

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 595 504**

51 Int. Cl.:

C40B 30/04 (2006.01)

C07K 7/06 (2006.01)

C07K 14/00 (2006.01)

C07H 21/04 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **27.10.2009 PCT/US2009/062200**

87 Fecha y número de publicación internacional: **06.05.2010 WO10051274**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **27.10.2009 E 09824067 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **29.06.2016 EP 2356269**

54 Título: **Métodos y usos de dominio de Fibronectina tipo III basado en estructuras de composiciones**

30 Prioridad:

31.10.2008 US 110120 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:

30.12.2016

73 Titular/es:

**JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US**

72 Inventor/es:

**JACOBS, STEVEN y
O'NEIL, KARYN**

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 595 504 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**Métodos y usos de dominio de Fibronectina tipo III basado en estructuras de composiciones****Ámbito de la invención**

5 La presente invención se refiere a la estructura de proteína con nuevas propiedades, incluyendo la habilidad de unirse a objetivos celulares. Mas particularmente, la presente invención se dirige a la estructura de proteína basado en una secuencia consensuada de una repetición de fibronectina tipo III (FN3).

Antecedentes de la invención

10 Los anticuerpos monoclonales son el tipo más utilizado de las proteínas terapéuticas cuando se desear una alta afinidad y especificad para una molécula objetivo. Sin embargo, las proteínas no-anticuerpo que pueden ser diseñadas para unirse con dichos objetivos también son de gran interés en la industria bio-farmacéutica. Estas proteínas de "estructura alternativa" pueden tener ventajas sobre los anticuerpos tradicionales debido a su pequeño tamaño, falta de enlaces disulfuros, gran estabilidad y habilidad para ser expresados en huéspedes procarióticos. Recientemente se han aplicado métodos novedosos de purificación; fácilmente conjugables con fármacos/toxinas, penetran fácilmente en los tejidos y fácilmente convertibles en aglutinantes multiespecíficos (Skerra 2000; Binz and Pluckthun 2005).

20 Uno de tales armazones alternativos es el pliegue de inmunoglobulina (Ig). Este pliegue se encuentra en las regiones variables de los anticuerpos, así como miles de proteínas no-anticuerpos. Se ha demostrado que una proteína como la Ig, la décima fibronectina tipo III (FN3) repetición de la fibronectina humana, puede tolerar un gran número de mutaciones en los bucles de superficie expuesta mientras mantienen la estructura general de pliegue-Ig. De este modo, se han construido variantes de amino ácidos en estos bucles y se han seleccionado ligantes específicos para los diferentes objetivos (Koide et al. 1998; Karatan et al. 2004). Dichos dominios FN3 diseñados se ha demostrado que se unen a los objetivos con gran afinidad, mientras mantienen las propiedades biofísicas importantes (Parker et al. 2005).

30 Entre las propiedades físicas deseadas de las moléculas potenciales de estructura alternativa se incluye la alta estabilidad térmica y la reversibilidad de los pliegues y despliegues térmicos. Se han empleado un gran número de métodos para aumentar la estabilidad térmica aparente de proteínas y enzimas, incluyendo el diseño racional basado en la comparación con secuencias similares de alta estabilidad, diseño de estabilización de puentes disulfuros, mutaciones para incrementar la propensión a hélices α , diseño de puentes de sales, alteración de la carga en superficie de la proteína, evolución dirigida, y composición de secuencias de consenso (Lehmann and Wyss 2001). La alta estabilidad térmica es una propiedad deseada de tales armazones, ya que esta puede aumentar el rendimiento de la proteína recombinada obtenida, mejorar la solubilidad de la molécula purificada, mejora la actividad de los armazones intracelulares, reduce la inmunogenicidad y minimizar la necesidad de una cadena fría en fabricación.

40 El WO-02-04523-A2 y US 2008/220049 A1 se refieren al décimo tipo III del dominio de fibronectina.

Resumen de la invención

45 La invención proporciona un estructura de proteína aislada que comprende una secuencia de amino ácidos que al menos tiene el 75% de identidad del SEQ ID NO: 16, el cual tiene 7 hebras y 6 bucles entre las hebras, y el cual comprende la secuencia de amino ácidos de SEQ ID NO: 16 pero en la cual uno o más bucles es alterado con objeto de unirse a un objetivo mientras las hebras mantienen su secuencia como porciones de la cadena principal, estando los bucles en los residuos 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 y 75-81 del SEQ ID NO: 16 y son capaces de unirse a proteínas celulares y/o moléculas de ácido nucleico.

50 La invención también proporciona un método para la construcción de una colección de armazones de proteína de acuerdo con la invención, comprendiendo las etapas de proporcionar un polipéptido desde una secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 16; e introducir diversidad en las copias del polipéptido desde la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 16 para formar la colección de armazones de proteína, donde la etapa de introducción de diversidad opcionalmente comprende la mutación de al menos una región en bucle seleccionada del grupo consistente en residuos de las posiciones 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 y 75-81 del SEQ ID NO: 16.

La invención también proporciona una colección producida mediante el método de la invención.

60 La invención también proporciona un método para generar una estructura de proteína que se una a un objetivo específico con una afinidad de enlace predefinida, comprendiendo el contacto de la colección de la invención con el objetivo específico y el aislamiento de la estructura de proteína que se une al objetivo específico con la afinidad predefinida.

65 La invención también proporciona una molécula de ácido nucleico aislada que codifica la estructura de proteína de la invención.

La invención también proporciona un vector de ácido nucleico que comprende la molécula de ácido nucleico de acuerdo con la invención.

5 La invención también proporciona una célula huésped procariótica o eucariótica que comprende la molécula aislada de ácido nucleico de la invención, donde la célula huésped es opcionalmente seleccionada de al menos uno entre E. coli BL21 Star (DE3), otra célula E. coli, almidón, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, SP2/0, 293, HeLa, células de mieloma o linfoma, o cualquier derivado, inmortalizado o transformado de los mismos.

