según la presente invención, el dominio del ligando peptídico está unido a un dominio activo, opcionalmente a través de un dominio de engarce flexible.

Las moléculas híbridas de la presente invención se construyen combinando un dominio de ligando peptídico con un dominio activo apropiado. Dependiendo del tipo de unión y de sus procedimiento de producción, el dominio del ligando peptídico puede unirse a través de sus extremos N- o C-terminales a los extremos N- o C-terminales del dominio activo. Por ejemplo, cuando se preparan las moléculas híbridas de la presente invención a través de técnicas recombinantes, el ácido nucleico que codifica un ligando peptídico estará operativamente unido a un ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio activo, opcionalmente a través de un dominio de engarce. Típicamente, la construcción codifica una proteína de fusión en donde el extremo C-terminal del ligando peptídico está unido al extremo N-terminal del dominio activo. Sin embargo, también son posibles, especialmente cuando se emplean técnicas sintéticas, las fusiones en las que, por ejemplo, el extremo N-terminal del ligando peptídico se une al extremo N- o C-terminal del dominio activo. En algunos casos, el dominio del ligando peptídico puede insertarse dentro de la molécula del dominio activo en vez de unirse al dominio activo en sus extremos N- o C-terminal. Esta configuración puede usarse para practicar la invención con tal que se preserven las funciones del dominio del ligando peptídico y del dominio activo. Por ejemplo, un ligando peptídico puede insertarse en un CDR de una cadena ligera no unidora de un inmunoglobulina sin interferir con la capacidad de la inmunoglobulina para unirse a su diana. Las regiones de las moléculas del dominio activo que pueden acomodar inserciones de ligando peptídico pueden identificarse empíricamente (es decir, seleccionando aleatoriamente un sitio de inserción, y ensayando el conjugado resultante según la función del dominio activo), o mediante comparaciones de secuencias entre una familia de moléculas de dominio activo relacionadas (por ejemplo, para dominios activos que son proteínas) para localizar regiones con baja homología de secuencia. Las regiones con baja homología de secuencia es más probable que toleren inserciones de dominios de ligandos peptídicos que las regiones que están bien conservadas. Para las moléculas de dominio activo cuyas estructuras tridimensionales son conocidas (por ejemplo, a partir de estudios cristalográficos con rayos-X o de RMN), la estructura tridimensional puede proporcionar guía sobre los sitios de inserción de ligando peptídico. Por ejemplo, los bucles o las regiones con movilidad elevada (es decir, mayores factores de temperatura o "B") es más probable que acomoden inserciones de dominio de ligando peptídico que las regiones de la estructura altamente ordenadas, o las regiones implicadas en la unión del ligando o en la catálisis.

C. Dominios de engarce

Según la presente invención, el dominio del ligando peptídico está unido opcionalmente a un dominio activo a través de un engarce. El componente engarce de la molécula híbrida de la invención no participa necesariamente en la función de la molécula híbrida, pero puede contribuir. Por tanto, según la presente invención, el dominio de engarce es cualquier grupo de moléculas que proporciona un puente espacial entre el dominio activo y el dominio del ligando peptídico.

El dominio de engarce puede ser de longitud y preparación variable, no obstante, según la presente invención, es la longitud del dominio de engarce y no su estructura lo que es importante. El dominio de engarce preferiblemente permite que el dominio del ligando peptídico de la molécula híbrida se una, sustancialmente libre de restricciones estéricas y/o conformacionales, a la molécula diana. Por tanto, la longitud del dominio de engarce depende del carácter de los dos dominios "funcionales" de la molécula híbrida, es decir, el dominio del ligando peptídico y el dominio activo.

Alguien experto en la materia reconocerá que varias combinaciones de átomos proporcionan moléculas de longitud variable en base a distancias conocidas entre varios enlaces (Morrison y Boyd, *Organic Chemistry*, 3ª edición, Allyn and Bacon, Inc., Boston, MA (1977)). Por ejemplo, el dominio de engarce puede ser un polipéptido de longitud variable. La composición de aminoácidos del polipéptido determina el carácter y longitud del engarce. En una realización preferida, la molécula de engarce comprende una cadena polipeptídica flexible, hidrofílica. Los dominios de engarce de ejemplo comprenden uno o más residuos Gly y/o Ser, tales como los descritos en las secciones de Ejemplo de la presente invención.

D. Síntesis recombinante

La presente invención abarca una composición de materia que comprende un ácido nucleico aislado, preferiblemente ADN, que codifica un ligando peptídico o una molécula híbrida que comprende un dominio de ligando peptídico y un dominio activo polipeptídico, tal y como se describe en la presente invención. El ADN que codifica los péptidos de la invención puede prepararse mediante una variedad de procedimientos conocidos en la técnica. Estos procedimientos incluyen, pero no se limitan a, las síntesis química según cualquiera de los procedimientos descritos en Engels *et al.*, *Agnew. Chem., Int. Ed. Engl.*, 28:716-734 (1989), tales como los procedimientos del triéster, del fosfito, del fosforamidito y del H-fosfonato. En una realización, los codones preferidos por la célula huésped de expresión se usan en el diseño del ADN codificante. Alternativamente, el ADN que codifica los péptidos de la invención pueden alterarse para codificar una o más variantes mediante el uso de técnicas de ADN recombinantes, tales como la mutagénesis específica de un sitio (Kunkel *et al.*, *Methods Enzymol.*, 204: 125-139 (1991); Carter *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, *Nucl. Acids Res.*, 10:6487 (1982)), la mutagénesis por casete la mutagénesis por casete, Wells *et al.*, *Gene*, 34:315 (1985), la mutagénesis por selección de la restricción (Carter, *Directed Mutagenesis: A Practical Approach*, (editor, M.J. McPherson) IRL Press, Oxford, 1991), y similares.

Según aspectos preferidos descritos más arriba, el ácido nucleico codifica un ligando peptídico capaz de unir una molécula diana de albúmina del suero.

ES 2 270 893 T3

Según otro aspecto preferido de la invención, el ácido nucleico codifica una molécula híbrida que comprende una secuencia de dominio de ligando peptídico y un dominio activo. En este aspecto de la invención, el dominio activo puede comprender cualquier compuesto polipeptídico útil como un agente terapéutico o de diagnóstico, por ejemplo, enzimas, hormonas, citocinas, anticuerpos o fragmentos de anticuerpos. La molécula de ácido nucleico según este aspecto de la presente invención codifica una molécula híbrida, y el ácido nucleico que codifica la secuencia del dominio de ligando peptídico está unida operativamente (en el sentido de que las secuencias de ADN son contiguas y están en pauta de lectura) al ácido nucleico que codifica el agente biológicamente activo. Opcionalmente, estas secuencias de ADN pueden unirse a través de una secuencia de ácido nucleico que codifica una secuencia de aminoácidos del dominio de engarce.

Según este aspecto, la invención comprende además una secuencia de control de la expresión unida operativamente a la molécula de ADN que codifica un péptido de la invención, un vector de expresión, tal como un plásmido, que comprende la molécula de ADN, en donde la secuencia de control es reconocida por una célula huésped transformada con el vector, y una célula huésped transformada con el vector. En general, los vectores plasmídicos contienen secuencias de replicación y control que se derivan de especies compatibles con la célula huésped. El vector ordinariamente es portador de un sitio de replicación, así como de secuencias que codifican proteínas que son capaces de proporcionar la selección fenotípica en células transformadas.

Para la expresión en células procariotas, los vectores apropiados incluyen el pBR322 (ATCC N° 37.017), pHGH107 (ATCC N° 40.011), pBO475, pS0132, pRIT5, cualquier vector en la serie pRIT20 o pRIT30 (Nilsson y Abrahmsen, *Meth. Enzymol.*, 185:144-161 (1990)), pRIT2T, pKK233-2, pDR540 y pPL-lambda. Las células huéspedes procariotas que contienen los vectores de expresión de la presente invención incluyen la cepa 294 de *E. coli* K12 (ATCC N° 31.446), la cepa JM101 de *E. coli* (Messing *et al.*, *Nucl. Acid Res.*, 9:309 (1981)), la cepa B de *E. coli*, la cepa X1776 de *E. coli* (ATCC N° 31537), *E. coli* c600, *E. coli* W3110 (F-, gamma-, prototrófica; ATCC N° 27.325), la cepa 27C7 de *E. coli* (W3110, tonA, phoA E15, (argF-lac)169, ptr3, degP41, ompT, kanr) (Patente Estadounidense N° 5.288.931, ATCC N° 55.244), *Bacillus subtilis*, *Salmonella typhimurium*, *Serratia marcesans*, y especies de *Pseudomonas*.

Además de los procariotas, los organismos eucariotas, tales como las levaduras, o las células derivadas de organismos multicelulares pueden usarse como células huéspedes. Para la expresión en células huéspedes de levadura, tales como la levadura común de panadería o *Saccharomyces cerevisiae*, los vectores apropiados incluyen los vectores que se replican episomalmente basados en el plásmido de 2-micrómetros, los vectores de integración, y los vectores de cromosoma artificial de levadura (YAC). Para la expresión en células huéspedes de insecto, tales como las células Sf9, los vectores apropiados incluyen los vectores baculovíricos. Para la expresión en células huéspedes de plantas, particularmente huéspedes de plantas dicotiledóneas, tales como el tabaco, los vectores de expresión apropiados incluyen los vectores derivados del plásmido Ti de *Agrobacterium tumefaciens*.

Los ejemplos de células huéspedes de mamífero útiles incluyen la línea CV1 renal de mono transformada por SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); la línea renal embrionaria humana (células 293 ó 293 subclonadas para su crecimiento en cultivo en suspensión, Graham *et al.*, *J. Gen. Virol.*, 36:59 (1977)); las células ováricas de hámster chino/DHFR (CHO, Urlaub y Chasin, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 77:4216 (1980)); las células de Sertoli del ratón (TM4, Mather, *Biol. Reprod.*, 23:243-251 (1980)); las células renales de mono (CV1 ATCC CCL 70); las células renales de mono verde africano (VERO-76, ATCC CRL-1587); las células del carcinoma del cuello de útero humanas (HELA, ATCC CCL 2); células renales caninas (MDCK, ATCC CCL 34); células hepáticas de ratas Buffalo (BRL 3A, ATCC CRL 1442); células pulmonares humanas (W138, ATCC CCL 75); células hepáticas humanas (Hep G2, HB 8065); tumor mamario de ratón (MMT 060562, ATCC CCL51); células TRI (Mather *et al.*, *Annals N.Y. Acad. Sci.*, 383:44-68 (1982)); células MRC 5; células FS4; y una línea celular de hepatoma humana (Hep G2). Para la expresión en células huéspedes de mamífero, los vectores útiles incluyen los vectores derivados del SV40, los vectores derivados de citomegalovirus, tales como los vectores pRK, incluyendo el pRK5 y el pRK7 (Suva *et al.*, *Science*, 237:893-896 (1987); EP-307.247 (3/15/89), EP-278.776 (8/17/88)), los vectores derivados del virus de la viruela vacuna u otros virus de viruela, y vectores retrovirales tales como los vectores derivados del virus de la leucemia múrida de Moloney (MoMLV).

Opcionalmente, el ADN que codifica el péptido de interés está unido operativamente a una secuencia líder de la secreción, lo que resulta en la secreción del producto de expresión por parte de la célula huésped en el medio de cultivo. Los ejemplos de secuencias líder de secreción incluyen las de STII, ecotin, lamB, GD de herpes, lpp, fosfatasa alcalina, invertasa, y factor alpha. Es también apropiada para su uso en la presente invención de la secuencia líder de 36 aminoácidos de la Proteína A (Abrahmsen *et al.*, *EMBO J.*, 4:3901 (1985)).

Las células huéspedes se transfectan y preferiblemente transforman con los vectores de expresión o clonación de esta invención descritos más arriba, y se cultivan en medios nutritivos convencionales, modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes, o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células procariotas usadas para producir los presentes péptidos pueden cultivarse tal como se describe de forma general en Sambrook *et al.*, ver más arriba.

ES 2 270 893 T3

Las células huéspedes de mamífero usadas para producir péptidos de la invención pueden cultivarse en una variedad de medios. Los medios de cultivo disponibles comercialmente tales como el F10 de Ham (Sigma), el Medio Esencial Mínimo ((MEM), Sigma), el RPMI-1640 (Sigma), y el medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), Sigma) son apropiados para cultivar las células huéspedes. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham y Wallace, 5 *Meth. in Enz.*, 58:44 (1979), Barnes y Sato, *Anal. Biochem.*, 102:255 (1980), Patentes Estadounidenses n° 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 6 4.560.655; WO-90/03430; WO-87/00195; Patente Estadounidense Solicitada 30.985; o Patente Estadounidense 5.122.469, los descubrimientos de todas las cuales se incorporan en la presente por referencia, pueden usarse como medio de cultivo para las células huéspedes. Cualquiera de estos medios podría suplementarse según fuera necesario con hormonas y/o otros factores de crecimiento (tales como la insulina, la transferrina o el factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como el cloruro sódico, el calcio, el magnesio, y el fosfato), tampones (tales como el HEPES), nucleósidos (tales como la adenosina y la timidina), antibióticos (tales como el fármaco GentamicinaTM), oligoelementos (definidos como compuestos inorgánicos presentes usualmente en concentraciones finales del orden micromolar), y glucosa o una fuente de energía equivalente. Cualesquier otros suplementos necesarios podrían incluirse también en las concentraciones apropiadas, las cuales serán conocidas por los especialistas en el campo. Las condiciones del cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son aquéllas usadas previamente con la célula huésped seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el especialista ordinariamente capacitado.

Las células huéspedes mencionadas en este descubrimiento abarcan las células en cultivo *in vitro*, así como las 20 células que se hallan dentro de un animal huésped.

E. Síntesis química

Otro procedimiento para producir los compuestos de la invención implica la síntesis química. Esta puede llevarse a cabo usando metodologías bien conocidas en el estado de la técnica (consultar Kelley, R.F. & Winkler, M.E. en 25 *Genetic Engineering Principles and Methods*, editor Setlow, J.K, Plenum Press, N.Y., Vol. 12, pp 1-19 (1990); Stewart, J.M. Young, J.D., *Solid Phase Peptide Synthesis*, Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984); ver también Patente Estadounidense N° 4.105.603; 3.972.859; 3.842.067; y 3.862.925).

Los ligandos peptídicos de la invención pueden prepararse de forma conveniente usando la síntesis de péptidos en fase sólida. Merrifield, *J. Am. Chem., Soc.*, 85:2149 (1964); Houghten, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 82:5132 (1985). La síntesis de péptidos en fase sólida puede usarse también para preparar composiciones de molécula híbrida de la invención si el dominio activo es o comprende un polipéptido.

La síntesis en fase sólida empieza en el extremo carboxi-terminal del péptido naciente mediante el acoplamiento de un aminoácido protegido a un soporte sólido inerte. El soporte sólido inerte puede ser cualquier macromolécula capaz de servir como ancla para el extremo C-terminal del aminoácido inicial. Típicamente, el soporte macromolecular es una resina polimérica entrecruzada (por ejemplo, una resina de poliamida o de poliestireno) tal como se muestra en las Figuras 1-1 y 1-2, en las páginas 2 y 4 de Stewart y Young, ver más arriba. En una realización, el aminoácido C-terminal se acoplado a una resina de poliestireno para formar un éster bencílico. Un soporte macromolecular se selecciona de tal forma que el enlace de anclaje del péptido es estable en las condiciones usadas para desproteger el grupo α -amino de los aminoácidos bloqueados en la síntesis de péptidos. Si se usa un grupo α -protector lábil en base, entonces es deseable usar un enlace lábil en ácido entre el péptido y el soporte sólido. Por ejemplo, una resina éter lábil en ácido es efectiva para la síntesis de péptido con Fmoc-aminoácidos lábiles en base, tal como se describe en 45 la página 16 de Stewart y Young, ver más arriba. Alternativamente, pueden usarse un engarce de anclado peptídico y un grupo α -protector que son diferencialmente lábiles a la acidólisis. Por ejemplo, una resina tal como la resina fenilacetamidometil (Pam) funciona bien en conjunción con la síntesis peptídica con Boc-aminoácidos, tal como se describe en las páginas 11-12 de Stewart y Young, ver más arriba.

Una vez se ha acoplado el aminoácido inicial a un soporte sólido inerte, el grupo protector α -amino del aminoácido inicial se retira, por ejemplo, con ácido trifluoroacético (TFA) en cloruro de metilo y se neutraliza, por ejemplo, en trietilamina (TEA). A continuación de la desprotección del grupo α -amino del aminoácido inicial, se añade el siguiente aminoácido con el α -amino y la cadena lateral protegidos. El resto de aminoácidos con el α -amino, y si es necesario, con la cadena lateral protegidos se acoplan a continuación secuencialmente en el orden deseado mediante condensación para obtener un compuesto intermedio conectado al soporte sólido. Alternativamente, algunos aminoácidos podrían acoplarse los unos a los otros para formar un fragmento peptídico deseado, seguido por la adición del fragmento peptídico a la cadena peptídica que está creciendo en la fase sólida.

La reacción de condensación entre dos aminoácidos, o un aminoácido y un péptido, o un péptido y un péptido, puede llevarse a cabo de acuerdo con los procedimientos de condensación habituales, tales como el procedimiento del áxida, el procedimiento del anhídrido ácido mezclado, los procedimientos del DCC (N,N'-diciclohexilcarbodiimida) o DIC (N,N'-diisopropilcarbodiimida), el procedimiento del éster activo, el procedimiento del éster de p-nitrofenilo, el procedimiento del BOP (benzotriazol-1-il-oxi-tris [dimetilamino] fosfonio hexafluorofosfato), el procedimiento del imidoéster del ácido N-hidroxisuccínico, etc., y el procedimiento del reactivo K de Woodward.

Es común en la síntesis química de péptidos proteger cualesquier grupos reactivos de la cadena lateral de los aminoácidos con grupos protectores apropiados. En último lugar, estos grupos se retiran una vez se ha ensamblado secuencialmente la cadena polipeptídica deseada. Es también habitual la protección del grupo α -amino en un aminoácido

ES 2 270 893 T3

o fragmento de péptido mientras el grupo carboxi C-terminal del aminoácido o fragmento de péptido reacciona con el grupo amino N-terminal de la cadena polipeptídica que está creciendo en fase sólida, seguida por la retirada selectiva del grupo α -amino para permitir la adición del siguiente aminoácido o fragmento de péptido a la cadena polipeptídica en fase sólida. En consecuencia, es común en la síntesis de polipéptidos que se produzca un compuesto intermediario que contiene cada uno de los residuos aminoácidos ubicados en la secuencia deseada en la cadena peptídica, en donde los residuos individuales todavía llevan el grupo protector de la cadena lateral. Estos grupos protectores pueden retirarse sustancialmente a la vez para producir el producto polipeptídico deseado a continuación de liberarlo de la fase sólida.

las cadenas laterales α - y ϵ -amino pueden protegerse con grupos benciloxicarbonilo (abreviado Z), isonicotiniloxicarbonilo (iNOC), o-clorobenciloxicarbonilo [Z(2Cl)], p-nitrobenciloxicarbonilo [Z(NO₂)], p-metoxibenciloxicarbonilo [Z(OMe)], t-butoxicarbonilo (Boc), t-amiloxicarbonilo (Aoc), isoborniloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, 2-(4-bifenil)-2-propiloxicarbonilo (Bpoc), 9-fluorenilmetoxicarbonilo (Fmoc), metilsulfonietoxicarbonilo (Msc), trifluoroacetilo, ftalilo, formilo, 2-nitrofenilsulfenilo (NPS), difenilfosfinotioilo (Ppt), y dimetilfosfinotioilo (Mpt), y similares.