10 La invención también proporciona una composición que comprende la estructura de proteína de la invención en al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptado, opcionalmente además de comprender al menos un compuesto o polipéptido seleccionado de un indicador detectable, un antagonista TNF, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluidos y electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmuno-modulador, un fármaco oftalmológico, otico o nasal, un fármaco tópico, una citoquina, y un antagonista de citoquina.

20 La invención también proporciona un aparato médico, que comprende la estructura de proteína de la invención, donde dicho aparato es adecuado para contactar o administrar dicha estructura de proteína con al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginosa, intra-cavitario, intra-celular, intra-cerebral, intra-cerebroventricular, intra-cólico, intra-cervical, intra-gástrico, intra-hepático, intra-miocardial, intra-osteal, intra-pélvico, intra-pericárdico, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostático, intra-pulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retinal, intra-espinal, intra-sinovial, intra-torácico, intra-uterino, intra-vesical, intra-lesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal y transdérmico.

30 La invención también proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano o diagnóstico, comprendiendo material de envasado y un contenedor que comprende una solución o forma liofilizada de la estructura de proteína de la invención, donde dicho contenedor opcionalmente es un componente de un sistema de emisión parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginosa, intra-cavitario, intra-celular, intra-cerebral, intra-cerebroventricular, intra-cólico, intra-cervical, intra-gástrico, intra-hepático, intra-miocardial, intra-osteal, intra-pélvico, intra-pericárdico, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostático, intra-pulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retinal, intra-espinal, intra-sinovial, intra-torácico, intra-uterino, intra-vesical, intra-lesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal o transdérmico.

Resumen

40 En la presente se describe una estructura de proteína basado en una proteína repetida de fibronectina tipo III (FN3), codificadora o ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, composiciones, combinaciones, formulaciones, aparatos y métodos de realizar y utilizar las mismas. En una realización preferente, la estructura de proteína es parte de una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 de Tenascin-C (a partir de ahora "Tenascin") humano. En otras realizaciones preferentes, la estructura de proteína de la presente invención es una secuencia consensuada de dominios 15 FN3. Los armazones de proteína de la invención pueden ser diseñados para enlazar varias moléculas, por ejemplo, una proteína de objetivo celular.

50 Los armazones de proteína de la invención deben incluir moléculas adicionales o restos, por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo, un dominio aglutinante de albumina, u otros restos que influyen en la vida media. En otras realizaciones, los armazones de proteína de la invención deben ser enlazados a una molécula de ácido nucleico que debe codificar la estructura de proteína.

55 En la presente se describe al menos un método para expresar al menos una estructura de proteína basado en una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3, en una célula huésped, comprendiendo el cultivo de una célula huésped como se describe en la misma bajo la condición de que al menos una estructura de proteína es expresado y detectable y/o en cantidades recuperables.

60 También se describe en la presente, al menos una composición que comprende (a) una estructura de proteína basado en una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 y/o un ácido nucleico codificador como se describe en la misma; y (b) un diluyente o portador farmacéuticamente aceptable.

65 La presente descripción además comprende un método de generación de colecciones de una estructura de proteína en la repetición de la proteína de fibronectina tipo III (FN3), preferiblemente, una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 y, más preferiblemente, una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 de Tenascin humano. La colección se forma mediante la realización de generaciones sucesivas de armazones alterando (por mutación) los amino ácidos o el número de amino ácidos en las moléculas, en posiciones particulares en porciones de la estructura, p. ej. las regiones en bucle. Las colecciones pueden ser generadas alterando la composición de

amino ácidos de un bucle simple o la alteración simultánea de bucles múltiples o posiciones adicionales de la estructura de la molécula. Los bucles que son alterados pueden ser prolongados o acortados según conveniencia. Tales colecciones pueden ser generadas para incluir todos los amino ácidos posibles en cada posición, o un subconjunto diseñado de amino ácidos. Los miembros de la colección pueden ser utilizados para ser representados por monitorización, como una pantalla in vitro (ADN, ARN, pantalla de ribosomas, etc.), almidón, bacteriana y fago monitorización.

Los armazones de proteína de la presente invención proporcionan propiedades bio-físicas mejoradas, tales como la estabilidad bajo condiciones reducidas y solubilidad e altas concentraciones; deben ser expresadas y plegadas en sistemas procaríoticos, como el E. coli, en sistemas eucarísticos, como el almidón, y en sistemas de transcripción/traducción, como el sistema de lisado de reticulocitos de conejo.

Como aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de generación de una estructura de molécula que se une a un objetivo particular mediante paneo de la colección de armazones de la invención con el objetivo y detección de aglutinantes. En otros aspectos relacionados, la descripción comprende métodos de representación que deben ser utilizados para generar o armazones de proteína de afinidad madura con la actividad deseada, p. ej. capaces de unirse con proteínas objetivo con una cierta afinidad. Se puede alcanzar la madurez de afinidad mediante rondas iterativas de mutagenesis y sistemas de uso por selección, como la fago monitorización o monitorización in vitro. La mutagenesis durante este proceso debe ser el resultado de mutagenesis de zona dirigida a unos determinados residuos dla estructura, mutagenesis aleatoria debido a propensión a errores PCR, desplazamiento de ADN y/o una combinación de tales técnicas.

Descripción de las figuras

Figura 1. Análisis SDS-PAGE de Tencon purificado llevado a cabo en un NuPAGE 4-12% Bis-Tris gel (Invitrogen) y teñido con azul coomassie. N para condiciones iniciales y R para condiciones reducidas.

Figura 2. Análisis de dicroísmo circular de Tencon en PBS.

Figura 3. Análisis DSC del tercer dominio FN3 de Tenascin y Tencon en PBS

Figura 4. Diseño plásmido fagémido de Tencon pIX. La expresión es dirigida por promotor Lac y la secreción vía señal de secuencia OmpA

Figura 5. Monitorización de Myc-Tencon en fago M13. Resultados de ELISA mostrando la unión de fago al revestido α -Myc, CNTO95 revestido y depósitos sin recubrimiento.

Figura 6. Estructura en bucle del tercer dominio FN3 de Tenascin humano

Figura 7. Representación de los resultados de la selección Ig por ELISA. Se probaron clones individuales para unirse con IgG biotinilatado o HSA biotinilatado como control.