Los grupos protectores para el grupo funcional carboxi se ejemplifican con el benciléster (OBzl), ciclohexilester (Chx), 4-nitrobenciléster (ONb), t-butilester (Obut), 4-piridilmetilester (OPic), y similares. A menudo es deseable que los aminoácidos específicos, tales como la arginina, cisteína y serina, que poseen un grupo funcional distinto de los grupos amino y carboxi, se protejan mediante un grupo protector apropiado. Por ejemplo, el grupo guanidino de la arginina puede protegerse con nitro, p-toluenesulfonilo, benciloxicarbonilo, adamantiloxicarbonilo, p-metoxibencensulfonilo, 4-metoxi-2,6-dimetilbencensulfonilo (Nds), 1,3,5-trimetilfenisulfonilo (Mts), y similares. El grupo tiol de la cisteína puede protegerse con p-metoxibenciltrilito y similares.

Muchos de los aminoácidos bloqueados descritos más arriba pueden obtenerse a partir de fuentes comerciales tales como Novabiochem (San Diego, CA), Bachem CA (Torrence, CA) o Peninsula Labs (Belmont, CA).

Stewart y Young, más arriba, proporcionan información detallada respecto a los procedimientos para preparar los péptidos. La protección de los grupos α -amino se describe en las páginas 14-18, y el bloqueo de la cadena lateral se describe en las páginas 18-28. En las páginas 149-151 se proporciona una tabla de grupos protectores para las funciones amina, hidroxilo y sulfhidrilo.

Una vez se ha completado la secuencia de aminoácidos deseada, el péptido puede separarse del soporte sólido, recuperarse y purificarse. El péptido se retira del soporte sólido mediante un reactivo capaz de romper el enlace péptido-fase sólida, y opcionalmente desprotege los grupos funcionales bloqueados de las cadenas laterales del péptido. En una realización, el péptido se separa de la fase sólida mediante acidólisis con ácido fluorhídrico (HF) líquido, el cual también retira cualesquier grupos protectores de cadena lateral. Preferiblemente, con objeto de evitar la alquilación de los residuos en el péptido (por ejemplo, la alquilación de los residuos de metionina, cisteína y tirosina), la mezcla de reacción de la acidólisis contiene los secuestrantes tiocresol y cresol. A continuación del corte con HF, la resina se lava con éter, y el péptido libre se extrae de la fase sólida con lavados secuenciales de soluciones de ácido acético. Los lavados combinados se liofilizan, y el péptido se purifica.

F. Conjugación química de híbridos

En ciertas realizaciones de la presente invención, las moléculas híbridas pueden comprender dominios activos que son compuestos orgánicos que tienen utilidad diagnóstica o terapéutica, o alternativamente, fusiones entre un dominio de ligando peptídico y un dominio activo polipeptídico en configuraciones que no pueden codificarse en un único ácido nucleico. Los ejemplos de esta última realización incluyen fusiones entre el extremo amino terminal de un ligando peptídico y el extremo amino terminal del dominio activo, o fusiones entre el extremo carboxi-terminal de un ligando peptídico y el extremo carboxi-terminal del dominio activo.

La conjugación química puede emplearse para preparar estas realizaciones de la molécula híbrida, usando una variedad de agentes acopladores de proteína bifuncionales, tales como el N-succinimidil-3-(2-piridilditiol) propionato (SPDP), iminotiolano (IT), derivados bifuncionales de imidoésteres (tales como el dimetiladipimidato HCl), ésteres activos (tales como el disuccinimidilsuberato), aldehídos (tales como el glutaraldehído), compuestos bis-azido (tales como el bis (p-azidobenzoil) hexanediamina), derivados del bis-diazonio (tales como el bis-(p-diazoniobenzoil)-etilediamina), diisocianatos (tales como el tolueno, 2,6-diisocianato), y compuestos de flúor bis-activos (tales como el 1,5-difluoro-2,4-dinitrobenzoceno).

G. Péptidos unidos con disulfuro

Tal como se ha descrito más arriba, algunas realizaciones de la invención incluyen ligandos peptídicos ciclados. Los ligandos peptídicos pueden ciclarse mediante la formación de un enlace disulfuro entre residuos cisteína. Tales péptidos pueden prepararse mediante síntesis química tal como se ha descrito más arriba, y a continuación ciclarse mediante cualquier procedimiento apropiado usado en la formación de enlaces disulfuro. Por ejemplo, los péptidos pueden recuperarse a partir de la fase sólida con los sulfhidrilos en forma reducida, disolverse en una solución diluida en donde la concentración intramolecular de cisteína excede la concentración intermolecular de cisteína con objeto de optimizar la formación intramolecular de enlaces disulfuro, tales como una concentración de péptido de 25 mM a

ES 2 270 893 T3

1 μM , y preferiblemente de $500 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$, y más preferiblemente de $25 \mu\text{M}$ a $1 \mu\text{M}$, y a continuación oxidarse exponiendo los grupos sulfhidrilo libres a un agente oxidante suave que es suficiente para generar enlaces disulfuro intramoleculares, por ejemplo, oxígeno molecular con o sin catalizadores, tales como cationes metálicos, ferricianuro potásico, tetratiónato sódico, etc. Alternativamente, los péptidos pueden ciclarse tal como se describe en Pelton *et al.*,
5 *J. Med. Chem.*, 29:2370-2375 (1986).

La ciclación puede conseguirse mediante la formación, por ejemplo, de un enlace disulfuro o un enlace lactama entre una primera Cys y una segunda Cys. Los residuos capaces de formar un enlace disulfuro incluyen, por ejemplo, Cys, Pen, Mpr y Mpp y sus equivalentes que contienen un grupo 2-amino. Los residuos capaces de formar un puente
10 lactama incluyen, por ejemplo, Asp, Glu, Lys, Orn, el ácido $\alpha\beta$ -diaminobutírico, el ácido diaminoacético, el ácido aminobenzoico y el ácido mercaptobenzoico. Los compuestos en la presente invención pueden ciclarse por ejemplo a través de un enlace lactama, el cual puede utilizar el grupo de la cadena lateral de un residuo no adyacentes para formar un enlace covalente con el grupo amino N-terminal de la Cys u otro aminoácido. También pueden usarse estructuras en puente alternativas para ciclar los compuestos de la invención, incluyendo, por ejemplo, los péptidos
15 y los peptidomiméticos, los cuales pueden ciclarse a través de S-S, CH₂-S, CH₂-O-CH₂, éster de lactama u otros enlaces.

H. Composiciones farmacéuticas

20 Las composiciones farmacéuticas que comprende las moléculas híbridas de la invención pueden administrarse en cualquier forma apropiada, incluyendo la parental, tópica, oral o local (tal como en aerosol o transdérmica) o cualquier combinación de las mismas.

Otras composiciones apropiadas de la presente invención comprenden cualquiera de las composiciones antes mencionadas con un portador farmacéuticamente aceptable, difiriendo la naturaleza del portador con el modo de administración, por ejemplo, en la administración oral, usualmente se usa un portador sólido, y en la administración i.v. un portador de solución salina líquido.

Las composiciones de la presente invención incluyen componentes farmacéuticamente aceptables que son compatibles con el tema y la proteína de la invención. Estos generalmente incluyen las suspensiones, las soluciones y elixires, y más especialmente los tampones biológicos, tales como la solución salina tamponada con fosfato, la solución salina, el medio de Dulbecco, y similares. También pueden usarse aerosoles, o portadores tales como los almidones, los azúcares, la celulosa microcristalina, los diluyentes, los agentes granulación, lubricantes, unidores, agentes desintegradores, y similares (en el caso de preparaciones sólidas orales, tales como polvos, cápsulas y tabletas).
35

Tal y como se usa en la presente invención, el término "farmacéuticamente aceptable" generalmente significa aprobado por una agencia regulador del gobierno federal o estatal, o listado en la U.S. Pharmacopeia u otra farmacopea generalmente reconocida, para su uso en animales, y más particularmente en humanos.

40 La formulación escogida puede conseguirse usando una variedad de los tampones antes mencionados, o incluso excipientes, incluyendo, por ejemplo, los grados farmacéuticos de manitol, lactosa, almidón, estearato magnésico, sacarina celulosa sódica, carbonato magnésico, y similares. La "PEGilación" de las composiciones puede conseguirse usando técnicas conocidas en el campo (ver, por ejemplo, la Publicación de Patente Internacional N° WO92/16555, la Patente Estadounidense N° 5.122.614 a Enzon, y la Publicación de Patente Internacional N° W092/00748).

Una ruta de administración preferida de la presente invención es en forma de aerosol o inhalada. Los compuestos de la presente invención, combinados con un agente de dispersión, o dispersante, pueden administrarse en una formulación de aerosol como un polvo seco o en una solución o suspensión con un diluyente.

50 Tal como se usa en la presente invención, el término "dispersante" se refiere a un agente que ayuda a la aerosolización del compuesto o a la absorción de la proteína en el tejido pulmonar, o a ambos. Preferiblemente, el dispersante es farmacéuticamente aceptable. Los agentes de dispersión apropiados son bien conocidos en el estado de la técnica, e incluyen, pero no se limitan a los tensioactivos y similares. Por ejemplo, pueden usarse los tensioactivos que se usan de forma general en la técnica para reducir la agregación de un compuesto inducida por la superficie, especialmente de un compuesto peptídico, causada por la atomización de la solución formadora del aerosol líquido. Los ejemplos no limitantes de tales tensioactivos son los tensioactivos tales como los alcoholes y ésteres de ácidos grasos y polioxietileno, y los ésteres de ácido graso y sorbitán polioxietileno. Las cantidades de tensioactivos usadas variarán, estando generalmente en el intervalo de desde aproximadamente 0,001% hasta aproximadamente 4% en peso de la formulación. En un aspecto específico, el tensioactivo es monooleato de sorbitán polioxietileno o trioleato de sorbitán. Los tensioactivos apropiados son bien conocidos en el estado de la técnica, y pueden seleccionarse en base a las propiedades deseadas, dependiendo de la formulación específica, de la concentración del compuesto, del diluyente (en una formulación líquida) o en forma de polvo (en una formulación en polvo seco).
60

65 Además, dependiendo de la elección del ligando peptídico, del efecto terapéutico deseado, la calidad del tejido pulmonar (por ejemplo, pulmones enfermos o sanos), y de otros numerosos factores, las formulaciones líquidas o secas pueden comprender componentes adicionales, tal como se discute adicionalmente más abajo.

Las formulaciones de aerosol líquidas generalmente contienen el híbrido de ligando peptídico/dominio activo y un agente dispersante en un diluyente fisiológicamente aceptable. Las formulaciones en aerosol de polvo seco de la presente invención consisten en una forma sólida finamente dividida del híbrido de ligando peptídico/dominio activo y un agente dispersante. Tanto con la formulación líquida como en aerosol de polvo seco, la formulación debe aerosolizarse. Es decir, debe romperse en partículas líquidas o sólidas con objeto de asegurar que la dosis aerosolizada alcanza realmente los alvéolos. En general el diámetro dinámico mediano de la masa será de 5 micrómetro o menos con objeto de garantizar que las partículas de fármaco alcanzan los alvéolos pulmonares (Wearley, L.L., *Crit. Rev. in Ther. Drug Carrier Systems*, 8:333 (1991)). El término "partícula de aerosol" se usa en la presente invención para describir la partícula líquida o sólida apropiada para la administración pulmonar, es decir, que alcanzará los alvéolos. Otras consideraciones tales como la construcción del dispositivo de suministro, los componentes adicionales en la formulación, y las características de la partícula son importantes. Estos aspectos de la administración pulmonar de un fármaco son bien conocidos en el estado de la técnica, y las manipulaciones de las formulaciones, los medios de aerosolización, y la construcción de un dispositivo de suministro requieren como mucho experimentación rutinaria por parte del especialista capacitado en la técnica.

En relación a la construcción del dispositivo de suministro, en la práctica de la invención puede usarse cualquier forma de aerosolización conocida en el estado de la técnica, incluyendo, pero no limitándose a la nebulización, la atomización o la aerosolización mediante bomba de una formulación líquida, y la aerosolización de una formulación de polvo seco. Se concibe un dispositivo de suministro que esté especialmente diseñado para la administración de formulaciones sólidas. A menudo, la aerosolización de una formulación líquida o de polvo seco requerirá un propulsor. El propulsor puede ser cualquier propulsor usado de forma general en la técnica. Son ejemplos no limitantes y específicos de tales propulsores útiles el clorofluorocarburo, un hidrofurocarburo, un hidroclofluorocarburo, o un hidrocarburo, incluyendo el trifluorometano, el diclorodifluorometano, el diclorotetrafluoroetano, y el 1,1,2,2-tetrafluoroetano, o combinaciones de los mismos.

En un aspecto preferido de la invención, el dispositivo para la aerosolización es un inhalador de dosis calibrado. Un inhalador de dosis calibrado proporciona una dosis específica cuando se administra, en vez de una dosis variable dependiendo de la administración. Un inhalador de dosis calibrado de este tipo puede usarse tanto con una formulación líquida o de aerosol de polvo seco. Los inhaladores de dosis calibrados son bien conocidos en la técnica.

Una vez el híbrido de ligando peptídico/dominio activo alcanza el pulmón, un cierto número de factores dependientes de la formulación afectan la absorción del fármaco. Se apreciará que al tratar una enfermedad o trastorno que requiere niveles circulatorios del compuesto, los factores tales como el tamaño de la partícula del aerosol, la forma de la partícula del aerosol, la presencia o ausencia de infección, la enfermedad o embolias pulmonares pueden afectar la absorción de los compuestos. Para cada una de las formulaciones descritas en la presente invención, pueden ser apropiados ciertos lubricantes, potenciadores de la absorción, estabilizantes de la proteína o agentes de suspensión. La elección de estos agentes adicionales variará dependiendo del objetivo. Se apreciará que en los casos en los que se desea o busca el suministro local de los compuestos, las variables tales como la potenciación de la absorción serán menos críticas.

I. *Formulaciones de aerosol líquidas*

Las formulaciones de aerosol líquidas de la presente invención típicamente se usarán con un nebulizador. El nebulizador puede ser impulsado mediante aire comprimido o ultrasónico. Cualquier nebulizador conocido en el estado de la técnica puede usarse conjuntamente con la presente invención, tal como, pero sin limitarse a: Ultravent, Mallinckrodt, Inc. (St. Louis, MO); el nebulizador Acorn II (Marquest Medical Products, Englewood CO). Otros nebulizadores útiles de forma conjunta con la presente invención se describen en las Patentes Estadounidenses nº 4.624.251 concedida el 25 de noviembre de 1986; 3.703.173 concedida el 21 de noviembre de 1972; 3.561.444 concedida el 9 de febrero de 1971, y 4.635.627 concedida el 13 de enero de 1971.

Las formulaciones pueden incluir un portador. El portador es una macromolécula que es soluble en el sistema circulatorio, y que es fisiológicamente aceptable cuando la aprobación fisiológica significa que los especialistas en la técnica aceptarán la inyección de dicho portador en un paciente como parte de un régimen terapéutico. El portador preferiblemente es relativamente estable en el sistema circulatorio, con una vida media de eliminación aceptable. Tales moléculas incluyen, pero no se limitan a la lecitina de soja, el ácido oleico, y el trioleato de sorbitán, siendo el trioleato de sorbitán el preferido.

Las formulaciones de la presente realización pueden incluir también otros agentes útiles para la estabilización de las proteínas o para la regulación de la presión osmótica. Los ejemplos de tales agentes incluyen, pero no se limitan a sales, tales como el cloruro sódico, o el cloruro potásico, y los carbohidratos, tales como la glucosa, la galactosa o manosa, y similares.

J. *Formulaciones de polvo seco en aerosol*

También se contempla que la presente formulación farmacéutica se usará como una formulación para inhalador de polvo seco, que comprende una forma en polvo finamente dividido del ligando peptídico y un dispersante. La forma del compuesto generalmente será un polvo liofilizado. Las formas liofilizadas de los compuestos híbridos de ligando peptídico/dominio activo pueden obtenerse a través de técnicas estándares.

En otra realización, la formulación en polvo seco comprenderá un polvo seco finamente dividido que contiene uno o más compuestos de la presente invención, un agente dispersante y también un agente de carga. Los agentes de carga útiles en conjunción con la presente formulación incluyen tales agentes como la lactosa, el sorbitol, la sacarosa, o el manitol, en cantidades que facilitan la dispersión del polvo a partir del dispositivo.

5 K. Composiciones para investigación, fabricación y diagnóstico

En una realización preferida, los ligandos peptídicos o las moléculas híbridas de la invención no se adsorben de forma no covalente o se unen covalentemente a una macromolécula, tal como un soporte sólido. Se apreciará que la invención abarca macromolécula complejadas con los ligandos peptídicos o moléculas híbridas.

En general, el soporte sólido es una matriz inerte, tal como un gel polimérico, que comprende una estructura, enramado o red tridimensional de un determinado material. Prácticamente cualquier macromolécula, sintética o natural, puede formar un gel en un líquido apropiado cuando se entrecruza de manera adecuada con un reactivo bifuncional. Preferiblemente, la macromolécula seleccionada es conveniente para su uso en la cromatografía de afinidad. La mayoría de las matrices cromatográficas usadas para la cromatografía de afinidad son xerogeles. Tales geles se encogen al secarse hasta un sólido compacto que comprende solamente la matriz del gel. Cuando un xerogel seco se resuspende en el líquido, la matriz del gel se empapa de líquido, se hincha, y retorna al estado de gel. Los xerogeles apropiados para su uso en la presente invención incluyen los geles poliméricos, tales como la celulosa, los dextranos entrecruzados (por ejemplo, la Sepharose), la agarosa, la agarosa entrecruzada, los geles de poliacrilamida, y los geles de poliacrilamida-agarosa.