Descripción de la invención

En la presente se describen armazones de proteína aislados, recombinados y/o sintéticos basados en una secuencia consensuada de fibronectina tipo III (FN3) de proteína repetida, que incluye, sin limitaciones, armazones derivados de mamíferos, así como composiciones y moléculas de amino ácidos codificadoras que comprenden al menos un polinucleótido codificador una estructura de proteína basado en la secuencia consensuada FN3. La presente descripción también incluye, pero no se limita a, métodos de crear y utilizar tales ácidos nucleicos y armazones de proteína, incluyendo el diagnóstico y composiciones terapéuticas, métodos y aparatos.

Los armazones de proteína de la presente invención ofrecen ventajas sobre terapias convencionales, tales como la habilidad para administrarse localmente, oralmente o cruzar la barrera craneoencefálica, habilidad para expresarse en E. coli permitiendo que expresiones amplificadas de proteína actúen como función de los recursos frente a la habilidad de expresiones de células mamíferas para ser diseñadas en moléculas bio-específicas que se unen a múltiples objetivos o epitopos múltiples del mismo objetivo, habilidad para ser conjugado en fármacos, polímeros, y sondas, habilidad para ser formulado en altas concentraciones, y la habilidad de dichas moléculas de penetrar efectivamente en tejidos enfermos y tumores.

Además, los armazones de proteína poseen muchas de las propiedades de los anticuerpos en lo que se refiere a su plegado que imita la región variable de un anticuerpo. Esta orientación permite que los bucles de FN3 sean expuestos igual que las regiones que determinan la complementariedad el anticuerpo (CDRs). Deben ser capaces de unirse con objetivos celulares y los bucles pueden ser alterados p. ej. afinidad madurada, para mejorar ciertas propiedades de aglutinamiento o relacionadas.

Tres de los seis bucles dla estructura de proteína de la invención corresponden topológicamente a las

regiones determinantes de la complementariedad (CDRs 1-3), p. ej., regiones aglutinantes de antígenos, de un anticuerpo, mientras los tres bucles remanentes están superficialmente expuestos de un modo similar a anticuerpos CDRs. Estos bucles abarcan los residuos 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 y 75-81 de SEQ ID NO: 16 en la Tabla 3 más abajo y la Figura 6. Preferiblemente, las regiones en bucle en los residuos 22-28, 51-54 y 75-81 son alterados para aglutinar especificidad y afinidad. Una o más de estas regiones en bucle son aleatorizadas con otras regiones en bucle y/o otras cadenas manteniendo su secuencia como porciones troncales para poblar una colección y ser seleccionados enlaces potentes pueden de la colección teniendo gran afinidad para una proteína objetivo particular. Una o más de las regiones bucle puede interactuar con una proteína objetivo similar a la interacción de un anticuerpo CDR con la proteína.

Los armazones de la presente invención deben incorporar otras sub-unidades, p. ej., vía interacción covalente. Toda o una parte de la región constante de un anticuerpo debe ser añadida a la estructura para comunicar las propiedades de anticuerpo, p. ej., actividad de complemento (ADCC), vida media, etc. Por ejemplo, la función de efector puede ser proporcionada y/o controlada, p. ej., modificando el aglutinante C1q y/o el aglutinante Fc γ R y por medio de está cambiando la actividad CDC y/o la actividad ADCC. Las "funciones efector" son responsables de activar o disminuir una actividad biológica (p. ej., en un sujeto). Los ejemplos de las funciones efector incluyen, pero no están limitados a: Aglutinante C1q; citotoxicidad dependiente de complemento (CDC); aglutinante de receptor Fc; citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (p. ej., receptores de células B; BCR), etc. Tales funciones efector requieren que la región Fc este combinada con un dominio aglutinante (p. ej., bucles de estructura de proteína) y pueden ser evaluados empleado varios ensayos (p. ej., ensayos de aglutinamiento Fc, ensayos SDCC, ensayos CDC, etc.).

Adicionalmente, un conjugado de toxina, albumina o aglutinantes de albumina, moléculas de polietilenglicol (PEG) debe ser añadidas a la estructura de la molécula para las deseadas propiedades. Cualquiera de estas fusiones debe ser generada por técnicas estándar, por ejemplo, por la expresión de la proteína de fusión desde un gen de fusión recombinado construido utilizando secuencias genéticas públicamente disponibles.

Los armazones de la presente invención pueden se utilizados como mono-específicos de modo monomérico o como bi- o multi- específicos (para diferentes proteínas objetivo o epitopos de la misma proteína objetivo) en forma multímera. Los enlaces deben ser covalente o no-covalentes. Por ejemplo, una estructura dimerico bio-específico tiene una sub-unidad con especificidad para una primera proteína objetivo o epitopo y una segunda sub-unidad con especificidad para una segunda proteína objetivo o epitopo. Las sub-unidades de la estructura pueden ser enlazadas en una gran variedad de conformaciones que pueden incrementar la valencia y de este modo la avidéz del aglutinante antígeno.

Tal y como se emplea en la presente, un "anticuerpo" incluye cualquier proteína o péptido que contiene una molécula que comprende al menos una porción de una molécula de inmunoglobulina, como pero no limitada a, al menos una región determinante de complementariedad (CDR) de una cadena pesada o ligera de una porción de unión de ligado de la misma, una región variable de cadena pesada o cadena ligera, una región constante de cadena pesada o cadena ligera, una región de referencia, o cualquier porción de la misma. Dicho anticuerpo opcionalmente afecta a un enlace específico, como pero no limitado a, donde dicho anticuerpo se modula, reduce, aumenta, antagoniza, agoniza, mitiga, alivia, bloquea, inhibe, anula y/o interfiere con al menos una actividad o enlace, o con una actividad o enlace receptora, in vitro, in situ y/o in vivo.