Alternativamente, los aerogeles pueden usarse para la cromatografía de afinidad. Estos geles no se encogen la secarse, sino que meramente permiten que penetre el aire que los rodea. Cuando el gel seco se expone a un líquido, éste último desplaza el aire en el gel. Los aerogeles apropiados para su uso en la presente invención incluyen el vidrio poroso y los geles cerámicos.

También están abarcados en la presente invención los ligandos peptídicos o moléculas híbridas de la invención acopladas a geles derivados, en donde los grupos de derivación facilitan el acoplamiento de las moléculas híbridas a la matriz del gel y evitan el impedimento estérico de la interacción ligando peptídico-molécula diana en la cromatografía de afinidad. Alternativamente, pueden intercalarse brazos espaciadores entre la matriz del gel y las moléculas híbridas para conseguir similares beneficios.

Una variación de lo anterior contempla el uso de fusiones de genes y el uso de ligandos peptídicos como reactivos de purificación. De acuerdo con este aspecto de la invención, el gen que codifica el ligando peptídico está asociado, en un vector, con un gen que codifica otra proteína o un fragmento de otra proteína. Esto resulta en que el ligando peptídico es producido por la célula huésped como una fusión con otra proteína o péptido. La “otra” proteína o péptido es a menudo una proteína o péptido que puede ser secretada por la célula, haciendo posible aislar y purificar la otra proteína del medio de cultivo, y elimina la necesidad de destruir las células huéspedes que surge cuando la otra proteína permanece dentro de la célula. Alternativamente, la proteína de fusión puede expresarse intracelularmente. Es útil usar proteínas de fusión que se expresan abundantemente.

El uso de las fusiones de genes es análogo al uso de las fusiones de Proteína A, las cuales se usan a menudo porque la unión de la Proteína A, o más específicamente, del dominio Z de la Proteína A, une a la IgG y proporciona un “asa de afinidad” para la purificación de la proteína fusionada. De acuerdo con un aspecto preferido de la invención, los ligandos peptídicos que unen la albúmina de suero se usan como “asas de afinidad” para la purificación de proteínas fusionadas sobre un soporte sólido de albúmina de suero. Por ejemplo, una secuencia de ADN que codifica el ligando peptídico deseado puede fusionarse, mediante mutagénesis dirigida a un sitio, al gen para la proteína. Después de la expresión y secreción, la proteína de fusión puede purificarse sobre una matriz de albúmina de suero a la cual se unirá el ligando peptídico. Después de la purificación, el ligando peptídico puede cortarse enzimática o químicamente para rendir la proteína libre o dejarlo intacto para ayudar a incrementar la vida media de eliminación de la proteína fusionada. Las proteínas de fusión pueden cortarse usando compuestos químicos, tales como el bromuro de cianógeno, el cual corta en una metionina, o hidroxilamina, la cual corta entre un residuo Asn y un residuo Gly. Usando la metodología estándar del ADN recombinante, los pares de bases de nucleótidos que codifican estos aminoácidos pueden insertarse justo antes del extremo 5' del gen que codifica el péptido deseado. Alternativamente, se puede emplear el corte proteolítico e la proteína de fusión. Carter, en *Protein Purification: From Molecular Mechanisms to Large-Scale Processes*, editores Ladisch *et al.*, (American Chemical Society Symposium Series No. 427, 1990), capítulo 13, páginas 181-193.

Los ejemplos siguientes se ofrecen a modo de ilustración y no a modo de limitación. Los ligandos IgG-Fc péptido no se hallan dentro del ámbito de la presente invención. Los Ejemplos 1 a 5 se incluyen para ilustrar los principios y procedimientos usados por los inventores.

65

Ejemplo 1

Comparativo

5 *IgG-Fc Ligandos peptídicos*

Se realizó una selección *in vitro* diseñada para identificar ligandos peptídicos que se unieran a la superficie de IgG-Fc sin la restricción de que los péptidos funcionaran *in vivo*. La selección se consiguió usando una combinación de exhibición en fagos polivalentes y monovalentes, la cual se ha aplicado recientemente para generar péptidos que se unen a una variedad de hormonas y receptores celulares. N.C. Wrighton, *et al.*, *Science*, 273:458 (1996), O. Livnah, *et al.*, *Science*, 273:464 (1996). Se construyó una única biblioteca de péptidos restringidos con disulfuro que consistía en 4×10^9 péptidos diferentes de la forma Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k en donde Xaa es un aminoácido aleatorio procedente de un codón NNS, $i+j+k = 18$, y $j = 4$ hasta 10. Esta biblioteca se expresó sobre la superficie del bacteriófago M13 como una fusión N-terminal a la proteína del gen VIII, con un engarce corto consistente en residuos glicina y serina. H. B. Lowman *et al.*, *Biochemistry*, 37:8870-8878 (1998). Más concretamente, la construcción de la biblioteca contenía un péptido señalizador de secreción STII, la biblioteca de péptidos de veinte aminoácidos de longitud, es decir, Xaa_i-Cys-Xaa_j-Cys-Xaa_k en donde Xaa es un aminoácido aleatorio procedente de un codón NNS, $i+j+k = 18$, y $j = 4$ hasta 10, un ligador Gly-Gly-Gly-Ser-Gly-Gly-Gly (SEC. N° ID.: 1), y el gen VIII de M13 empezando en el primer residuo de la proteína madura.

En principio, se pudieron seleccionar los péptidos que se unían a potencialmente cualquier región de la IgG-Fc debido a la naturaleza no sesgada de esta biblioteca. Sin embargo, después de varias rondas de selección, la biblioteca paso a estar dominada por un único péptido, Fc-I (Glu-Thr-Gln-Arg-Cys-Thr-Trp-His-Met-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Glu-Arg-Glu-His-Asn) (SEC. N° ID.: 2). Las selecciones se realizaron tal y como se describe en H.B. Lowman, *et al.*, ver más arriba, con las modificaciones siguientes: los pocillos de microvaloración se recubrieron usando $5 \mu\text{g/ml}$ IgG-Fc; se usó tampón Casein Blocker (Pierce) en vez de la BSA al 0,1% para prevenir mejor la unión no específica; la elución del fago se efectuó bien con DTT 75 mM ó glicina 0,2 mM pH 2,0, con resultado equivalente. La IgG-Fc se obtuvo mediante corte con papaína de la proteína inmunoadhesina CD4-IgG1, Capon *et al.*, *Nature*, 337:525 (1989). El material cortado se purificó sobre Protein A-Sepharose seguida por Superdex-75 (Pharmacia), y a continuación se cuantificó mediante absorbancia a 280 nm.

La repetición del experimento de selección proporcionó de nuevo Fc-I y también un péptido relacionado, Fc-II (Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu) (SEC. N° ID.: 3). El péptido Fc-II compartía el espaciado de cisteína y la secuencia interna Gly-Glu-Leu-Val-Trp (SEC. N° ID.: 132) vista en Fc-I. Aparentemente, estos dos péptidos se unen a la IgG-Fc con una afinidad lo bastante elevada como para ser seleccionados por delante de cualquiera de los otros péptidos unidores de IgG-Fc presentes en el conjunto inicial. Ambos péptidos se sintetizaron en fase sólida usando protocolos estándares de 9-fluorenilmetoxicarbonilo, y se purificaron mediante HPLC en fase reversa. Las masas se confirmaron mediante espectrometría de masas por electrospray, y los péptidos purificados se cuantificaron mediante absorbancia de UV a 284 nm.

Se realizaron ELISA de competición de manera similar al procedimiento descrito en H. B. Lowman, *et al.*, ver más arriba. De forma resumida, se inmovilizó un dominio Z de Proteína A sobre pocillos de microvaloración a una concentración de $5 \mu\text{g/ml}$, se bloquearon, y se lavaron tal como se describió. Se preparó una matriz de mezclas de IgG-Fc biotinilada a concentraciones desde 312 nM hasta 0,3 nM, y del péptido a concentraciones desde $215 \mu\text{M}$ hasta 0,8 nM. Estas mezclas se incubaron durante 1 hora con dominio Z de Proteína A inmovilizado. A continuación se lavaron y revelaron las placas tal como se había descrito usando un conjugado avidina/HRP. A continuación se calcularon las curvas de inhibición para cada concentración de biotina-IgG-Fc, y entonces, la curva de la inhibición mitad de la máxima, "IC₅₀", se extrapola hasta una concentración cero de biotina-IgG-Fc con objeto de obtener una K_i. Se halló que ambos péptidos, Fc-I y Fc-II, competían con la Proteína A (dominio Z) (B. Nilsson *et al.*, *Protein Eng.*, 1:107 (1987)) por la unión a la IgG-Fc con constantes de inhibición (K_i) de aproximadamente $5 \mu\text{M}$. Los resultados implican que estos péptidos se unen a un sitio solapado sobre la IgG-Fc, el cual coincide con el sitio de unión de la Proteína A.

La secuencia de ADN del péptido Fc-II se transfirió a una formato de exhibición en fago monovalente mediante mutagénesis en casete para rendir una construcción con la secuencia señal STII, el péptido Fc-II Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (SEC. N° ID.: 3), un engarce Gly-Gly-Gly-Pro-Gly-Gly-Gly (SEC. N° ID.: 4), y la proteína del gen III del M13 empezando en el residuo 253. La secuencia de Fc-II se maduró por afinidad mediante exhibición en fago monovalente. Se mutaron aleatoriamente bloques de cinco residuos en seis bibliotecas distintas para cubrir exhaustivamente las posiciones que no eran de cisteína en la secuencia del péptido, y a continuación se examinaron frente a IgG-Fc.

Se construyeron una serie de bibliotecas de exhibición sobre fago monovalente de segunda generación basadas en la secuencia del Fc-II Lys-Glu-Ala-Ser-Cys-Ser-Tyr-Trp-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Val-Ala-Gly-Val-Glu (SEC. N° ID.: 3), en la cual cinco residuos secuenciales se aleatorizaron usando codones NNS en cada biblioteca, empezando en las posiciones 1, 4, 7,10, 12, y 16, excluyendo las dos cisteínas. Cada biblioteca tenía una diversidad de aproximadamente 1×10^8 . Estas bibliotecas se examinaron independientemente en función de la unión a IgG-Fc durante seis rondas, y a continuación se secuenciaron. Los residuos preferidos procedentes de esta selección se recombinaron entonces usando tres bibliotecas adicionales que abarcaban la secuencia comple-

ES 2 270 893 T3

ta del péptido. Las tres bibliotecas adicionales se construyeron usando la degeneración del código genético para recombinar en un péptido los aminoácidos preferidos en cada posición. Las secuencias de ADN para estas bibliotecas contenían las siguientes mezclas de bases (códigos IUPAC): DRG GWA GMA RRC TGC KCT TRS CAC
 5 MTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC RVC RVM BKC GAS KDW (SEC. N° ID.: 5), DRS VWG SVG RRC
 TGC KCC TRS YRS MTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC RNC VVS NBS GWS KDM (SEC. N° ID.: 6), y
 DNS NNS NNS VNS TGC BVG TDS HRS MDS GGC GAG STC KKG WRG TGC RNM NNS NNS NNS NNM
 (SEC. N° ID.: 7). Estas bibliotecas se clasificaron también frente a IgG-Fc durante seis rondas y a continuación se secuenciaron.

10 Después de examinarlas frente a IgG-Fc, los patrones consenso procedentes de estas bibliotecas sugerían una
 secuencia nuclear de 13 residuos altamente conservada (Asp-Cys-Ala-Trp-His-Leu-Gly-Glu-Leu-Val-Trp-Cys-Thr)
 (SEC. N° ID.: 8). Se sintetizó el péptido correspondiente (Fc-III) y se halló que inhibía la unión de la Proteína A
 (dominio Z) al Fc con una IC₅₀ de 100 nM. Por tanto, aunque el Fc-III es siete residuos más corto que el Fc-II, se une
 15 50 veces más intensamente. A pesar de su pequeño tamaño, la afinidad de unión del Fc-III por el Fc fue sólo diez veces
 más débil que la de los dominios procedentes de la Proteína A y Proteína G, los cuales son aproximadamente cuatro
 veces mayores y se unen con KS de alrededor de 10 nM. S. R. Fahnestock, *et al.*, en *Bacterial Immunoglobulin-Binding
 Proteins* (Academic Press, Inc. 1990), volumen 1, capítulo 11. R. Karlsson, L. Jendeberg, B. Nilsson, J. Nilsson, P.
 Nygren, *J. Immuno. Methods*, 183:43 (1995).

20 La Tabla I lista las secuencias de aminoácidos y afinidades de unión a IgG-Fc de los ligandos peptídicos de IgG-
 Fc ilustrativos que se identificaron usando los procedimientos descritos más arriba.

TABLA I

Secuencias y afinidades de los ligandos peptídicos para la IgG-Fc

<u>Secuencia</u>	<u>N° de ID de la secuencia</u>	<u>Afinidad de unión</u>
Péptidos *Todos los péptidos tienen una amina N-terminal y una amida C-terminal		
KEASCSYWLGELVWCVAGVE	SEC. N° ID.: 3	5000 nM (Ki)
ETQRCTWHMGELVWCEREHN	SEC. N° ID.: 2	5000 nM (Ki)
DLADCSWHMGELVWC SRVEG	SEC. N° ID.: 15	50 nM (Kd)
WEADCAWHLGELVWCTPMEF	SEC. N° ID.: 16	30 nM (IC ₅₀)
DCAWHLGELVWCT	SEC. N° ID.: 8	100 nM (IC ₅₀)

ES 2 270 893 T3

TABLA I (continuación)

5 **Clones de fago** Todas las
(Exhibición M13/gIII) afinidades por
fago son EC₅₀

10 N/A = No se ensayó individualmente.

15 Puesto que se seleccionaron para que se unieron, EC₅₀
probablemente será < 1 µM o mejor.

Todos los péptidos listados se unen a la IgG-Fc.

20 **Bibliotecas enfocadas**

25	KEASCSYWLGELVWCDTLTE	SEC. N° ID.: 17	N/A
25	KEASCSYWLGELVWCSPGVE	SEC. N° ID.: 18	734 nM
25	KEASCSYWLGELVWC SGVEG	SEC. N° ID.: 19	N/A
30	KEASCSYWLGELVWC SAGVE	SEC. N° ID.: 20	N/A
30	ESEDCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 21	N/A
35	EKEDCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 22	N/A
35	EDPDCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 23	N/A
40	EEADCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 24	N/A
40	NADDCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 25	N/A
45	SETTCSYWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 26	N/A
45	AWKTCQWLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 27	N/A
50	DLADCSYWLGELVWC SRVEG	SEC. N° ID.: 28	776 nM
50	KEADCAWHLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 29	138 nM
55	KEAECSYHLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 30	N/A
55	KEARCWYWHGELVWC SDPEE	SEC. N° ID.: 31	809 nM
60	KEASCSYHLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 32	416 nM
60	KEASCSWHLGELVWC VAGVE	SEC. N° ID.: 33	225 nM
65	KEASCSYWLGELVWC TEGVE	SEC. N° ID.: 34	818 nM

ES 2 270 893 T3

TABLA I (continuación)

5	KEASCSYWLGELVWCDDGVE	SEC. N° ID.: 35	N/A
	KEASCSYWLGELVWCSEGVE	SEC. N° ID.: 36	N/A
	KEASCSYWLGELVWCSPGVE	SEC. N° ID.: 18	N/A
10	KEASCSYWLGEVWKCKSGVE	SEC. N° ID.: 37	N/A
	KEASCSYWLGELVWC DNGVE	SEC. N° ID.: 38	N/A
15	KEASCSYWLGELVWC DTFDE	SEC. N° ID.: 39	01 nM
	KEASCSYWLGELVWC DGLDE	SEC. N° ID.: 40	326 nM
20	KEASCSYWLGELVWC VGLDE	SEC. N° ID.: 41	278 nM
	KEASCSYWLGELVWC EDTLE	SEC. N° ID.: 42	N/A
25	KEASCSYWLGELVWC EDTME	SEQ ID-NO: 43	N/A
	KEASCSYWLGELVWC EDMME	SEC. N° ID.: 44	N/A
30	WVEDCSWHMGELVWC DGGEF	SEC. N° ID.: 45	39 nM
	KEASCSYWLGELVWC DWMNG	SEC. N° ID.: 46	N/A
35	KEASCSYWLGELVWC DDTPV	SEC. N° ID.: 47	N/A
	KEASCSYWLGELVWC DDDYGE	SEC. N° ID.: 48	N/A
40	KEASCSYWLGELVWC SDLWE	SEC. N° ID.: 49	N/A
	WRGGCSWHMGELVWC EHDME	SEC. N° ID.: 50	N/A
45	AVSKCSFHMSELVWC SDVMN	SEC. N° ID.: 51	N/A
	NQVSCSYSRGELVWC SKQSQ	SEC. N° ID.: 52	N/A
50	GRMECAWHQGELVWC TPTLE	SEC. N° ID.: 53	N/A
	GTMECSWHQGELVWC TPTLA	SEC. N° ID.: 54	N/A
	EMRDCSWHLGELVWC AHMEG	SEC. N° ID.: 55	N/A
55	GSWECAYHLGELVWC ETGSG	SEC. N° ID.: 56	N/A
	VAEPCAYHLGELVWC EVLKG	SEC. N° ID.: 57	N/A
60	KEAMCSYWLGELVWC ES DMP	SEC. N° ID.: 58	N/A

Clones diseñados

65

ES 2 270 893 T3

TABLA I (continuación)

5	DLADCSWHLGELVWCSRVEG	SEC. N° ID.: 59	9nM
	DLADCSWHLGELVWCVGLDE	SEC. N° ID.: 60	28 nM
	WVEDCSWHLGELVWCVGLDF	SEC. N° ID.: 61	31 nM
10	Optimización secundaria		
	KVADCAWHMGELVWCTEVEG	SEC. N° ID.: 62	23 nM
15	GEEDCSYHLGELVMCTELDD	SEC. N° ID.: 63	69 nM
	GVADCAWHLGELVWCTERED	SEC. N° ID.: 64	N/A
20	GEEDCAWHLGELVWCSSGDF	SEC. N° ID.: 65	100 nM
	WEADCAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 66	7nM
25	GEADCSYHLGELVWCNDFEE	SEC. N° ID.: 67	156 nM
	WVDCAYHLGELVWCSTFEE	SEC. N° ID.: 68	9nM
30	WVEDCAWHMGELVWCTKVDE	SEC. N° ID.: 69	70 nM
	READCAWHLGELVWCSEKDL	SEC. N° ID.: 70	47 nM
35	EEASCAYHLGELVWCDAFDV	SEC. N° ID.: 71	77 nM
	RVASCAWHLGELVWCDGLDG	SEC. N° ID.: 72	N/A
40	GEADCAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 73	38 nM
	GEASCAYHLGELVWCDEGEG	SEC. N° ID.: 74	386 nM
45	RVEDCAYHLGELVWCTEGDE	SEC. N° ID.: 75	63 nM
	EEPDCSWHLGELVMCTPMEV	SEC. N° ID.: 76	14 nM
50	KEADCAWHMGELVWCSEMEG	SEC. N° ID.: 77	66 nM
	EQADCAWHLGELVWCTPMVF	SEC. N° ID.: 78	8 nM
55	EEPDCSWHLGELVWCTPIEV	SEC. N° ID.: 79	15 nM
	GEPDCAWHLGELVWCTPMVF	SEC. N° ID.: 80	7 nM
60	GEQDCSYHMGELVWCTTVDG	SEC. N° ID.: 81	210 nM
	GVRNCAYHLGELVWCTPMEF	SEC. N° ID.: 82	10 nM
65	RVADCAWHMGELVWCSELEV	SEC. N° ID.: 83	44 nM

ES 2 270 893 T3

TABLA I (continuación)

5	GEADCAWHLGELVWCTPMDL	SEC. N° ID.: 84	N/A
	GEQDCSWHLGELVWCTPMEV	SEC. N° ID.: 85	N/A
	GMRDCSYHLGELVWCSDMEL	SEC. N° ID.: 86	N/A
10	EVADCSWHLGELVWCTEGEF	SEC. N° ID.: 87	54 nM
	GEEDCAWHLGELVWCTDVED	SEC. N° ID.: 88	52 nM
15	EVEDCAYHLGELVWCSDLEG	SEC. N° ID.: 89	82 nM
	WEEDCAWHLGELVWCAEFDE	SEC. N° ID.: 90	44 nM
20	KEASCAWHLGELVWCSEVEE	SEC. N° ID.: 91	130 nM
	Barrido con ALA en el fago		
25	AEADCAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 92	20 nM
	WAADCAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 93	34 nM
30	WEPDCAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 94	36 nM
	WEAACAWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 95	55 nM
35	WEAACSWHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 96	10 nM
	WEADCA AHLGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 97	798 nM
40	WEADCAWALGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 98	139 nM
	WEADCAWHAGELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 99	56 nM
45	WEADCAWHLAELVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 100	12 nM
	WEADCAWHLGALVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 101	11 nM
50	WEADCAWHLGEAVWCTKVEE	SEC. N° ID.: 102	1890 nM
	WEADCAWHLGELAWCTKVEE	SEC. N° ID.: 103	4670 nM
55	WEADCAWHLGELVACTKVEE	SEC. N° ID.: 104	3380 nM
	WEADCAWHLGELVWCAKVEE	SEC. N° ID.: 105	101 nM
60	WEADCAWHLGELVWCTAVEE	SEC. N° ID.: 106	10 nM
	WEADCAWHLGELVWCTKAE E	SEC. N° ID.: 107	8 nM
65	WEADCAWHLGELVWCTKVAE	SEC. N° ID.: 108	4nM

Ejemplo 2

Comparativo

5 *Construcción de Fabs anti-VEGF etiquetados con ligandos peptídico de IgG-Fc*

Los ligandos peptídicos de IgG-Fc pueden combinarse con un compuesto bioactivo para formar una molécula híbrida que comprende un dominio de ligando peptídico y un dominio activo. En este ejemplo, los ligandos peptídicos de IgG-Fc se combinan con un fragmento Fab que reconoce el VEGF humano. Con anterioridad, se había identificado, humanizado, y optimizado mediante exhibición sobre fago, un anticuerpo neutralizador contra el VEGF humano, a partir de un hibridoma de ratón. Ver Muller *et al.*, *Structure*, 6:1153-1167 (1998); Chen *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 293:865-881 (1999); y la Publicación de Patente Internacional N° WO 98/45331. Se escogieron dos formas Fab de este anticuerpo para ensayar si la afinidad de unión una IgG irrelevante podía añadirse a los Fab sin alterar su afinidad de unión por el antígeno. Se usó un ligando peptídico de IgG-Fc, DCAWHLGELVWCT (SEC. N° ID.: 8), identificado y optimizador mediante el procedimiento de exhibición sobre fago descrito en el Ejemplo 1, junto con un engarce peptídico corto (Gly-Gly-Gly) para proporcionar flexibilidad entre el péptido y el Fab. Se escogió la cadena ligera del Fab para las fusiones porque en el caso de este anticuerpo, se sabe que la cadena ligera tiene poca contribución a la unión al antígeno (Muller *et al.*, 1998, ver más arriba). En principio, el dominio del ligando peptídico podría funcionar para introducir la unión de IgG, tanto si se introduce en el extremo N-terminal, en el C-terminal, o si se inserta dentro de la secuencia original del Fab. En la presente invención se describen fusiones N-terminales DCAWHLGELVWCTGGG- (cadena ligera) (SEC. N° ID.: 109) así como fusiones C-terminales (cadena ligera)-GGGWEADCAWHLGELVWCT (SEC. N° ID.: 110).

Se diseñó y sintetizó un oligonucleótido, HL-569, para la mutación de los plásmidos anti-VEGF para crear fusiones del ligando peptídico de la IgG-Fc al extremo N-terminal de la cadena ligera del anticuerpo. La secuencia de HL-569 (con la secuencia del péptido añadido subrayada) es: 5'-ACA AAC GCG TAC GCT GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC GGA GGA GGA GAT ATC CAG TTG ACC-3' (SEC. N° ID.: 111). El codón GAC sigue a la secuencia señalizadora de secreción STII en el extremo N-terminal de la cadena ligera, y el codón GAT corresponde al primer residuo de la cadena ligera madura (del tipo salvaje).

Se diseñó y sintetizó otro oligonucleótido, HL-570, para la construcción de fusiones de ligando peptídico al extremo C-terminal de la cadena ligera del anticuerpo. La secuencia de HL-569 (con la secuencia del péptido añadido subrayada) es: 5'-AAC AGG GGA GAG TGT GGA GGA GGA TGG GAA GCA GAC TGC GCT TGG CAC CTG GGC GAG CTG GTC TGG TGC ACC TAA GCT GAT CCT CTA C-3' (SEC. N° ID.: 112). El codón TGT que precede al codón GGA subrayado corresponde al residuo Cys-214 de la cadena ligera, y el "codón de paro" TAA marca el final de la secuencia peptídica traducida. Los fagómidos pY0192 y pY0317 (descritos en Muller *et al.*, 1998, ver más arriba; Chen *et al.*, 1999; y en la Publicación de Patente Internacional N° WO 98/45331, que codifican respectivamente las formas de baja afinidad y elevada afinidad de un anticuerpo anti-VEGF humanizado, se mutaron con cada uno de los dos oligos del péptido-IgG para proporcionar las construcciones pY0192-569, pY0192-570, pY0317-569, y pY0317-570.

Ejemplo 3

45 Comparativo

Análisis mediante Fagos-ELISA de moléculas híbridas que comprenden Fab anti-VEGF etiquetados con ligando peptídico

Se usó un ensayo de unión competitiva de fagos-ELISA (Lowman, *Methods Mol. Biol.*, 87:249-264 (1998)) para comparar las afinidades de unión aparentes de las variantes del anticuerpo anti-VEGF etiquetadas con un ligando peptídico de IgG-Fc en sus extremos N-terminal o C-terminal, y exhibidas de forma monovalente sobre particular de bacteriófago M13 como fusiones al dominio C-terminal de la proteína del gen III.

Una IgG humanizada e irrelevante 4D5-IgG, también conocida como Herceptin[®], se depositó sobre placas de inmunosorción Nunc Maxisorp a 2 microgramos/ml en solución salina tamponada con fosfato (PBS). Las partículas de fagómido procedentes de cultivos de una noche de XL-1 Blue *E. coli* (Stratagene) se diluyeron en PBS que contenía un 0,5% de albúmina de suero bovino y 0,05% de Tween-20. Las partículas de fagómido se mezclaron con diluciones en serie de Herceptin[®] en solución, se equilibraron durante 20 minutos en una placa no adsorbente (Nunc F96), a continuación se transfirieron a la placa Maxisorp recubierta con Herceptin[®] para la detección de los fagos no unidos. Transcurridos 20 minutos, se lavó la placa con PBS/Tween, y se reveló con un conjugado de anticuerpo monoclonal anti-fagos y HRP (Pharmacia) y sustrato OPD (Sigma). Las curvas de desplazamiento (Fig. 1) mostraron valores de IC₅₀ de aproximadamente 100-300 nM para cada uno de los constructores, pY0192-569, pY0192-570, pY0317-569, y pY0317-570.

65

Ejemplo 4

Comparativo

5 *Análisis mediante BIAcore™ de la unión de IgG a Fab anti-VEGF etiquetado con un ligando peptídico de IgG-Fc*

Se usó un instrumento de resonancia plasmon de superficie (BIAcore, Inc., Piscataway, N.J.) para medir la unión de una IgG irrelevante, 4D5-IgG, también conocida como Herceptin®, al Fab que previamente se había unido a un chip biosensor inmovilizado.

10

Las variantes de Fab codificadas por pY0317 y pY0317-570 (anti-VEGF de elevada afinidad de control, Fab humanizado, y anti-VEGF de elevada afinidad, Fab humanizado etiquetado con un dominio de ligando peptídico de IgG-Fc, respectivamente; ver Ejemplo 2, más arriba, y WO 98/45331) se expresaron en *E. coli* y se purificaron mediante cromatografía de afinidad con Protein-G (Pharmacia). El VEGF humano recombinante se inmovilizó sobre chips biosensores BIAcore™ CM-5 (BIAcore, Inc.) tal y como se ha descrito (Muller *et al.*, 1998, ver más arriba). Después de la inmovilización del VEGF, se bloqueó el chip con etanolamina, y se inyectó el ligando peptídico etiquetado con el Fab Y0317-570, o con el control Y0317, en tampón PBS que contenía un 0,05% de Tween-20 y un 0,01% de azida sódica. A continuación de la inyección de Fab, se inyectó la Herceptin®, y se observó la constante de velocidad de disociación (k_{off}) después de la inyección.

20

Los resultados (Fig. 2) muestran que la Herceptin® se unió al Fab etiquetado pero no la Fab Y0317 control. Usando un modelo de unión de Langmuir de 1:1 (Karlsson *et al.*, (1991), *J. Immunol. Methods*, 145:229-240 (1991)), se calcularon para el Y0317-570 una k_{off} de $2,8 \times 10^{-3}$, sec^{-1} , y una correspondiente vida media de disociación ($t_{1/2}$) de 8,5 minutos. Las limitaciones del material impidieron unas determinaciones fiables de la constante de velocidad de asociación. Sin embargo, la k_{off} observada sugiere una afinidad de unión en equilibrio, K_d , de 30 nM a 300 nM (asumiendo una k_{on} de 10^4 - 10^5 $\text{M}^{-1} \text{sec}^{-1}$), consistente con los resultados de unión del péptido y de fagos-ELISA (ver más arriba). De forma notable, los resultados de BIAcore™ (Fig 2) muestran también que el Fab etiquetado puede unir simultáneamente ambos antígenos (VEGF inmovilizado) y una IgG irrelevante.

25

30 Ejemplo 5

Comparativo

35 *Los Fab anti-VEGF etiquetados con ligando peptídico de IgG-Fc tienen tiempos medios de eliminación prolongados*

35

Las velocidades de eliminación de la sangre y la distribución del Fab anti-VEGF etiquetados con ligando peptídico de IgG-Fc (Fab-Y0317-570) se comparan con las del Fab Y0317 anti-VEGF control no etiquetado. Las determinaciones del tiempo medio de eliminación y del volumen de distribución se hicieron en conejos blancos New Zealand de 2,8 a 3 kg de peso. La cantidad de artículo de ensayo presente en las muestras de plasma se determinó usando cualquier procedimiento conocido en el estado de la técnica, tales como, por ejemplo, ELISA o RIA.

40

El análisis farmacocinético se realizó usando las concentraciones del artículo de ensayo en plasma. Los datos en plasma promedios por grupo para cada artículo de ensayo se ajustan a un perfil multiexponencial cuando se representaron frente al tiempo posterior a la dosificación. Los datos se ajustan usando un modelo de dos compartimentos estándar con entrada en embolada y constantes de velocidad de primer orden para las fases de distribución y eliminación. La ecuación general para el mejor ajuste de los datos para la administración i.v. es: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, en donde $c(t)$ en la concentración en plasma en el instante t , A y B son las intersecciones con el eje-Y, y α y β son respectivamente las constantes de velocidad de primer orden aparentes para las fases de distribución y eliminación. La fase α es la fase inicial de la eliminación y refleja la distribución de la proteína en todos los fluidos extracelulares del animal, mientras que la segunda parte o fase β de la curva representa la verdadera eliminación del plasma. Los procedimientos para ajustar tales ecuaciones son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, y α y β (para $\alpha > \beta$) son las raíces de las ecuación cuadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ usando los parámetros estimados de V = volumen de distribución, k_{10} = velocidad de eliminación, k_{12} = velocidad de transferencia desde el compartimento 1 al compartimento 2 y k_{21} = velocidad de transferencia desde el compartimento 2 al compartimento 1, y D = la dosis de administración.

45

50

La mañana del día del estudio, seis conejos blancos New Zealand (peso corporal 2,8-3,0 kg) se colocaron en dispositivos de inmovilización. Se instalaron catéteres en una arteria de la oreja para la recogida de muestras de la sangre y en una vena de la oreja contralateral para la dosificación.

60

Los conejos se dividieron en dos grupos ($n = 3/\text{grupo}$). Los animales del Grupo 1 recibieron una embolada IV de Fab-Y0317 anti-VEGF control. Los conejos en el Grupo 2 recibieron Fab-Y0317-570. En la tabla siguiente se presenta un resumen de las asignaciones a los grupos e información sobre las dosis.

65

ES 2 270 893 T3

	Grupo	Peso (kg)	Grupo de la Dosis	Dosis Nominal (mg/kg)	Conc. de la Dosis (mg/mL)	Vol. de la Dosis (mL)
5	1	2,9	Control-Fab-Y0317	1	3	0,97
	1	3,0	Control-Fab-Y0317	1	3	1,00
	1	2,9	Control-Fab-Y0317	1	3	0,97
10	2	2,8	Fab-Y0317-5701		3	0,93
	2	3,0	Fab-Y0317-5701		3	1,00
	2	2,9	Fab-Y0317-5701		3	0,97

Se recogieron muestras de sangre en serie (0,5 ml) justo antes de la dosificación y a los 10, 20 y 40 minutos, y a 1, 2, 3, 4, 6, 8, 24 y 48 horas después de la administración de la dosis. La sangre se recolectó en tubos separadores de suero, se dejó coagular (~30 minutos) a temperatura ambiente, y se centrifugó. El suero se recolectó y almacenó inmediatamente a -70°C hasta que se analizó.

Se recubrieron placas de ELISA con 0,5 microgramos/ml de VEGF en tampón carbonato 50 mM, pH 9,6, a 4°C, durante la noche, y se bloquearon con 0,5% de albúmina de suero bovino, 10 ppm de Proclin 300 (Supelco, Bellefonte, PA) en PBS (Na₂HPO₄ 8 mM, KH₂PO₄ 1,5 mM, KCl 2,7 mM y NaCl 137 mM, pH 7,2) a temperatura ambiente durante 1 hora. Los estándares (0,41-100 ng/ml) y las diluciones en serie a la mitad de las muestras (dilución mínima de 1:100) en PBS contenían un 0,5% de albúmina de suero bovino, 0,05% de polisorbato 20, 0,25% de CHAPS, 0,2% de gammaglobulinas bovinas (Sigma, St. Louis, MO) y EDTA 5 mM, se incubaron sobre las placas durante 2 horas. El anticuerpo unido se detectó usando F(ab')₂ de cabra anti-IgG F(ab')₂ humana (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA), seguido por 3,3',5,5'-tetrametil bencidina (Kirkegaard & Perry Laboratories) como sustrato. Las placas se lavaron entre pasos. La absorbancia se leyó a 450 nm en un lector apilador Titerek (ICN, Costa Mesa, CA). La curva estándar se ajustó usando una programa de ajuste de curvas con cuatro parámetros mediante regresión (Kaleidagraph, Synergy Software, Reading, PA). Los puntos experimentales que se hallan en el rango de la curva estándar se usaron para el cálculo de las concentraciones de Fab en las muestras.

Análisis de los datos: las gráficas de la concentración frente a los perfiles temporales se prepararon usando Kaleidagraph (Kaleidagraph™ V. 3.09, Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, PA.). Los valores descritos como menos que notificables (LTR) no se incluyeron en el análisis PK y no se representan gráficamente. Los parámetros de farmacocinética se determinaron mediante análisis de compartimentos usando el programa WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™, Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA.). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon como está descrito en otros sitios (Ritschel WA y Kearns GL., *Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications*, 5ª edición. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. Copyright 1999).

Los resultados se muestran en la Figura 3. Se usó un modelo de dos compartimentos con entrada en embolada y salida de primer orden (WinNonlin) para el ajuste a la concentración en suero respecto los datos temporales. Los parámetros farmacocinéticos calculados se presentan en la tabla siguiente.

Resumen de los Parámetros Farmacocinéticos (Embolada IV; 1 mg/kg)

Parámetro	Grupo 1 Control Fab-Y0317	Grupo 2 Fab-Y0317-5701
AUC (h*µg/mL)	13,6 ± 1,2	215 ± 56
Cmax (µg/mL)	15,6 ± 0,6	13 ± 0,7
CL (mL/h/kg)	74,2 ± 6,7	4,8 ± 1,1
K10 vida media (hr)	0,6 ± 0,02	11,3 ± 3,6
alpha vida media (hr)	0,39 ± 0,03	1,15 ± 0,31
beta vida media (hr)	1,93 ± 0,27	37,6 ± 19
VI (mL/kg)	64,1 ± 2,37	75,2 ± 4,23
Vss (mL/kg)	112 ± 7,7	225 ± 54

El volumen inicial de distribución (V1) para ambos agentes fue aproximadamente igual al volumen de suero. El volumen estimado de distribución en el estado estacionario (Vss) para Fab-Y0317-570 (225 ml/kg) fue aproximadamente 2 veces superior al estimado para el Fab control (112 mL/kg), sugiriendo una cantidad significativa de unión a la IgG endógena. El Fab-Y0317 de control se eliminó del suero aproximadamente 15 veces más rápido (eliminación = 74 ml/h/kg) en comparación con el Fab-Y0317-570 (4,8 ml/h/d). La exposición conjunta (AUC) del Fab-Y0317-570 fue ~16 veces mayor que para el Fab-Y0317. El Fab-Y0317 fue indetectable en el suero 24 horas después de la dosifi-

ES 2 270 893 T3

cación, pero las concentraciones de Fab-Y0317-570 en suero eran todavía superiores a 1 $\mu\text{g/ml}$ 48 horas después de la dosificación. Tanto la vida media de la distribución (alfa) (1,15 h) como la vida media de la eliminación (beta) (37,6 h) eran significativamente más largas que las del Fab de control.