El termino "anticuerpo" además se entiende que engloba anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones específicas y variantes de las mismas, incluyendo, si limitaciones, imitadores de anticuerpos o porciones que comprenden anticuerpos que imitan la estructura y/o la función de un anticuerpo o fragmento específico o porción del mismo, incluyendo, sin limitación, anticuerpos de cadena sencilla, anticuerpos de dominio sencillo, y fragmentos de las mismas. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión a antígenos que se unen a un objetivo particular. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpo capaces de unirse a un objetivo particular o porciones del mismo, incluyendo, pero no limitado a, Fab (p. ej., digestión por papaína), Fab' (p. ej., digestión por pepsina y reducción parcial) y F(ab')₂ (p. ej., digestión por pepsina), facb (p. ej., digestión por plasmina), pFc' (p. ej., digestión por pepsina o plasmina), Fd (p. ej., digestión por pepsina, reducción parcial y reagrupamiento), Fv o scFv (p. ej., técnicas de biología molecular) fragmentos, están abarcados por la descripción (ver, p. ej., Colligan, Immunology, supra).

Estos fragmentos pueden ser producidos por escisión enzimática, sintética o técnicas recombinantes, tal y como se conoce en el arte y/o se describe en la presente. Los anticuerpos pueden ser producidos en una variedad de formas truncadas empleando genes de anticuerpo en los cuales uno o más codones de parada han sido introducidos más arriba que la zona de parada natural. Por ejemplo, una combinación de genes codificando una porción de cadena pesada F(ab')₂ puede ser diseñada para incluir secuencias de ADN que codifiquen el dominio CH₁ y/o la región bisagra de la cadena pesada. Las múltiples porciones de anticuerpo pueden unirse entre si por medios químicos, mediante técnicas convencionales, o pueden prepararse como proteína contigua utilizando técnicas de ingeniería genética.

La proteína de la estructura de la presente invención puede utilizarse para medir el efecto en una célula, tejido, órgano o animal (incluyendo mamíferos y humanos), para diagnosticar, monitorizar, modular, tratar, aliviar,

ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de, al menos una enfermedad o condición, seleccionada de, pero no limitada a, al menos uno de entre los desórdenes o enfermedades inmunes, desorden o enfermedad cardiovascular, infección, mal, y/o enfermedad o desorden neurológico, o cualquier otro conocido o relacionado con la condición.

5

Dicho método puede comprender la administración de una cantidad efectiva de una composición o composición farmacéutica que comprende al menos una proteína de la estructura para una célula, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de tal modulación, tratamiento, alivio, prevención, o reducción de síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad efectiva puede comprender una cantidad de entre 0,001 a 500 mg/kg para administraciones sencillas (p. ej., bolo), múltiples o continuas, o para lograr una concentración de suero de 0,01-5000µg/ml para administraciones simples, múltiples o continuas, o cualquier rango efectivo o valor del mismo, como se realiza y determina empleando métodos conocidos, como se describe en la presente o se conoce en artes relevantes.

10

15 **Proteína de la estructura de la presente invención – Producción y Generación**

Al menos una proteína de la estructura de la presente invención puede ser opcionalmente producida por una línea celular, una línea celular mixta, una célula inmortalizada o población clonada de células inmortalizadas, como bien se conoce en el arte. Ver, p. ej., Ausubel et al., ed., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook et al., *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, *Antibodies, a Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001).

20

Los amino ácidos de una proteína de la estructura puede ser alterados, añadidos y/o eliminados para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa, fuera de tasa, avidez, especificidad, vida media, estabilidad, solubilidad o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en el arte.

25

Opcionalmente, las proteínas de la estructura pueden ser diseñadas con retención de alta afinidad para antígenos u otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, las proteínas de la estructura pueden ser opcionalmente preparadas mediante un proceso de análisis de las secuencias originales y varios productos conceptuales diseñados utilizando modelos tridimensionales de las secuencias originales y diseñadas. Los modelos tridimensionales están generalmente disponibles y son familiares para los expertos en la materia. Hay programas informáticos disponibles que ilustran y monitorizan probables estructuras conformadas en tres dimensiones de secuencias candidatas seleccionadas y pueden medir la posible inmunogenicidad (p. ej., Immunofilter program of Xencor, Inc. of Monrovia, CA). La inspección de estas expresiones permite el análisis de las probables funciones de los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata, p. ej., el análisis de residuos que influyen en la habilidad de la proteína de la estructura candidata para enlazarse con su antígeno. De este modo, los residuos pueden ser seleccionados y combinados desde las secuencias de origen y de referencia de manera que las características deseadas, como la afinidad con los antígenos objetivo, es lograda. Alternativamente, o en adición a, los procedimientos anteriores, pueden emplearse otros métodos o diseños adecuados.

30

35

40

Representación

La representación de proteínas de la estructura para uniones específicas con proteínas similares o fragmentos puede ser convenientemente lograda utilizando colecciones de monitorización nucleótida (monitorización de ADN o ARN) o péptida, por ejemplo, monitorización in vitro. Este método envuelve la representación de grandes colecciones de péptidos por miembros individuales que tienen la deseada función o estructura. Las secuencias de nucleótidos o péptidos monitorizadas puede ser de entre 3 a 5000 o más nucleótidos o amino ácidos en longitud, frecuencia entre 5-100 amino ácidos de longitud, y a menudo entre 8 y 25 amino ácidos de longitud. Además de los métodos directos de química sintética para generar colecciones de péptidos, se han descrito muchos métodos de recombinación de ADN. Un tipo envuelve la monitorización de secuencias de péptidos en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene la secuencia nucleótida que codifica la particular secuencia de péptidos monitorizada. Tales métodos son descritos en PCT Patent Publication Nos. 91/17271, 91/18980, 91/19818 y 93/08278.

45

50

55

Otros sistemas para generar colecciones de péptidos tienen aspectos tanto de la síntesis química in vitro como de métodos recombinantes. Ver, PCT Patent Publications Nos. 92/05258, 92/14843, y 96/19256. Ver también, U.S. Patent Nos. 5.658.754; y 5.643.768. Colecciones de monitorizaciones de péptidos, vectores y kits de representación son comercialmente adquiribles de suministradores como Invitrogen (Carlsbad, CA) y Cambridge Antibody Technologies (Cambridgeshire, UK). Ver, p. ej., U.S. Pat. Nos. 4704692, 4939666, 4946778, 5260203, 5455030, 5518889, 5534621, 5656730, 5763733, 5767260, 5856456, asignados a Enzon; 5223409, 5403484, 5571698, 5837500, asignados a Dyax; 5427908, 5580717 asignados a Affymax; 5885793, 5595898, 5576195, 5698435, 5693493, 5698417 asignadas a Xoma, Colligan, supra; Ausubel, supra; o Sambrook, supra.

60

65

Los armazones de proteína de la invención pueden aglutinar proteínas humanas o mamíferas con un

amplio rango de afinidades (K_D). en una realización preferente, al menos una estructura de proteína de la presente invención puede opcionalmente unirse a una proteína objetivo con gran afinidad, por ejemplo, con un K_D igual a o menor a 10^{-7} M, tales como pero no limitado a, 0,1-9,9 (o cualquier rango o valor entre los mismos) $\times 10^{-8}$, 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} o cualquier rango o valor entre los mismos, como se determina por resonancia de superficie plásmida o el método Kinexa, como se practica por los expertos en la materia.

La afinidad o aidez de una estructura de proteína para un antígeno puede ser determinado experimentalmente utilizando cualquier método adecuado. (Ver, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); y métodos descritos en las mismas). La afinidad medida de una interacción particular estructura de proteína-antígeno puede variar si se mide bajo diferentes condiciones (p. ej., concentración salina, pH). Así, la cuantificación de la afinidad y otros parámetros de unión a antígenos (p. ej., K_D , K_{on} , K_{off}) son realizados preferiblemente con soluciones estandarizadas de armazones de proteína y antígenos, y una solución amortiguadora estandarizada, como la solución amortiguadora descrita en la presente.

Ensayos competitivos pueden ser llevados a cabo con la estructura de proteína de la presente invención con objeto de determinar que proteínas, anticuerpos u otros antagonistas competentes para la unión con una proteína objetivo con la estructura de proteína de la presente invención y/o para compartir la región epítopa. Estos ensayos como recientemente se ha sabido por los expertos en la materia evalúan la competencia entre antagonistas o enlaces para un número limitado de áreas de enlace en una proteína. La proteína y/o anticuerpo es inmovilizado o insolubilizado antes o después de la competencia y el enlace de la muestra con la proteína objetivo es separado de una muestra no-enlazada, por ejemplo, mediante decantación (donde la proteína/anticuerpo fuer pre-insolubilizada) o mediante centrifugado (donde la proteína/anticuerpo fueron precipitados después de la reacción competente). También, la unión competente debe ser determinado por si la función es alterada por la unión o la falta de unión dla estructura de proteína con la proteína objetivo, p. ej., si la estructura de la molécula de proteína inhibe o potencia la actividad enzimática de, por ejemplo, un indicador. ELISA y otros ensayos funcionales deben ser empleados, así como otros conocidos en el arte.

30 **Moléculas de Ácido Nucleico**

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican armazones de proteína pueden encontrarse en forma de ARN, tales como mARN, hnARN, tARN o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluyendo, pero no limitándose a, cADN y ADN genómico obtenido por clonación o producido sintéticamente, o cualquier combinación de las mismas. El ADN puede ser de cadena triple, cadena doble o cadena sencilla, o cualquier combinación de las mismas. Cualquier porción de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificadora, también conocida como cadena con sentido, o puede ser la cadena no-codificadora, a la que también nos referimos como cadena anti-sentido.

Las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico que comprenden un marco de lectura abierto (ORF), opcionalmente, con uno o más intrones, p. ej., pero no limitándose a, al menos una porción específica de al menos una estructura de proteína; moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificadora para una estructura de proteína o región bucle que se une a la proteína objetivo; y moléculas de ácido nucleico que comprenden una secuencia nucleótido sustancialmente diferente de las descritas anteriormente pero la cual, debido a la degeneración de código genético, aun codifica la estructura de proteína como se describe en la presente y/o como se conoce en el arte. Por supuesto, el código genético es bien conocido en el arte. De este modo, será rutinario para un experto en la materia generar dichas variantes degeneradas de ácido nucleico que codifican armazones de proteína específicos de la presente invención. Ver, p. ej., Ausubel et al., supra, y tales variantes de ácido nucleico se incluyen en la presente invención.

Como se indica en la presente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención las cuales comprenden ácido nucleico que codifica una estructura de proteína pueden incluir, pero no están limitadas a, aquellas que codifican la secuencia de amino ácidos de un fragmento de la estructura de proteína, por sí mismas; la secuencia codificadora de la estructura de proteína completo o una porción del mismo; la secuencia codificadora de una estructura de proteína, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, tales como la secuencia codificadora de al menos un director de señal o péptido de fusión, con o sin las citadas secuencias codificadoras adicionales, tales como al menos un intron, junto con adicionales secuencias no-codificadoras, incluyendo pero no limitándose a, secuencias no-codificadoras 5' y 3', como las transcritas, secuencias no-traducidas que juegan un papel en la transcripción, procesamiento de mARN, incluyendo señales de corte y empalme de poliadenilación (por ejemplo, aglutinante de ribosoma y estabilidad de mARN); una secuencia codificadora adicional que codifica amino ácidos adicionales, como las que proporcionan funcionalidades adicionales. De este modo, la secuencia codificadora de armazones de proteína puede ser fusionada con una secuencia marcadora, como la secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación dla estructura de proteína fusionado que comprende porciones o fragmentos de la estructura de proteína.

65 **Polinucleótido Hibridizado Selectivamente con un Polinucleótido como se Describe en la Presente**

Mediante la presente se describen ácidos nucleicos que hibridizan bajo condiciones de hibridación selectivas con un polinucleótido descrito en la misma. Así, los polinucleótido de esta realización pueden ser empleados para aislar, detectar y/o cuantificar los ácidos nucleicos que comprenden los citados polinucleótido. Por ejemplo, los polinucleótido de la presente descripción pueden ser empleados para identificar, aislar o amplificar clones de longitud total o parcial en la colección depositada. En algunas realizaciones, los polinucleótido son genómicos o secuencias de cADN aisladas, o de otras maneras complementarias a, cADN de una colección de ácidos nucleicos humano o mamífero.