- 5 Estos resultados sugieren que la adición de un péptido de 13 aminoácidos que une la IgG endógena al Fab-Y0317 puede retrasar significativamente la eliminación del Fab, incrementar la vida media y potenciar la exposición global.

Ejemplo 6

10 *Ligandos peptídicos de albúmina de suero*

Las bibliotecas de fagos y las condiciones de selección de las bibliotecas de péptidos exhibidos sobre fagos se seleccionaron frente a la albúmina de conejo, rata y humana. Las bibliotecas de fagos que expresaban secuencias peptídicas aleatorias fusionadas al gen 8 (Lowman *et al.*, *Biochem.*, 37:8870 (1998)) se juntaron en 5 conjuntos: el
15 Conjunto A contenía $\text{CX}_2\text{GPX}_4\text{C}$ (SEC. N° ID.: 133), $\text{X}_4\text{CX}_2\text{GPX}_4\text{CX}_4$ (SEC. N° ID.: 134) y $\text{X}_j\text{CX}_j\text{CX}_k$ SEC. N° ID.: 135, en donde $j = 8-10$; el Conjunto B contenía X_{20} y $\text{X}_i\text{CX}_j\text{CX}_k$, en donde $j = 4-7$; el Conjunto C contenía X_8 y $\text{X}_2\text{CX}_j\text{CX}_2$, en donde $j = 4-6$; el Conjunto D contenía $\text{X}_2\text{CX}_j\text{CX}_2$, en donde $j = 7-10$; el Conjunto E contenía $\text{CX}_5\text{CX}_6\text{CCX}_3\text{CX}_6\text{C}$ (SEC. N° ID.: 135), $\text{CCX}_3\text{CX}_6\text{C}$ (SEC. N° ID.: 136), $\text{CCX}_5\text{CX}_4\text{CX}_4\text{CC}$ (SEC. N° ID.: 137), $\text{CXCX}_7\text{CX}_3\text{CX}_6$ (SEC. N° ID.: 138), en donde X representa cualquiera de los 20 L-aminoácidos que ocurren de forma
20 natural. En cada caso $i + j + k = 18$ y $|i - k| < 2$. Cada una de las 10 bibliotecas contenía más de 108 clones.

Los conjuntos de bibliotecas de fagos se suspendieron en tampón de unión (PBS, 1% de ovalbúmina, 0,005% de Tween 20) y se clasificaron frente a albúmina de conejo, rata o humana inmovilizada directamente sobre placas Maxisorp (10 $\mu\text{g/ml}$ en PBS, durante la noche, a 4°C; las placas se bloquearon con Blocker Casein (Pierce Chemical, Rockford, IL)). Transcurridas 2 horas, los fagos no unidos se retiraron mediante lavados repetidos (PBS, 0,05% de Tween 20) y los fagos unidos se eluyeron con KCl 500 mM, HCl 10 mM, pH = 2. Los fagos eluidos se propagaron en células XG1-Blue con el fago auxiliar VCSM13 (Stratagene, La Jolla, CA). El enriquecimiento se monitorizó valorando el número de fagos que se unían a un pocillo recubierto con albúmina comparado con el de un pocillo recubierto con ovoalbúmina o caseína.
25

30 ELISA de fagos --- Los clones de fagos ($\sim 10^{11}$ fagos) se añadieron a placas recubiertas con albúmina de rata, conejo o humana. La placa de microvaloración se lavó con tampón de lavado y los fagos unidos se detectaron con el conjugado HRP/anti-M13. La cantidad de HRP unida se midió usando sustrato ABTS/ H_2O_2 y monitorizando el cambio a 405 nm.

35 Las secuencias de péptidos exhibidas por los clones de fagos seleccionados por su unión a la albúmina de conejo, humana o de rata se muestran en la Figura 4. También se indica la capacidad de los clones individuales de fagos para unirse a las 3 especies de albúmina inmovilizada. Esto se ensayó usando un ELISA de fagos. Hay que destacar que el clon RB, seleccionado por la unión a la albúmina de rata, es capaz también de unir la albúmina humana y de conejo.
40

Maduración de la secuencia sobre fagos monovalentes --- Se diseñaron bibliotecas parcialmente aleatorizadas usando oligonucleótidos que codifican cada uno de los clones seleccionados en la Figura 4, pero sintetizados con una mezcla de bases 70-10-10-10 tal como se ha descrito (Derinis *et al.*, *Nature*, 404, 465 (2000)). Aunque la diversidad potencial de estas bibliotecas es la misma que la de las bibliotecas ingenuas iniciales, cada biblioteca "aleatorizada suavemente" mantiene un sesgo hacia la secuencia seleccionada en la Figura 4. Cada biblioteca se seleccionó de nuevo en función de la unión a albúmina de rata, conejo o humana, con independencia de su origen. Por ejemplo, la biblioteca resultante de la aleatorización suave del clon RB se seleccionó frente a la albúmina de rata, conejo o humana, aunque originalmente se identificara en función de la unión a la albúmina de rata. Las secuencias identificadas a continuación de una aleatorización suave se muestran en la Figura junto con su especificidad por especie tal como se determinó mediante ELISA con fagos. La mayoría de los clones parecen ser específicos para las especies de albúmina para las que se seleccionan, sin embargo, los clones procedentes de la biblioteca de aleatorización se unen a las tres especies.
45
50

Los clones de fagos se ensayaron también en función de la unión a la albúmina de rhesus, ratón y bovina. Se halló que los clones que se originaban a partir de la biblioteca de aleatorización suave RB se unían también a cada una estas especies de albúmina, y que eran específicos para la albúmina en base a su incapacidad para unirse a la ovoalbúmina y caseína (Figura 6). Los clones que se unen a múltiples especies de albúmina (unidores multi-especies) se listan en la Figura 7.
55

Aleatorización dura --- Las secuencias procedentes de la aleatorización suave de la secuencia RB se maduraron adicionalmente usando una estrategia de aleatorización dura. Se diseñó una nueva biblioteca que mantenía constantes (subrayados) los residuos altamente seleccionados $\text{X}_3\text{DXCLPXWGCLWX}_4$ (SEC. N° ID.: 366), mientras que aleatorizaba completamente las posiciones restantes. También se construyó una segunda biblioteca, un residuo más corta en ambos extremos N- y C-terminales: Las secuencias procedentes de estas bibliotecas seleccionadas contra la albúmina de rata, conejo y humana se muestran respectivamente en las Figura 8A, 8B y 8C.
60
65

Síntesis de péptidos --- Los péptidos se sintetizaron mediante síntesis en fase sólida basada en Fmoc, tanto manual como automatizada (Milligen 9050), en una escala de 0,25 mmoles usando una resina PEG-poliestireno (Bodanszky M., *Principles of Peptide Synthesis*, (1984), Springer, Berlin). Se retiraron los grupos protectores de la cadena lateral

ES 2 270 893 T3

y los péptidos se separaron de la resina con ácido trifluoroacético (TFA) al 95% y triisopropilsilano al 5%. Se añadió una solución de yodo saturada en ácido acético para la oxidación de los enlaces disulfuro. Los péptidos se purificaron mediante HPLC en fase inversa usando un gradiente de agua/acetonitrilo que contenía TFA al 0,1%. Los péptidos eran >95% puros mediante HPLC analítica, y su identidad se verificó mediante espectrometría de masas.

5

La lisina carboxi terminal del péptido SA08 se derivó con NHS-LC-biotina (Pierce Chemical, Rockford, IL) y se purificó mediante HPLC tal y como más arriba, rindiendo SA08b (Ac-QGLIGDICLPRWGCLWGDSVKb (SEC. N° ID.: 124)-n en donde Kb se refiere a lisina-biotina).

10

Ensayo de unión de SA08b --- La albúmina de conejo, rata o ratón se inmovilizó directamente se inmovilizó directamente sobre placas Maxisorp a 10 µg/ml en PBS, durante la noche, a 4°C. Las placas se bloquearon usando Blocker Casein (Pierce Chemical, Rockford, IL) durante 1 hora, a 25°C. Se suspendieron en tampón de unión (ver más arriba) muestras diluidas en serie, y se añadieron a la placa seguidas por la adición de SA08b 10 nM durante 1 hora, a 25°C. La placa de microvaloración se lavó con PBS, 0,05% de Tween 20, y el SA08b unido a la albúmina se detectó con estreptavidina/HRP. La cantidad de HRP unida se midió usando el sustrato ABTS/H₂O₂ y monitorizando el cambio a 405 nm.

15

Se sintetizaron los péptidos correspondientes a secuencias de fago identificadas y se midió su afinidad por la albúmina de rata, conejo o ratón usando el ensayo de unión de SA08b (Figuras 9 y 10).

20

Construcción, expresión y purificación de las fusiones de Fab que unen la albúmina --- Con objeto de ensayar si la asociación con albúmina podía incrementar la vida media de las proteínas y péptidos *in vivo*, la secuencia del SA06 se fusionó a un fragmento Fab (D3H44) dirigido hacia la unión al factor de tejido (TF). La secuencia SA06 se añadió al extremo carboxilo de la cadena ligera (D3H44-L) o de la cadena pesada (D3H44-Ls) del Fab. Además, como una precaución frente a problemas de plegado, se prepararon construcciones similares pero con el disulfuro dentro de cadena remplazado por alaninas (D3H44-Ls y D3H44-Hs, respectivamente) tal y como se ilustra en la Figura 11.

25

Las fusiones se expresaron bajo control del promotor de la fosfatasa alcalina y se secretaron a partir de *E. coli* usando la señal de secreción STII. Las fusiones de Fab se recuperaron del periplasma suspendiendo las células en EDTA 1 mM, Tris-HCl 10 mM, pH = 8, durante 1 hora a 4°C. Los restos celulares se retiraron mediante centrifugación y el Fab anti-TF se purificó selectivamente usando una columna de afinidad Hi-Trap para TF (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). El D3H44-L o D3H44-Ls correctamente plegado se purificó adicionalmente usando una columna de afinidad de albúmina de conejo (albúmina de conejo acoplada a Sepharose 4B activada con CNBr⁻, Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, NJ). Ambas columnas se lavaron con PBS y se eluyeron con HCl 50 mM. Las fracciones eluidas se neutralizaron con Tris 1 M, pH = 8. La endotoxina se eliminó adicionalmente a continuación de la extracción con Triton X114 (Aida y Pabst, *J. Immunol. Methods*, 132:191 (1990)).

30

Las fusiones D3H44 purificadas retuvieron su capacidad para unir el TF según se midió usando un ensayo temporal con protrombina que mide la prolongación de la coagulación dependiente del factor de tejido (Figura 13) (para procedimientos consultar Dennis *et al.*, *Nature*, 404:465 (2000)). A diferencia del D3H44 que carece de la secuencia de unión a la albúmina (WT), ambos, el D3H44-L y el D3H44-Ls son capaces de unirse a la albúmina según se midió en el ensayo de unión de SA08b (Figura 14). Además, ambas fusiones de D3H44 y péptido unidor de la albúmina son capaces de unir el TF y la albúmina simultáneamente, según se dedujo mediante un ensayo de unión de biotina-TF (Figura 15). En este ensayo, la unión de las fusiones de D3H44 a la albúmina inmovilizada se detectan con TF biotinilado. El D3H44 del tipo salvaje (WT) es incapaz de unir la albúmina y por tanto no genera una señal a partir de la adición de TF biotinilado.

35

Farmacocinética de las fusiones de D3H44 y péptido unidor de albúmina --- Las variantes de D3H44 se administraron como un bolo de 0,5 mg/kg en conejos. Cada grupo consistía en 3 conejos (5 en el grupo del F(ab')₂). Las muestras de suero tomadas en los instantes temporales indicados se diluyeron en serie y la concentración de D3H44 se determinó usando un ELISA de unión a TF.

40

El análisis farmacocinético se realizó usando las concentraciones del artículo de ensayo en plasma. Los datos en plasma promedios por grupo para cada artículo de ensayo se ajustan a un perfil multiexponencial cuando se representaron frente al tiempo posterior a la dosificación. Los datos se ajustan usando un modelo de dos compartimentos estándar con entrada en embolada y constantes de velocidad de primer orden para las fases de distribución y eliminación. La ecuación general para el mejor ajuste de los datos para la administración i.v. es: $c(t) = Ae^{-\alpha t} + Be^{-\beta t}$, en donde $c(t)$ es la concentración en plasma en el instante t , A y B son las intersecciones con el eje-Y, y α y β son respectivamente las constantes de velocidad de primer orden aparentes para las fases de distribución y eliminación. La fase α es la fase inicial de la eliminación y refleja la distribución de la proteína en todos los fluidos extracelulares del animal, mientras que la segunda parte o fase β de la curva representa la verdadera eliminación del plasma. Los procedimientos para ajustar tales ecuaciones son bien conocidos en el estado de la técnica. Por ejemplo, $A = D/V(\alpha - k_{21})/(\alpha - \beta)$, $B = D/V(\beta - k_{21})/(\alpha - \beta)$, y α y β (para $\alpha > \beta$) son las raíces de la ecuación cuadrática: $r^2 + (k_{12} + k_{21} + k_{10})r + k_{21}k_{10} = 0$ usando los parámetros estimados de V = volumen de distribución, k_{10} = velocidad de eliminación, k_{12} = velocidad de transferencia desde el compartimento 1 al compartimento 2 y k_{21} = velocidad de transferencia desde el compartimento 2 al compartimento 1, y D = la dosis de administración.

45

50

55

ES 2 270 893 T3

Análisis de los datos: las gráficas de la concentración frente a los perfiles temporales se prepararon usando KaleidaGraph (KaleidaGraph™ V. 3.09, Copyright 1986-1997. Synergy Software. Reading, PA.). Los valores descritos como menos que notificables (LTR) no se incluyeron en el análisis PK y no se representan gráficamente. Los parámetros de farmacocinética se determinaron mediante análisis de compartimentos usando el programa WinNonlin (WinNonlin® Professional V. 3.1 WinNonlin™, Copyright 1998-1999. Pharsight Corporation. Mountain View, CA.). Los parámetros farmacocinéticos se calcularon como está descrito en otros sitios (Ritschel WA y Kearns GL., *Handbook of basic pharmacokinetics including clinical applications*, 5ª edición. American Pharmaceutical Assoc., Washington, DC. Copyright 1999).

La fusión del péptido unidor de la albúmina a la D3H44 resulta en una proteína que tiene parámetros farmacocinéticos mejorados (Figuras 16 y 17). La D3H44-L experimenta un incremento de 70 veces en su vida media (K10-HL) en relación al Fab del tipo salvaje, y una vida media comparable a la del Fab D3H44 derivado con polietilenglicol 20K ó 40K (PEG).

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 270 893 T3

REIVINDICACIONES

- 5 1. Ligando peptídico que comprende una secuencia de aminoácidos Asp-Xaa-Cys-Leu-Pro-Xaa-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEC. N° ID.: 116) que se une a la albúmina de suero, en donde Xaa es cualquier aminoácido.
2. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp (SEC. N° ID.: 120).
- 10 3. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp (SEC. N° ID.: 121).
4. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe (SEC. N° ID.: 122).
- 15 5. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val (SEC. N° ID.: 123).
- 20 6. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Gln-Gly-Leu-Ile-Gly-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Gly-Asp-Ser-Val-Lys (SEC. N° ID.: 124).
7. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 125).
- 25 8. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 126).
9. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp (SEC. N° ID.: 127).
- 30 10. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos es cualquier secuencia seleccionada de entre el grupo consistente en:

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
207	NRQMEDICLPQWGCLWGDDF
208	QRHPEDICLPRWGCLWGDDD
209	DFDLCLPDWGCLWDD
210	DICLERWGCLW
211	DICLPAWGCLW
212	DICLPDWGCLW
213	DICLPEWGCLW
214	DICLPVWGCLW
215	DLCLPEWGCLW
216	DLCLPKWGCLW
217	DLCLPVWGCLW
223	EEDLCLPVWGCLWGA
224	EEDVCLPVWGCLWEG

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	225 EFDLCLPTWGCLWED
	226 ERQMEDFCLPQWGCLWGDGV
10	227 ERQMVDFCLPKWGCLWGDGF
	228 EWDVCFPAWGCLWDQ
15	229 EWDVCLPHWGCLWDG
	230 FEDFCLPNWGCLWGS
20	231 FEDLCVVRWGCLWGD
	232 GRQVDFCLPKWGCLWEEGL
25	233 KMGRVDFCLPKWGCLWGDEL
	234 KSRMGDFCLPEWGCLWGDEL
30	235 LRIFEDICLPKWGCLWGEGF
	237 MDDLCLPNWGCLWGD
35	238 MFDLCLPKWGCLWGN
	242 QGDFWDICLPRWGCLS GEGY
40	243 QGGMGDFCLPQWGCLWGEDL
	244 QGYMDFCLPRWGCLWGDAN
45	245 QMHMDICLPKWGCLWGDTS
	246 QMQMSDFCLPQWGCLWGDGY
50	247 QRHMMDFCLPKWGCLWGDGY
	249 QRPIMDFCLPKWGCLWEDGF
55	250 QRQIMDFCLPHWGCLWGDGF
	251 QRQVDFCLPQWGCLWGDGS
60	252 QSQLEDFCLPKWGCLWGDGF
	253 QSYMEDICLPRWGCLSDDAS
65	254 RWQTEDVCLPKWGCLFGDGV
	255 SEDFCLPVWGCLWED

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
256	VWDLCLPQWGCLWDE
263	LWAMEDICLPKWGCLWEDDF
264	QRDMGDICLPRWGCLWEDGV
265	QRLMEDICLPRWGCLWGDRF
266	QWHMEDICLPQWGCLWGDVL
268	QWQVMDICLPRWGCLWADEY
269	DICLPRWGCLW
270	AAQVGDICLPRWGCLWSEYA
271	AGWAADVCLPRWGCLWEEDV
272	ALFEDVCLPVWGCLWGGE
273	AQAMGDICLPRWGCLWEAEI
274	ASDPGDVCLPRWGCLWGESF
275	ASDRGDLCLPYWGCLWGPDG
276	ASEWDVCLPTWGCLWMEG
277	ASNWEDVCLPRWGCLWGERN
278	ASTPRDICLPRWGCLWSEDA
279	ASVDDICLPPWGCLWGEDI
280	ATMEDDICLPRWGCLWGAEI
281	AYSADICLPRWGCLWMSE
282	DEDFEDYCLPPWGCLWGSSM
283	DGEEGDLCLPRWGCLWALEH
284	EDWEDICLPQWGCLWEGM
285	EDWTDLCLPAWGCLWDTE
286	EEDSDICLPRWGCLWNTS
287	EGEEVDICLPQWGCLWGYPV
288	EGTWDDFCLPRWGCLWLGER

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	289 EGYWDLCLPRWGCLWELE
	290 ELGEDLCLPRWGCLWGSE
10	291 ERWEGDVCLPRWGCLWGESG
	292 ETWSDVCLPRWGCLWGAS
15	293 EVGDLDLCLPRWGCLWGNDK
	294 FRDGEDFCLPQWGCLWADTS
20	295 GDMVNDLCLPRWGCLWGSEN
	296 GDWMHDICLPKWGCLWDEKA
25	297 GDYVDLCLPGWGCLWEDG
	298 GIEWGDTCLPKWGCLWRVEG
30	299 GQQGEDVCLPVWGCLWDTSS
	300 GRMGTDLCLPRWGCLWGEVE
35	301 GRYPMDLCLPRWGCLWEDSA
	302 GSAGDDLCLPRWGCLWERGA
40	303 GVLDDICLPRWGCLWGPK
	304 HASDWDVCLPGWGCLWEEDD
45	305 HEWERDICLPRWGCLWRDGD
	306 HMMDDVCLPGWGCLWASE
50	307 IDYTDLCLPAWGCLWELE
	308 IEHEDLCLPRWGCLWAVD
55	309 ISEWDLCLPRWGCLWDRS
	310 ISWADVCLPKWGCLWGKD
60	311 ISWGDLCPLPRWGCLWEGS
	312 KKVSGDICLPIWGCLWDNDY
65	313 KLWDDICLPRWGCLWSPL
	314 LAWPDVCLPRWGCLWGGM

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	315 LGVTHDTCLPRWGCLWDEVG
	316 LLESDDICLPRWGCLWHEDG
10	317 LNESDICLPTWGCLWGVD
	318 LPEQDVCLPVWGCLWDAN
15	319 LVWEEDFCLPKWGCLWGAED
	320 MAWGDVCLPRWGCLWAGG
20	321 MQAESDFCLPHWGCLWDEGT
	322 MQGPLDICLPRWGCLWGGVD
25	323 NEEWDVCLPRWGCLWGGV
	324 NVGWNDICLPRWGCLWAQES
30	325 QELQDFCLPRWGCLWGVG
	326 QGVEWDVCLPQWGCLWTREV
35	327 QMPLEDICLPRWGCLWEGRE
	328 QREWDVCLPRWGCLWSDV
40	329 QRFWDTCLPRWGCLWGGD
	330 REEWGDLCLPTWGCLWETKK
45	331 RLDAWDICLPQWGCLWEEPS
	332 RVFTDVCLPRWGCLWDLG
50	333 RVWTEDEVCLPRWGCLWSEGN
	334 SEAPGDYCLPRWGCLWAQEK
55	335 SGWDDVCLPVWGCLWGPS
	336 SIREYDVCLPKWGCLWEPSA
60	337 SPTEWDMCLPKWGCLWGDAL
	338 SSASDYCLPRWGCLWGDL
65	339 SSGLEDICLPNWGCLWADGS
	340 SVGWGDICLPVWGCLWEGEG

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	341 SWQGDICLPRWGCLWGVD
	342 SYETDVCLPYWGCLWEDA
10	343 SYWGDVCLPRWGCLWSEA
	344 TAMDEDVCLPRWGCLWGSGS
15	345 TEENWDLCLPRWGCLWGDDW
	346 TEIGQDFCLPRWGCLWVPGT
20	347 TLEWDMCLPRWGCLWTEQ
	348 TLGWPDFCLPKWGCLWRES
25	349 TLSNQDICLPGWGCLWGGIN
	350 TSGSDDICLPVWGCLWGEDS
30	351 TSTGGDLCLPRWGCLWDSSE
	352 TWP-GDLCLPRWGCLWEAES
35	353 VGEFDICLPRWGCLWDAE
	354 VSEMDDICLPLWGCLWADAP
40	355 VSEWEDICLPSWGCLWETQD
	356 VTSWDVCLPRWGCLWEED
45	357 VVGDFCLPKWGCLWDQAR
	358 VVWDDDVCLPRWGCLWEEYG
50	359 WDHELDFCLPVWGCLWAEDV
	360 WLWEDLCLPKWGCLWEED
55	361 WSDSDDVCLPRWGCLWGNVA
	362 WTESEDICLPGWGCLWGPEV
60	363 WVEEGDICLPRWGCLWESVE
	364 WVPFEDVCLPRWGCLWSSYQ
65	365 XXXDXCLPXWGCLWXXX
	366 XXXXXDXCLPXWGCLWXXXX

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
367	AFWSDICLPRWGCLWEED
368	AGLDEDICLPRWGCLWGKEA
369	AGMMGDICLPRWGCLWQGEP
370	APGDWDFCLPKWGCLWDDDA
371	AQLFDDICLPRWGCLWSDGY
372	ARTMGDICLPRWGCLWGASD
373	AVSWADICLPRWGCLWERAD
374	AWLDEDICLPKWGCLWNTGV
375	AWQDFDVCLPRWGCLWEPES
376	DTTWGDICLPRWGCLWSEEA
377	DWGRDICLPRWGCLWDEE
378	EAWGDICLPRWGCLWELE
379	EGFLGDICLPRWGCLWGHQA
380	EQWLHDICLPKWGCLWDDTD
381	ETGWPDICLPRWGCLWEEGE
382	FELGEDICLPRWGCLWEEHN
383	FITQDICLPRWGCLWGEN
384	FLWRDICLPRWGCLWSEG
385	FSLDEDICLPKWGCLWGAEK
386	FVHEDICLPRWGCLWGEG
387	GASLGDICLPRWGCLWGPEd
388	GDLGDDICLPRWGCLWDEYP
389	GEGWSDICLPRWGCLWAEDE
390	GEWWEDICLPRWGCLWGSSS
391	GLGDDICLPRWGCLWGRD
392	GLMGEDICLPRWGCLWKGDI

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	393 GMFDDICLPKWGCLWGLG
	394 GPGWDICLPRWGCLWGEE
10	395 GPWYDICLPRWGCLWDGV
	396 GSLESDICLPRWGCLWGIDE
15	397 GWDDDICLPRWGCLWGDG
	398 GWHDRDICLPRWGCLWEQND
	399 GWLEEDICLPKWGCLWGADN
20	400 HEQWDDICLPRWGCLWGGSY
	401 LEYEDICLPKWGCLWGGE
25	402 LILSDICLPRWGCLWDDT
	403 LKLEDICLPRWGCLWGES
30	404 LLDEDICLPRWGCLWGVR
	405 LLGGHDICLPRWGCLWGGDV
35	406 LLTRDICLPKWGCLWGSD
	407 LMSPDICLPKWGCLWEGD
40	408 LRWSDICLPRWGCLWEET
	409 LVLGDICLPRWGCLWESD
45	410 LYLRDICLPKWGCLWEAD
	411 MLSRDICLPRWGCLWEEE
50	412 MPWTDICLPRWGCLWSES
	413 MRWSSDICLPKWGCLWGDEE
55	414 NQYDDICLPRWGCLWDVE
	415 QDWEDICLPRWGCLWGD
	416 QFEWDDICLPRWGCLWEVEV
60	417 QGWWHDICLPRWGCLWEEGE
65	418 QRVDDICLPRWGCLWGENS

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
419	QSWPDICLPKWGCLWGEG
420	REGWPDICLPRWGCLWSETG
421	RELWGDICLPRWGCLWEHAT
422	RLELMDICLPRWGCLWDPQD
423	RLGSDICLPRWGCLWDYQ
424	RLGSDICLPRWGCLWGAG
425	SGVLGDICLPRWGCLWEEAG
426	SLGLTDLCLPRWGCLWEEEQ
427	SPWMDICLPRWGCLWESG
428	SSLEQDICLPRWGCLWGQDA
429	STFTDICLPRWGCLWELE
430	SVGWGDICLPKWGCLWAESD
431	SVLSDDICLPRWGCLWWDFS
432	SVLSDICLPRWGCLWEES
433	TLLQDICLPRWGCLWESD
434	TLMSNDICLPRWGCLWDEPK
435	TLVLDDICLPRWGCLWDMTD
436	TSLADDICLPRWGCLWSEDG
437	TSLDDICLPRWGCLWYEEG
438	TWFSDICLPRWGCLWEPG
439	TWQGEDICLPRWGCLWDTEV
440	VEMWHDICLPRWGCLWDSNA
441	VGVFDDICLPRWGCLWEQPV
442	VHQADICLPRWGCLWGDT
443	VLLGDICLPLWGCLWGED
444	VNWDICLPRWGCLWGES

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
5	445 VPAMGDICLPRWGCLWEARN
	446 VRLMDICLPRWGCLWGEE
10	447 VRWEDICLPRWGCLWGEE
	448 VSLGDDICLPKWGCLWEPEA
15	449 VVWSDICLPRWGCLWDKE
	450 VWIDRDICLPRWGCLWDTEN
20	451 VWYKDICLPRWGCLWEAE
	452 WDLASDICLPRWGCLWEEEA
25	453 WDVADICLPRWGCLWAED
	454 WDYGDICLPRWGCLWEEG
30	455 WEVQDICLPRWGCLWGDD
	456 WHMGDICLPRWGCLWSEV
35	457 WKDFDICLPRWGCLWDDH
	458 WLSDDICLPRWGCLWDDL
40	459 WLSEDICLPQWGCLWEES
	460 WLSEDICLPRWGCLWAAD
45	461 WRWNEDICLPRWGCLWEEEA
	462 YIWRDICLPRWGCLWEGE
50	463 YRDYDICLPRWGCLWDER
	464 AGEWDICLPRWGCLWDVE
55	465 EIRWDFCLPRWGCLWDED
	466 ESLGDICLPRWGCLWGSG
60	467 EVREWDICLPRWGCLWENWR
	468 EYWGDICLPRWGCLWDWQ
65	469 FGQEWNICLPRWGCLWGNEQ
	470 IWQLEDICLPRWGCLWEDGL

ES 2 270 893 T3

SEC. N° ID.:	SECUENCIA (X es un aminoácido)
471	KMWSDICLPRWGCLWEEE
472	MGTKDICLPRWGCLWAEA
473	MHEWDICLPRWGCLWESS
474	NTPTYDICLPRWGCLWGDVP
475	NWAENDICLPRWGCLWGDEN
476	QPVWSDICLPRWGCLWGEDH
477	RGLHDACLPWWGCLWAGS
478	RLFGDICLPRWGCLWQGE
479	SAREWDICLPTWGCLWEKDI
480	SGEWDICLPRWGCLWGEG
481	SMFFDHCLPMWGCLWAEQ
483	TLFQDICLPRWGCLWEES
484	VGEWDICLPNWGCLWERE
485	WFPKDRCLPVWGCLWERH
486	WGMARDWCLPMWGCLWRGGG
487	WHLTDDICLPRWGCLWGDEQ
488	WWMADRCLPLWGCLWRGD
489	WWVRDLCLPTWGCLWSGK
490	YFDGDICLPRWGCLWGSD
491	EDICLPRWGCLWEDD
492	SWYGGDICLP-WGCLWSEES

11. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual la secuencia de aminoácidos está ciclada por la presencia de residuos Cys enlazados por disulfuro.

12. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico tiene menos de 50 residuos aminoácidos.

13. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico tiene menos de 40 residuos aminoácidos.

14. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico tiene entre 10 y 30 residuos aminoácidos.

ES 2 270 893 T3

15. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico tiene una afinidad por la albúmina de suero de menos de 1 nM.

16. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico está adsorbido no covalentemente o unido covalentemente a una macromolécula.

17. Ligando peptídico según la reivindicación 16, en la cual la macromolécula es un soporte sólido.

18. Ligando peptídico según la reivindicación 1, en la cual el ligando peptídico está marcado con un grupo detectable.

19. Molécula híbrida que comprende

(a) el ligando peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1-15; y

(b) un compuesto bioactivo.

20. Molécula híbrida según la reivindicación 19, en la cual el compuesto bioactivo es un agente terapéutico o de diagnóstico.

21. Molécula híbrida según la reivindicación 20, en la cual el agente terapéutico es cualquier agente seleccionado de entre el grupo consistente en un enzima, una hormona, una citocina, un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un analgésico, un antipirético, un agente antiinflamatorio, un antibiótico, y un agente antivírico, un fármaco antifúngico, un fármaco cardiovascular, un fármaco que actúa sobre el sistema nervioso central, un fármaco que afecta la función renal y el metabolismo de electrolitos, y un agente quimioterapéutico.

22. Molécula híbrida según la reivindicación 19, en la cual el ligando peptídico es Gln-Arg-Leu-Met-Glu-Asp-Ile-Cys-Leu-Pro-Arg-Trp-Gly-Cys-Leu-Trp-Glu-Asp-Asp-Phe (SEC. N° ID.: 122) y el agente terapéutico es un fragmento de anticuerpo Fab o F(ab')₂ anti-factor de tejido.

23. Composición que comprende la molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 y un portador farmacéuticamente aceptable.

24. Molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, para su uso en un procedimiento de terapia.

25. Molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22, para su uso en un procedimiento de diagnóstico.

26. Uso de una molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 en la fabricación de un medicamento.

27. Uso de una molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19-22 en la fabricación de un agente de diagnóstico.

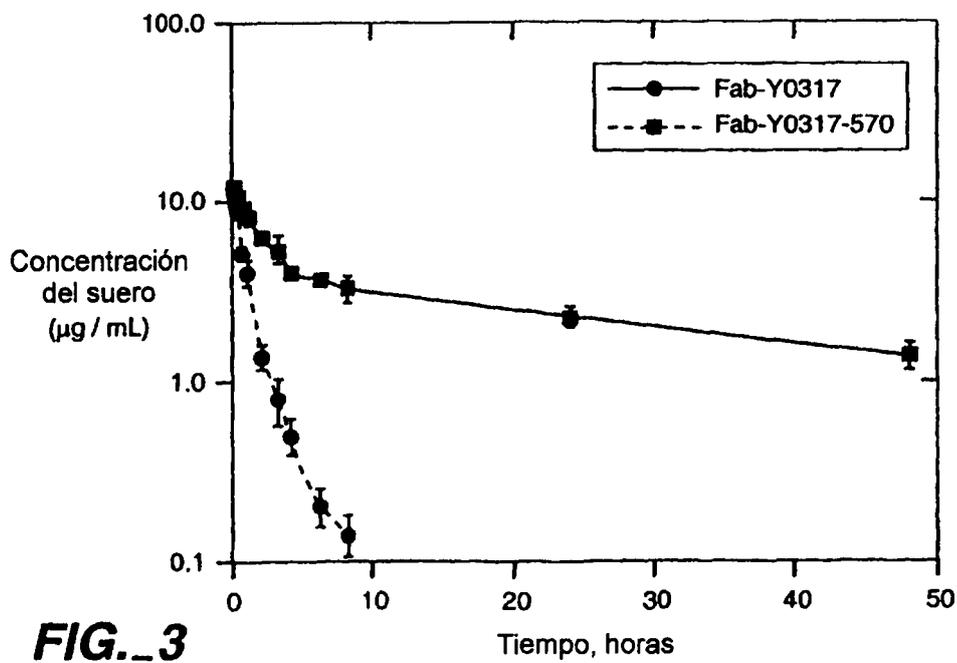
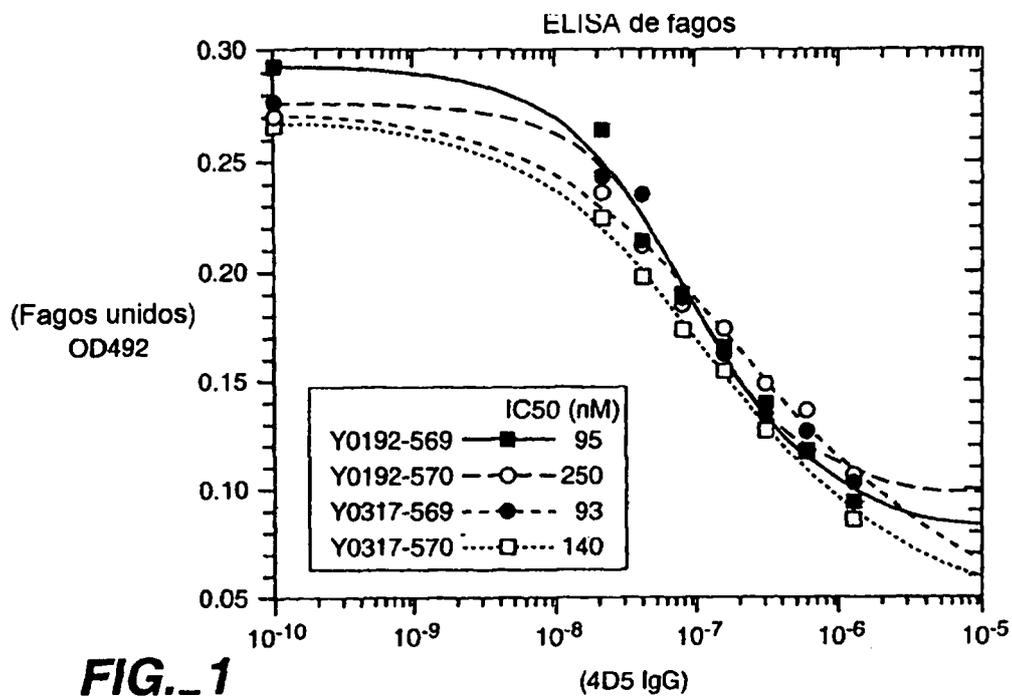
28. Ácido nucleico que codifica un ligando peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15.