Preferiblemente, la colección de cADN comprende al menos el 80% de secuencias de longitud total, preferiblemente, al menos el 85% o 90% de secuencias de longitud completa, y, más preferiblemente, al menos el 95% de secuencias de longitud completa. Las colecciones de cADN pueden ser normalizadas para aumentar la representación de secuencias raras. Las condiciones de hibridación de rigor bajo o moderado son generalmente, pero no exclusivamente, empleados con secuencias que tienen una secuencia de identidad reducida relativa a las secuencias complementarias. Las condiciones de rigor moderadas y altas pueden opcionalmente se utilizadas por secuencias de mayor identidad. Las condiciones de bajo rigor permiten la hibridación selectiva de secuencias que con un 70% de secuencia de identidad pueden ser utilizadas para identificar secuencias ortólogas o paralogas.

Opcionalmente, los polinucleótido de esta descripción codificaran al menos una porción de una estructura de proteína Id codificado por los polinucleótido descritos en la presente. Los polinucleótido de esta descripción abarcan secuencias de ácido nucleico que pueden ser empleadas para la hibridación selectiva con un polinucleótido que codifica una estructura de proteína de la presente invención. Ver, p. ej., Ausubel et al., supra; Colligan, supra.

Construcción de Ácidos Nucleicos

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden ser realizados utilizando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, y/o (d) combinaciones de las mismas, como bien se conoce en el arte.

Los ácidos nucleicos pueden según conveniencia comprender secuencias adicionales al polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, un área de multi-clonación que comprende uno o más áreas de restricción de endonucleasa puede ser insertado en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. También, pueden insertarse secuencias traducibles para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona los medios convenientes para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención, excluyendo la secuencia codificadora, es opcionalmente un vector, adaptador, o enlace para la clonación y/o expresión de un polinucleótido de la presente invención.

Secuencias adiciones pueden ser añadidas a dichas secuencias de clonación y/o expresión para optimizar su función en clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido en la célula. El uso de los vectores clonadores, vectores de expresión, adaptadores y enlaces es bien conocido en el arte. (Ver, p. ej., Ausubel et al., supra; o Sambrook, supra).

Métodos de Recombinación para la Construcción de Ácidos Nucleicos

Las composiciones de ácidos nucleicos aislados de esta descripción, tales como el ARN, cADN, ADN genómico, o cualquier combinación de las mismas, pueden obtenerse de fuentes biológicas utilizando cualquier cantidad de metodologías de clonación conocidas en el arte. En algunas realizaciones, se emplean para identificar la secuencia deseada de una colección de cADN o ADN genómico, sondas de oligonucleótidos que hibridizan selectivamente, bajo rigurosas condiciones, con los polinucleótido de la presente descripción. El aislamiento del ARN, la construcción de cADN y colecciones genómicas son bien conocidas para los expertos en la materia. (Ver, p. ej., Ausubel et al., supra; o Sambrook, supra).

Representación del Ácido Nucleico y Métodos de Aislamiento

Una colección de cADN o genómica puede ser representada utilizando una sonda basada en una secuencia de polinucleótido de la presente invención, tales como las descritas en la misma. Las sondas pueden utilizarse consecuencias de ADN genómico o cADN para aislar genes homólogos en el mismo o diferentes organismos. Aquellos expertos en la materia apreciaran que pueden ser empleados en el ensayo varios grados de rigor de hibridación; y además de la hibridación el medio de lavado también puede ser riguroso. Según las condiciones para la hibridación se vuelven más rigurosas, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que se dé la duplicidad. El grado de rigor puede ser controlado por uno o más de entre temperatura, fuerza iónica, pH y presencia de solventes parcialmente desnaturizantes, como la formamida. Por ejemplo, el rigor de la hibridación varía según conveniencia mediante el cambio de la polaridad de la solución reactante a través de, por ejemplo, la manipulación de la concentración de formamida en un rango de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido para la detección de aglutinantes variara de

acuerdo con el rigor del medio de hibridación y/o medio de lavado. El grado de complementariedad será, de manera óptima, 100%, o 70-100%, o cualquier rango o valor entre los mismos. De cualquier modo, debe entenderse que variaciones de secuencia mínimas en las sondas y cebadores pueden compensarse reduciendo el rigor de la hibridación y/o medio de lavado.

5 Son conocidos en la materia los métodos de amplificar el ARN o ADN y pueden utilizarse de acuerdo con la presente descripción sin excesiva experimentación, basándose en las indicaciones y guías descritos en la presente.

10 Entre los métodos conocidos para la amplificación de ADN o ARN se incluyen, pero no se limitan a, reacciones de cadenas de polimerasa (PCR) y procesos de amplificación relacionados (ver, p. ej., U.S. Patent Nos. 4.683.195, 4.683.202, 4.800.159, 4.965.188 de Mullis et al.; 4.795.699 y 4.921.794 de Tabor et al.; 5.142.033 de Innis; 5.122.464 de Wilson et al.; 5.091.310 de Innis; 5.066.584 de Gyllensten et al.; 4.889.818 de Gelfand et al.; 4.994.370 de Silver et al.; 4.766.067 de Biswas; 4.656.134 de Ringold) y amplificación mediante ARN que emplea ARN anti-sentido con la secuencia objetivo como modelo para la síntesis de ADN de doble cadena (U.S. Patent No. 5.130.238 de Malek et al., con el nombre comercial NASBA) (Ver, p. ej., Ausubel, supra; o Sambrook, supra).