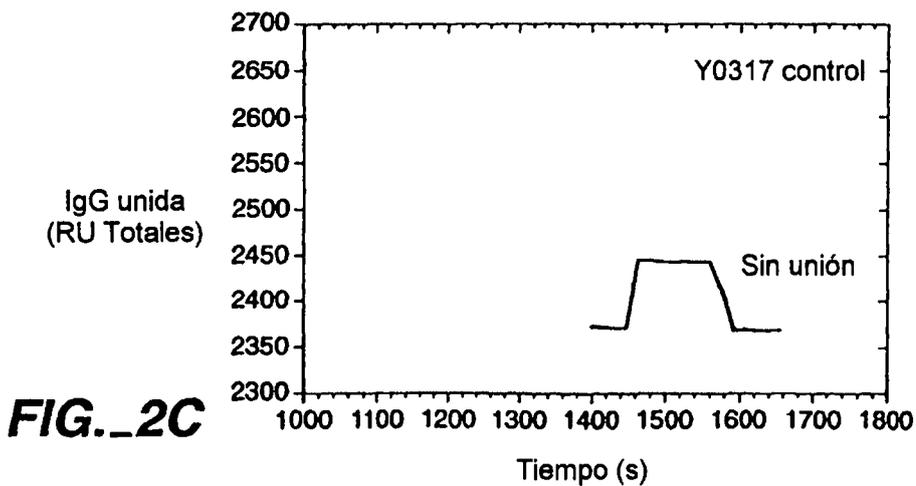
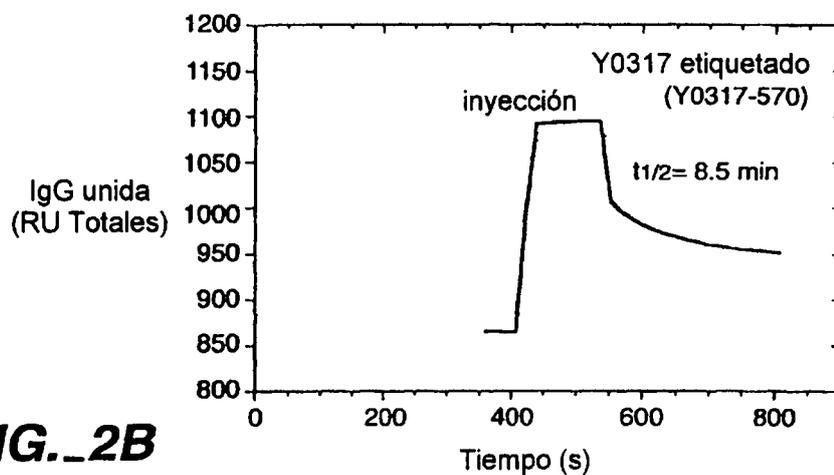
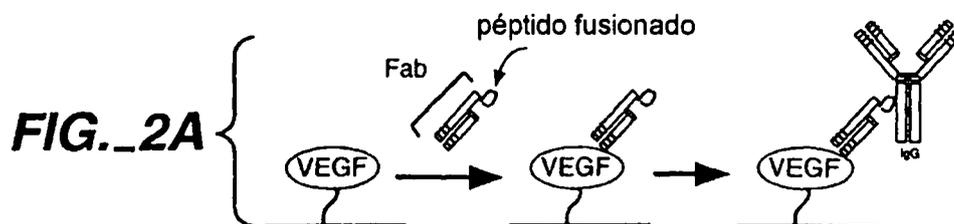
29. Ácido nucleico que codifica una molécula híbrida según una cualquiera de las reivindicaciones 19 a 22.

30. Procedimiento para purificar una proteína, que comprende

cultivar una célula huésped que contiene un vector que comprende un gen que codifica la proteína y un gen que codifica un ligando peptídico según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 15, lo que resulta en la producción de una proteína de fusión que comprende la proteína y el ligando peptídico; y

purificar la proteína de fusión sobre un soporte sólido de albúmina de suero usando el ligando peptídico como un asa de afinidad.





Biblioteca	Especificidad para especie de los péptidos de fagos unidores de albúmina	Seleccionados con SA de Conejo	Unión a fagos	
			Conejo	Rata
BA	GENWCDSTLMA YDLGGQVNM	+++	-	.
BB	MDELA FYCGIWECLMHQEQK	+++	-	.
BC	DLCDVDFCWF	+++	-	.
BD	KSCSELHWLLV EEC LF	+++	-	.
	Seleccionados con SA Humana			
HA	EVRSFCTDWPA EK SCK PL RG	-	+++	.
HB	RA PES FV CYWET I C FER SEQ	-	++	(+)
HC	EMCYFPGI CWM	.	+++	++
HE	CEVALD ACRGGESGCCRH I CEL I RQL C	.	(+)	.
	Seleccionados con SA de Rata			
RA	RNEDPCVV L L EMGLECWEGV	-	-	+++
RD	DTCVDLV RLGLECWG	-	-	+++
RB	QRQMVDFCL PQWGLWGDGF	++	+	+++
RC	DLCLR DWGCLW	.	-	+++
RE	CGCVDVSDWDCWSECLWSHGA	-	-	+++

FIG._4

	Secuencias seleccionadas con Albúmina de Conejo		Se une a	
	Humana	Conejo	Rata	
Biblioteca BA	G E N W C D S T L M A Y D L C G Q V N M			
BA-B44	G E D W C D S T L L A F D L C G E G A R	+++	.	.
BA-B37	G E N W C D S T L L A Y D L C G E D N T	+++	.	.
BA-B39	M E L W C D S T L M A Y D L C G D F N M	+++	.	.
Secuencias seleccionadas con Albúmina Humana				
Biblioteca HA	E V R S F C T D W P A E K S C K P L R G			
HA-H74	E V R S F C T D W P A H Y S S C T S L Q G	+++	.	.
HA-H83	G - R R S F C C M D D W P A H K S S C T P L M L	+++	.	.
HA-H73	G V R R T F C C Q D D W P A H H N S S C K P L R G	+++	.	.
HA-H76	Q T R R S F C A D D W P - H H N S S C K P L R G	+++	.	.
HA-H84	R - R T - C - D W P - H H N S S C K - L R G	+++	.	.
Biblioteca HB	R A P E S F V C Y W E T I C F E R S E Q			
HB-H2	R A E S S V C Y W P E G I C F D R R T E E Q	+++	.	.
HB-H8	M E P S R S V C Y A E G I C F D R R T E E Q	+++	.	.
HB-H3	R E G P A S L V C Y F E D I C F F V R A E P	+	.	.
HB-H6	R R P P A D - V - C Y F E S I C F F E R S E P L	+	.	.
HB-H4	L V P P E R S L V P C Y W E T I C F E S S E R Q	+	.	.
HB-H16	R T A P A S S L V C Y W P E G I C F F A Q R	+	.	.
HB-H18	R A P E R W V C Y W E G I C F F D R Y	+	.	.
HB-H1		(+)	.	.

FIG._5A

RB-R3	Q M S D F C L P Q W G G C L W G D G Y	.	.	+++
RB-R9	K S R M G D F C L P P E W G C L W G D E L	.	.	+++
RB-R1	E R Q M E D F C L P Q W G C L W G D G V	.	.	+++
RB-R14	Q R Q V D L C L R D W G C L W	.	.	+++
Biblioteca RC				
RC-R6	D I C L P E W G C L W	.	.	++
RC-R8	D I C L P E W G C L W	.	.	++
RC-R15	D I C L P E W G C L W	.	.	++
RC-R1	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R2	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R3	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R10	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R12	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R18	D I C L P V W G C L W	.	.	++
RC-R9	D L C L P E W G C L W	.	.	++ (+)
RC-R4	D L C L P V W G C L W	.	.	++ (+)
RC-R5	D I C L P A W G C L W	.	.	++
RC-R20	D I C L P A W G C L W	.	.	++
RC-R17	D I C L P R W G C L W	.	.	++
RC-R13	D I C L P R W G C L W	.	.	++
RC-R16	D I C L P R W G C L W	.	.	++
Biblioteca RBC				
RBC-R16	X X D L C L R D W G C L W X X	.	.	+++
RBC-R7	E W D V C L P H W G C L W D G	(+)	.	+++
RBC-R1	W D D I C F R H W G C L W D S	.	.	+++
RBC-R2	M D D I C L H P N W G C L W D E	.	.	+++
RBC-R4	F D D L C L P N W G C L W G S	.	.	+++

FIG.-5E

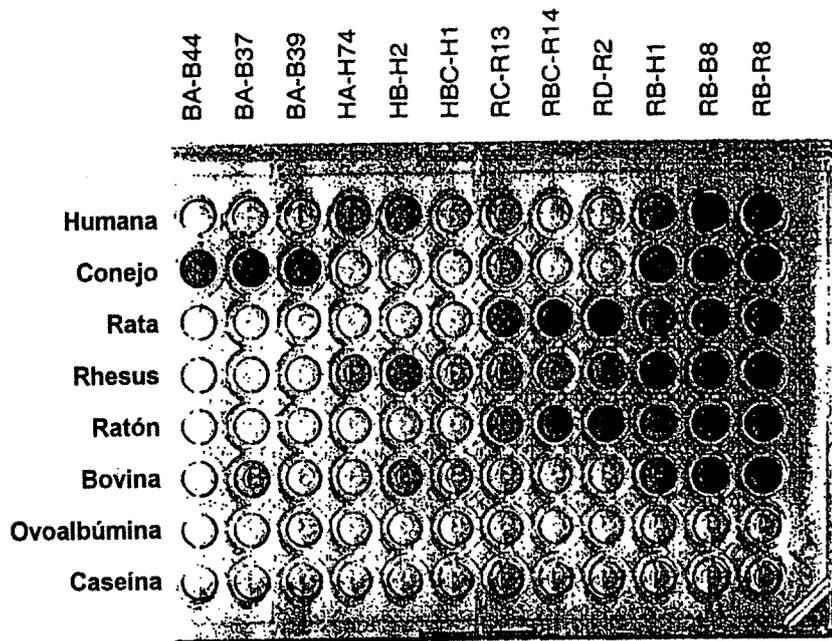


FIG._6

FAGO	Se une a		
	Humana	Conejo	Rata
RB	+	++	+++
RB-H1	++	+++	+++
RB-H6	++	+++	+++
RB-B12	++	+++	+++
RB-B8	++	+++	+++
RB-B7	++	+++	+++
RB-B5	++	+++	+++
RB-B6	++	+++	+++
RB-B4	++	+++	+++
RB-B11	++	+++	+++
RB-B16	++	+++	+++
RB-B2	++	+++	+++
RB-R8	++	+++	+++
RB-R16	++	+++	+++
HC-R10	++	+++	+++

Q R Q M V D F C L P Q W G C L W G D G F
Q R H P E D I C L P R W G C L W G D D D
N R Q M E D I C L P Q W G C L W G D D F
Q G L I G D I C L P R W G C L W G D S V
H S Q M E D I C L P R W G C L W G D E L
L R L M D N I C L P R W G C L W D D G F
Q W H M E D I C L P Q W G C L W G D V L
Q W Q M E N V C L P K W G C L W E E L D
L W A M E D I C L P K W G C L W E D D F
Q W Q V M D I C L P R W G C L W A D E Y
H R L V E D I C L P R W G C L W G N D F
Q R L M E D I C L P R W G C L W G D R F
Q G L I G D I C L P R W G C L W G D S V
L I F M E D V C L P Q W G C L W E D G V
Q R D M G D I C L P R W G C L W E D G V

FIG.-7

Secuencias seleccionadas con albúmina de rata

Biblioteca de aleatorización dura

	X	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X	X
35	A	A	Q	V	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	Y	A
33	A	G	W	A	A	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	D	V
60	A	S	V	V	D	D	I	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	E	D	I
84	A	T	M	E	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	A	E	E
10	D	E	D	F	E	D	Y	C	L	P	P	W	G	C	L	W	G	S	S	M
34	E	E	T	W	D	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	L	G	E	R
93	E	R	W	E	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	G
23	G	D	W	M	H	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	E	K	A
71	G	I	E	W	G	D	T	C	L	P	K	W	G	C	L	W	R	V	E	G
36	G	Q	Q	G	E	D	V	C	L	P	V	W	G	C	L	W	D	T	S	S
48	G	R	Y	P	M	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	D	S	A
24	G	S	A	G	D	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	R	G	A
9	H	A	S	D	W	D	V	C	L	P	G	W	G	C	L	W	E	E	D	D
47	L	G	V	T	H	D	T	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	V	G
72	L	V	W	E	E	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	A	E	D
11	N	V	G	W	N	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	Q	E	S
83	Q	G	V	E	W	D	V	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	T	R	E	V
58	R	L	D	A	W	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	E	A	E	P
96	S	E	A	P	G	D	Y	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	Q	E	K
94	T	A	M	D	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	G	S
81	T	E	I	G	Q	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	V	P	G	T
57	T	L	G	W	P	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	R	E	S	D
12	T	L	S	N	Q	D	I	C	L	P	G	W	G	C	L	W	G	G	I	N
46	T	S	T	G	G	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	S	S	E
22	V	S	E	M	D	D	I	C	L	P	L	W	G	C	L	W	A	D	A	P
59	V	S	E	W	E	D	I	C	L	P	S	W	G	C	L	W	E	T	Q	D
45	V	V	G	D	G	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	Q	A	R
21	V	V	W	D	D	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	Y	G
69	W	S	D	S	D	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	V	A
95	W	V	E	E	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	V	E
33	A	Q	A	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	A	E	I
10	A	S	D	R	G	D	L	C	L	P	Y	W	G	C	L	W	G	P	D	G
93	A	S	D	P	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	F
71	A	S	N	W	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	R	N
22	A	S	T	P	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	D	A
23	D	G	E	E	G	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	L	E	H
24	E	G	E	E	V	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	G	Y	P	V
82	E	V	G	D	L	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	D	K
81	F	R	D	G	E	D	F	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	A	D	T	S
46	G	D	M	V	N	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	E	N
83	G	R	M	G	T	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	V	E
94	H	E	W	E	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	R	D	G	D
35	K	K	V	S	G	D	I	C	L	P	I	W	G	C	L	W	D	N	D	Y

FIG. 8A

96	L	L	E	S	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	H	E	D	G
21	M	Q	A	E	S	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	G	T
36	M	Q	G	P	L	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	R
48	Q	M	P	L	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	G	R	E
95	R	E	E	W	G	E	D	L	C	L	P	T	W	G	C	L	W	E	T	K
47	R	V	W	T	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	G	N
11	S	I	R	E	Y	D	V	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	P	S	A
34	S	P	T	E	W	D	M	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	D	A	L
69	S	S	G	L	E	D	I	C	L	P	N	W	G	C	L	W	A	D	G	S
9	S	V	G	W	G	D	I	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	E	G	G
57	T	E	E	N	W	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	D	W
84	T	S	G	S	D	D	I	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	E	D	S
58	T	W	P	-	G	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	A	E	S
72	W	D	H	E	L	D	F	C	L	P	V	W	G	C	L	W	A	E	D	V
60	W	T	E	S	E	D	I	C	L	P	G	W	G	C	L	W	G	P	E	V
59	W	V	P	F	E	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	S	Y	Q

Biblioteca de aleatorización dura

	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X	
93	E	E	D	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	N	T	S	
81	E	G	Y	W	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	L	E	
10	E	L	G	E	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	E	
24	E	T	W	S	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	A	S	
83	G	D	Y	V	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	D	G	
23	G	V	L	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	P	K	
94	H	M	M	D	D	V	C	L	P	G	W	G	C	L	W	A	S	E	
59	I	D	Y	T	D	L	C	L	P	A	W	G	C	L	W	E	L	E	
36	I	E	H	E	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	V	D	
11	I	S	E	W	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	R	S	
12	I	S	W	A	D	V	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	K	D	
47	I	S	W	G	D	L	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	G	S	
22	K	L	W	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	P	L	
84	L	A	W	P	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	M	
71	L	N	E	S	D	I	C	L	P	T	W	G	C	L	W	G	V	D	
46	L	P	E	Q	D	V	C	L	P	V	W	G	C	L	W	D	A	N	
35	M	A	W	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	G	G	
48	N	E	E	W	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	V	
60	Q	E	L	Q	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	V	G	
21	Q	R	E	W	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	D	V	
9	Q	R	F	W	D	T	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	D	
57	R	V	F	T	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	L	G	
58	S	G	W	D	D	V	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	P	S	
96	S	S	A	S	D	Y	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	L	
72	S	W	Q	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	V	D	
69	S	Y	E	T	D	V	C	L	P	Y	W	G	C	L	W	E	D	A	
34	S	Y	W	G	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	A	
45	T	L	E	W	D	M	C	L	P	R	W	G	C	L	W	T	E	Q	

FIG. 8B

95	V	G	E	F	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	A	E
33	V	T	S	W	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E
82	W	L	W	E	D	L	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	E	E
82	A	L	F	E	D	V	C	L	P	V	W	G	C	L	W	G	G	E
45	A	S	E	W	D	V	C	L	P	T	W	G	C	L	W	M	E	G
34	A	Y	S	A	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	M	S	E
35	E	D	W	E	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	E	G	M
83	E	D	W	T	D	L	C	L	P	A	W	G	C	L	W	D	T	E

Secuencias seleccionadas con albúmina de conejo

Biblioteca de aleatorización dura

	X	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X	X
75	A	G	L	D	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	K	E	A
39	A	G	M	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	Q	G	E	P
76	A	P	G	D	W	D	F	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	D	D	A
74	A	Q	L	F	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	D	G	Y
86	A	R	T	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	A	S	D
63	A	W	Q	D	F	D	V	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	P	E	S
26	D	T	T	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	E	A
4	E	G	F	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	H	Q	A
2	E	Q	W	L	H	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	D	D	T	D
61	E	T	G	W	P	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	G	E
52	F	E	L	G	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	H	N
38	G	A	S	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	P	E	D
88	G	E	W	W	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	S	S
1	G	S	L	E	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	I	D	E
13	G	W	L	E	E	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	A	D	N
64	H	E	Q	W	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	S	Y
49	Q	R	V	D	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	D
50	S	V	G	W	G	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	A	E	S	D
40	T	L	M	S	N	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	P	K
28	T	L	V	L	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	M	T	D
14	T	W	Q	G	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	T	E	V
73	V	G	V	F	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	Q	P	V
25	V	P	A	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	A	R	N
16	V	S	L	G	D	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	P	E	A
15	V	W	I	D	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	T	E	N
51	W	R	W	N	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E	A
73	A	V	S	W	A	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	R	A	D
37	A	W	L	D	E	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	N	T	G	V
16	F	S	L	D	E	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	A	E	K
3	G	D	L	G	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	Y	P
87	G	E	G	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	E	D	E
38	G	L	M	G	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	K	G	D	I
75	G	W	H	D	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	Q	N	D
63	L	L	G	G	H	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	G	D	V

FIG._8C

64	M	R	W	S	S	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	D	E	E
13	Q	F	E	W	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	V	E	V
49	Q	G	W	W	H	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	G	E
51	R	E	G	W	P	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	T	G
40	R	E	L	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	H	A	T
76	R	L	E	L	M	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	P	Q	D
2	S	G	V	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	A	G
14	S	L	G	L	T	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E	Q
27	S	S	L	E	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	Q	D	A
74	S	V	L	S	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	W	D	F	S
15	T	S	L	L	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	Y	S	E	G
50	T	S	L	A	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	D	G
25	V	E	M	W	H	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	S	N	A
4	W	D	L	A	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E	A