15 Por ejemplo, puede utilizarse la tecnología de reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para amplificar las secuencias de los polinucleótido de la presente invención y los genes directamente relacionados de colecciones de ADN genómico o cADN. El PCR y otros métodos de amplificación in vitro también pueden ser útiles, por ejemplo, para clonar secuencias codificadoras de ácido nucleico para la expresión de proteínas, para hacer que los ácidos nucleicos sean utilizados como sondas para detectar la presencia del mRNA deseado en las muestras, para la secuenciación de ácido nucleico, u otros propósitos. Ejemplos de técnicas, suficientes para dirigir personas experimentadas, a través de métodos de amplificación se encuentran en Berger, supra, Sambrook, supra, y Ausubel, supra, así como en Mullis et al., U.S. Patent No. 4.683.202 (1987); e Innis et al., PCR Protocols A Guide to Methods and Applications, Eds., Academic Press Inc., San Diego, CA (1990). Kits comercialmente disponibles para la ampliación de PCR genómico son conocidos en el arte. Ver, p. ej., Advantage-GC Genomic PCR Kit (Clontech). Además, p. ej., la proteína 32 del gen T4 (Boehringer Mannheim) puede emplearse para mejorar el rendimiento de los productos de PCR largo.

30 **Métodos Sintéticos para la Construcción de Acido Nucleicos**

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención también pueden ser preparados por síntesis química directa mediante métodos conocidos (ver, p. ej., Ausubel et al., supra). La síntesis química generalmente produce un oligonucleótido de cadena sencilla, el cual puede ser convertido en ADN de cadena doble por hibridación con una secuencia complementaria, o por polimerización con una polimerasa de ADN utilizando la cadena sencilla como modelo. Un experto en la materia reconocerá que mientras la síntesis química del ADN puede ser limitada a secuencias de alrededor de 100 bases o más, las secuencias largas se pueden obtener mediante la ligadura de secuencias más cortas.

40 **Casetes de Expresión Recombinante**

La presente descripción, además proporciona, casetes de expresión recombinante que comprenden un ácido nucleico de la presente invención. Una secuencia de ácido nucleico de la presente invención, por ejemplo, un cADN o una secuencia genómica que codifica una estructura de proteína de la presente invención, puede ser utilizado para construir un casete de expresión recombinante que puede ser introducido en al menos una célula huésped deseada. Un casete de expresión recombinante generalmente comprenderá un polinucleótido de la presente invención operativamente enlazado a secuencias reguladoras de la iniciación transcripcional que dirigirán la transcripción del polinucleótido en la célula huésped destinada a ello. Ambos promotores heterólogos y no-heterólogos (p. ej., endógenos) pueden ser empleados para dirigir la expresión del ácido nucleico de la presente invención.

50 En algunas realizaciones, los ácidos nucleicos aislados que sirven como promotores, potenciadores u otros elementos pueden ser introducidos en la posición adecuada (aguas arriba, aguas abajo o en el intrón) de una forma no-heteróloga de un polinucleótido de la presente invención de manera que arriba o abajo regule la expresión de un polinucleótido de la invención. Por ejemplo, promotores endógenos pueden ser alterados in vivo o in vitro por mutación, supresión y/o sustitución.

60 **Vectores y Células Huésped**

La presente invención también se refiere a vectores que incluyen moléculas de ácido nucleico aislado de la presente invención, células huésped que generalmente son diseñadas con vectores recombinantes, y la producción de al menos una estructura de proteína mediante técnicas recombinantes, como se conoce en el arte. Ver, p. ej., Sambrook et al., supra; Ausubel et al., supra.

65 Los polinucleótidos pueden ser enlazados opcionalmente a un vector que contenga un indicador seleccionable para la propagación en un huésped. Generalmente, se introduce un vector plásmido en un precipitado, como el precipitado de fosfato cálcico, o en un complejo con un lípido cargado. Si el vector es un virus, puede ser

empaquetado in vitro utilizando una línea celular empaquetadora adecuada y después transducida en células huésped.

El ADN insertado debe ser enlazado a un promotor adecuado. Las construcciones de expresión además contendrán zonas para la iniciación de la transcripción, terminación y, en la región transcrita, una zona de unión al ribosoma para la transcripción. La porción codificadora de las transcripciones maduras expresada por las construcciones incluirá preferiblemente un inicio de transcripción al principio y al final del codón (p. ej., UAA, UGA o UAG) apropiadamente posicionado al final del mRNA para ser traducido, con UAA y UAG preferentemente para expresiones de células mamíferas o eucarióticas.

Los vectores de expresión, preferiblemente, pero de manera opcional, incluyen al menos un indicador seleccionable. Dichos marcadores incluyen, p. ej., pero no están limitados a, metotrexato (MTX), reductasa de dihidrofolato (DHFR, US Pat. Nos. 4.399.216; 4.634.665; 4.656.134; 4.956.288; 5.149.636; 5.179.017), ampicilina, neomicina (G418), ácido micofenólico, o sintetasa de glutamiona (GS, US Pat. Nos. 5.122.464; 5.770.359; 5.827.739) resistencia al cultivo de células eucarióticas, y tetraciclina o genes resistentes a la ampicilina para el cultivo en *E. coli* y otras bacterias o procariontos. Se conocen en el arte los medios y condiciones de cultivo adecuados para las células huésped arriba descritas. Para el experto en la materia los vectores adecuados serán evidentes. La introducción de una construcción de vector en una célula huésped puede verse afectada por transfección de fosfato de calcio, transfección por medio de DEAE-dextran, transfección mediante lípido catiónico, electroporación, transducción, infección u otros métodos conocidos. Dichos métodos son descritos en el arte, por tales como Sambrook, supra, capítulos 1-4 y 16-18; Ausubel, supra, capítulos 1, 9, 13, 15, 16.

Al menos una estructura de proteína de la presente invención puede ser expresado en forma modificada, como una proteína de fusión, y puede incluir no solo señales de secreción, sino que también regiones funcionales heterologas adicionales. Por ejemplo, una región de amino ácidos adicionales, amino ácidos particularmente cargados, pueden ser añadidos al termino-N de una estructura de proteína para mejorar la estabilidad y persistencia en la célula huésped, durante la purificación o durante la subsecuente manipulación y almacenado. También, pueden ser añadidos restos de péptidos a una estructura de proteína de la presente invención para facilitar la purificación. Estas regiones pueden ser eliminadas antes de la preparación final de una estructura de proteína o al menos un fragmento de las mismas. Dichos métodos están descritos en muchos manuales estándar de laboratorio, tales como Sambrook, supra, capítulos 17.29-17.42 y 18.1-18.74; Ausubel, supra, capítulos 16, 17 y 18.