Biblioteca de ateatorización dura

	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X	
40	F	I	T	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	N	
13	F	L	W	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	G	
50	F	V	H	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	G	
26	G	L	G	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	R	D	
63	G	M	F	D	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	L	G	
37	G	P	G	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	E	
87	G	P	W	Y	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	G	V	
4	G	W	D	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	G	
39	L	E	Y	E	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	G	E	
14	L	L	D	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	V	R	
28	L	L	M	S	P	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	D	
52	L	L	V	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	D
75	M	L	S	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E	
61	M	P	W	T	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	S	
25	R	R	L	G	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	A	G
51	R	R	L	G	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	Y	Q
49	S	P	W	M	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	G	
38	S	T	F	T	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	L	E	
74	S	V	L	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	S	
86	T	W	F	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	P	G	
88	V	H	Q	A	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	T	
1	V	L	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S	
15	V	V	N	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S
76	V	V	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	K	E	
73	V	W	Y	K	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	A	E	
85	W	D	Y	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	G	
2	W	E	V	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	D	
27	Y	I	W	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	G	E	
3	Y	R	D	Y	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	R	

FIG. 8D

64	A	F	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	D
49	D	W	G	R	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	E
28	E	A	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	L	E
61	L	I	L	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	D	T
25	L	K	L	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	S
52	L	L	T	R	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	S	D
4	L	R	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	T
87	L	Y	L	R	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	E	A	D
76	N	W	Y	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	V	E
1	Q	D	W	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	.
38	Q	S	W	P	D	I	C	L	P	K	W	G	C	L	W	G	E	G
88	T	L	L	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	D
74	V	R	L	M	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	E
26	V	R	W	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	E
40	W	D	V	A	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	E	D
15	W	H	M	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	S	E	V
14	W	K	D	F	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	D	H
3	W	L	S	E	D	I	C	L	P	Q	W	G	C	L	W	E	E	S
27	W	L	S	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	A	D
37	W	L	S	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	D	L

Secuencias seleccionadas con albúmina humana
Biblioteca de aleatorización dura

X X X X X D X C L P X W G C L W X X X X

68	E	V	R	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	N	W	R
6	F	G	Q	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	N	E	Q
17	I	W	Q	L	E	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	D	G	L
53	N	T	P	T	Y	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	V	P
5	Q	P	V	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	D	H
18	S	W	Y	G	G	D	I	C	L	P	.	W	G	C	L	W	S	E	E	S
80	W	G	M	A	R	D	W	C	L	P	M	W	G	C	L	W	R	G	G	G
7	W	H	L	T	D	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	E	Q
54																				
67	N	W	A	E	N	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	D	E	N
68	S	A	R	E	W	D	I	C	L	P	T	W	G	C	L	W	E	K	D	I

FIG. 8E

Biblioteca de aleatorización dura

	X	X	X	X	D	X	C	L	P	X	W	G	C	L	W	X	X	X
42	A	G	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	V	E
56	E	I	R	W	D	F	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	E	D
8	E	S	L	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	G
30	E	Y	W	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	D	W	Q
80	K	M	W	S	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	E
90	M	G	T	K	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	A	E	A
7	M	H	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	S	S
78	R	G	L	H	D	A	C	L	P	W	W	G	C	L	W	A	G	S
19	R	L	F	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	Q	G	E
5	S	G	E	W	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	E	G
6	S	M	F	F	D	H	C	L	P	M	W	G	C	L	W	A	E	Q
44	V	G	E	W	D	I	C	L	P	N	W	G	C	L	W	E	R	E
32	W	W	M	A	D	R	C	L	P	L	W	G	C	L	W	R	G	D
29	W	W	V	R	D	L	C	L	P	T	W	G	C	L	W	S	G	K
54	Y	F	D	G	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	G	S	D
32	T	L	F	Q	D	I	C	L	P	R	W	G	C	L	W	E	E	S
68	W	F	P	K	D	R	C	L	P	V	W	G	C	L	W	E	R	H

FIG. 8F

PÉPTIDO	Secuencia										AS de Conejo IC ₅₀ (nM)	AS de Rata IC ₅₀ (nM)	AS de Ratón IC ₅₀ (nM)			
	D	L	C	L	R	D	W	G	C	L				W		
SA02																
SA04																
SA05																
SA06																
SA07																
SA08																
SA09																
SA10																
SA11																
SA12																
SA13																
D3H44-L																
D3H44-Ls																

FIG._9

Péptido SA06 en el Ensayo de Unión de Competición SA08b con un recubrimiento de Albúmina de Ratón, Rata o Conejo

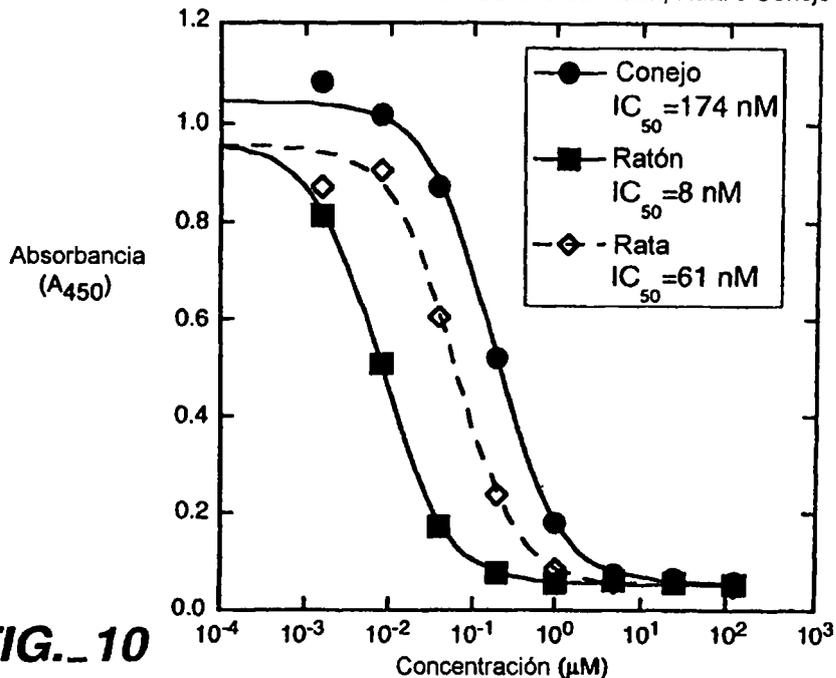


FIG. 10

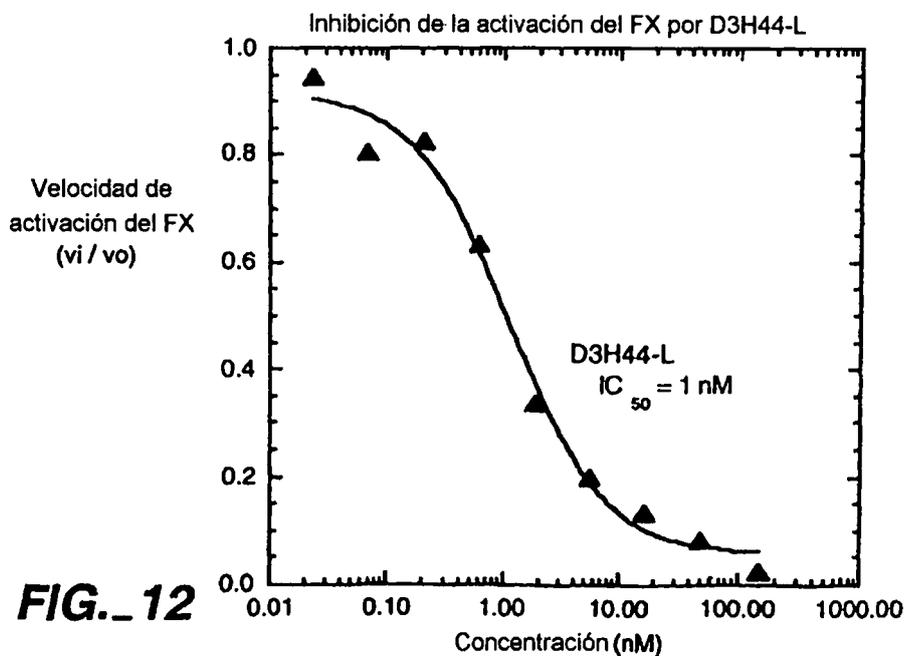


FIG. 12

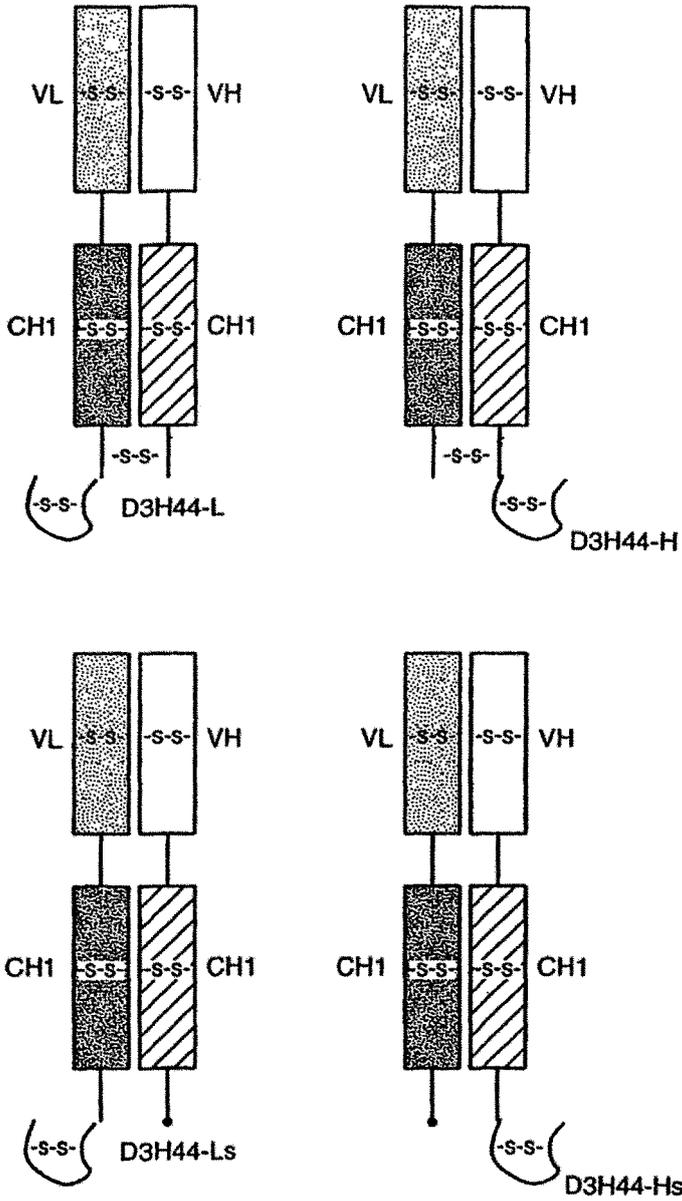


FIG. 11

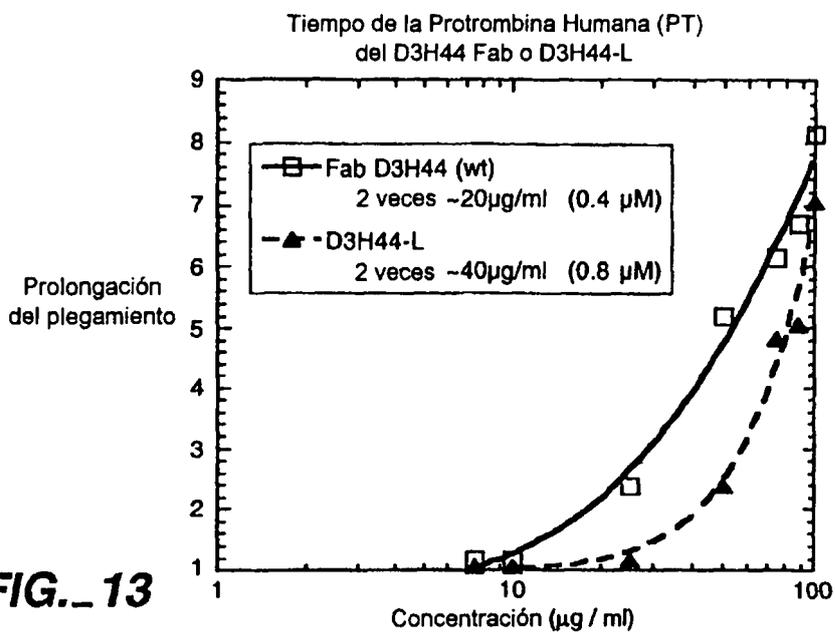


FIG._13

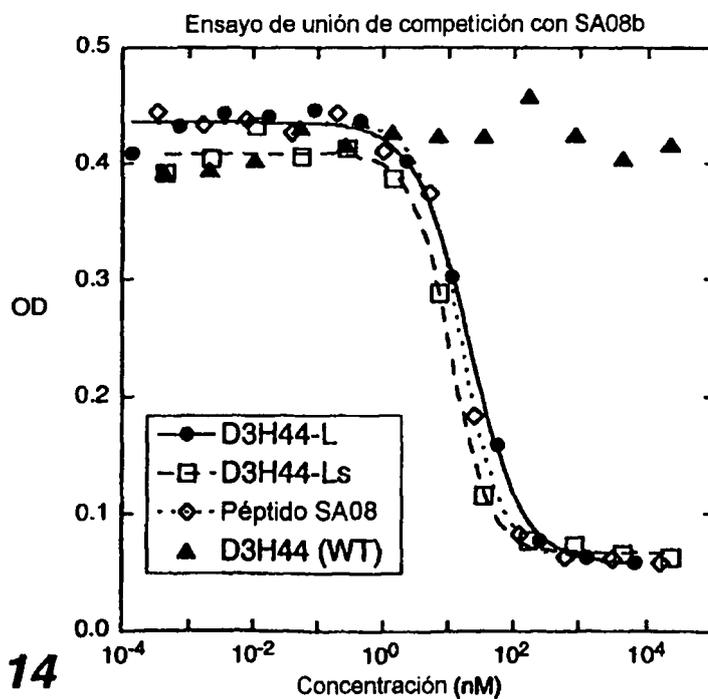
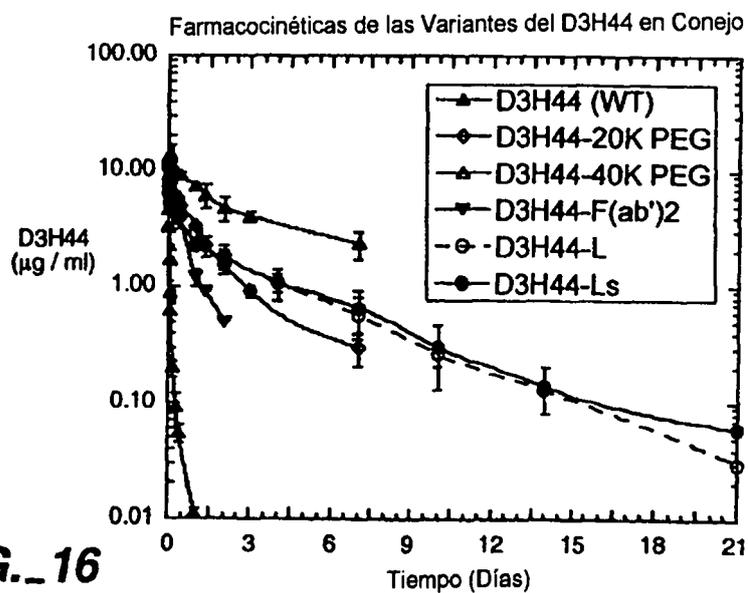
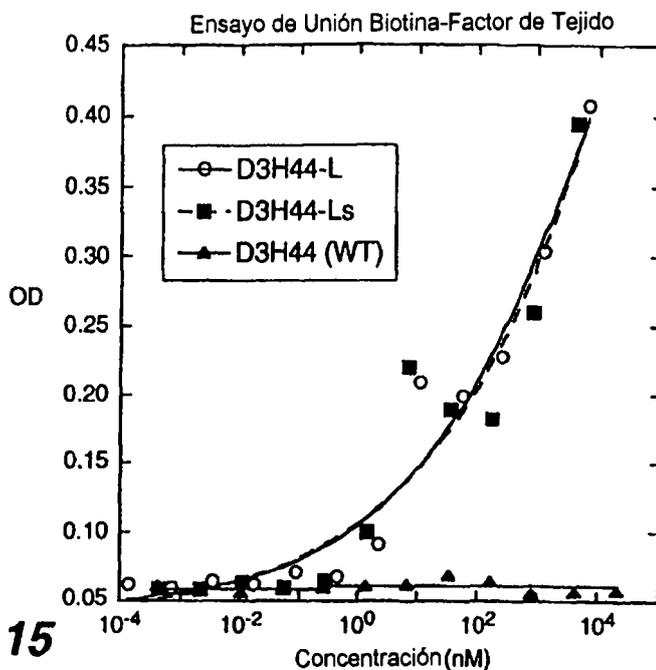


FIG._14



00-331 Datos de PK resumidos (históricos)

Parámetro	Unidades	D3H44-Fab		D3H44-L		D3H44-Ls	
		Promedio	Desv Est	Promedio	Desv Est	Promedio	Desv Est
Dosis	ug/kg	396		416		524	
AUC	hr*ug/mL	5.86	1.23	349	33	332	82
AUC/Dosis	(hr*ug/mL)/(mg/kg)	14.8	3.1	840	78	633	157
CL	mL/hr/kg	69.9	16.2	1.20	0.11	1.64	0.37
Cmax	ug/mL	5.00	2.30	7.55	1.23	5.98	0.11
K10-HL	hr	0.876	0.213	32.4	3.2	38.3	8.8
MRT	hr	3.07	0.82	95.0	13.1	110	20
V1	mL/kg	90.6	38.4	56.2	10.1	87.6	17
Vss	mL/kg	221	95	113	7	176	11

p < 0.05 RC20L vs RC20LS
p < 0.05 RC20L vs RC20LS

99-133 Datos de PK resumidos (históricos)

Parámetro	Unidades	D3H44-20K PEG		D3H44-40K PEG		D3H44-Fab		D3H44-Fab'2	
		Promedio	Desv Est	Promedio	Desv Est	Promedio	Desv Est	Promedio	Desv Est
AUC	hr*ug/mL	271	33	1255	383	9.8	1.6	120	13
CL	mL/hr/kg	1.87	0.23	0.422	0.119	51.8	9.2	4.21	0.51
K10-HL	hr	18.0	4.2	68.9	28.5	0.760	0.123	8.84	0.73
V1	ug/mL	47.4	5.4	39.2	7.4	55.9	4.7	53.5	5.3
Vss	mL/kg	109	14	78.8	13.7	127	13	84.5	11.4
Dosis	ug/kg	509		493		500		500	
AUC/Dosis	(hr*ug/mL)/(mg/kg)	532	65	2546	777	19.7	3.2	240	26

AUC = Área bajo la curva
CL = eliminación
K10-HL = vida media desde el compartimento

MRT = tiempo medio de residencia
V1 = volumen inicial de distribución
Vss = volumen de distribución en estado estacionario

FIG. 17