Los expertos en la materia son conocedores de los numerosos sistemas de expresión disponibles para la expresión de un ácido nucleico codificador de una proteína de la presente invención. Alternativamente, los ácidos nucleicos de la presente invención pueden ser expresados en una célula huésped activando (por manipulación) en una célula huésped que contiene ADN endógeno que codifica una estructura de proteína de la presente invención. Dichos métodos son conocidos en el arte, p. ej., como se describe en US Patent Nos. 5.580.734, 5.641.670, 5.733.746 y 5.733.761.

Las bacterias, levaduras y células de mamíferos son ilustrativas de cultivos de células, útiles para la producción de armazones de proteína, porciones específicas o variantes de las mismas, como se conoce en el arte. Los sistemas de células mamíferas se encontrarán, a menudo, en forma de mono capas de células, aunque las suspensiones de células mamíferas o bio-reactores pueden ser utilizados. En el arte se han desarrollado numerosas líneas de células huésped adecuadas, capaces de expresar proteínas glicosilatadas intactas, e incluyen el COS-1 (p. ej., ATCC CRL 1650), COS-7 (p. ej., ATCC CRL-1651), HEK293, BHK21 (p. ej., ATCC CRL-10), CHO (P. ej., ATCC CRL 1610) y BSC-1 (p. ej., ATCC CRL-26) líneas celulares, células COS-7, células CHO, Células hep G2, P3X63Ag8.653, SP2/0-Ag14, células 293, células HeLa y similares, las cuales están disponibles en, por ejemplo, American Type Culture Collection, Manassas, Va (www.atcc.org). Las células huésped preferentes incluyen células de origen linfocítico, como las células de mieloma y linfoma. Las células huésped particularmente preferentes son las células P3X63Ag8.653 (ATCC Accession Number CRL-1851). En una realización preferente, la célula recombinante es P3X63Ag8.653 o SP2/0-Ag14.

Los vectores de expresión para estas células pueden incluir una o más de las siguientes expresiones de secuencias de control, tales como, pero no limitándose a, un origen de réplica; un promotor (p. ej., promotores tardíos o tempranos SV40, el promotor CMV (US Pat. No. 5.168.062; 5.385.839), un promotor HSV tk, un promotor pgk (fosfoglicerato kinasa), un promotor EF-1 alfa (US Pat. No. 5.266.491), al menos un promotor humano; un potenciador, y/o zonas de procesado de información, como zonas de aglutinamiento de ribosoma, zonas de empalme de ARN, zonas de poliadenilación (p. ej. una zona de adición de un SV40 large T Ag poly A) y secuencias terminadoras de la transcripción. Ver, p. ej. Ausubel et al., supra; Sambrook et al., supra. Otras células útiles para la producción de ácidos nucleicos o proteínas de la presente invención son conocidas y/o disponibles, por ejemplo, en el American Type Culture Collection Catalogue of Cell Lines and Hybridomas (www.atcc.org) u otras fuentes conocidas o comerciales.

Cuando se emplean células huésped eucarióticas, generalmente se incorporan en el vector secuencias de terminación de transcripción o poliadenilación. Un ejemplo de secuencia de terminación es la secuencia de poliadenilación de un de hormona de crecimiento bovino. También pueden incluirse secuencias para el empalme

preciso de la transcripción. Un ejemplo de secuencia de empalme es el intron VP1 del SV40 (Sprague et al., J. Virol. 45:773-781983)). Adicionalmente, pueden incorporarse al vector secuencias genéticas para controlar la réplica en la célula huésped, como se conoce en el arte.

5 Purificación de una estructura de Proteína

Una estructura de proteína puede ser recuperado y purificado de un cultivo de células recombinantes por métodos conocidos entre los que se incluye, pero no limitándose a, purificación por proteína A, precipitación de sulfato de amonio o etanol, extracción ácida, cromatografía de intercambio de aniones o cationes, cromatografía de fosfocelulosa, cromatografía de iteración hidrofóbica, cromatografía de afinidad, cromatografía de hidroxapatita y cromatografía de lectina. Cromatografía líquida de alto rendimiento ("HPLC") también puede ser empleada para la purificación. Ver, p. ej., Colligan, *Current Protocols in Immunology* ó *Current Protocols in Protein Science*, John Wiley & Sons, NY, NY, (1997-2001), p. ej., capítulos 1, 4, 6, 8, 9, 10.

Los armazones de proteína de la presente descripción incluyen productos purificados naturalmente, productos de procesos químicos sintéticos y productos producidos mediante técnicas de recombinación de un huésped procariontico o eucariotico, incluyendo, por ejemplo, E. coli, levadura, células de plantas superiores, insectos o mamíferos. Dependiendo del huésped utilizado en el proceso de producción recombinante, la estructura de proteína de la presente invención puede ser glicosilado o no-glicosilado. Dichos métodos están descritos en múltiples manuales de laboratorio, con Sambrook, supra, Sections 17.37-17.42; Ausubel, supra, Chapters 10, 12, 13, 16, 18 y 20; Colligan, *Protein Science*, supra, Chapters 12-14.

Códigos de Amino Ácidos

Los amino ácidos que forman los armazones de proteína de la presente invención son frecuentemente abreviados. La designación de amino ácidos puede estar indicada por designación del amino ácido con código de letra única, código de tres letras, nombre, o tres codones nucleótidos y es conocido en el arte (ver Alberts, B. et al., *Molecular Biology of the Cell*, Third Ed., Garland Publishing, Inc., New York, 1994). Una estructura de proteína de la presente invención puede incluir la sustitución, eliminación o adición de uno o más amino ácidos, así como mutaciones naturales o por manipulación humana, tal y como se especifica en la presente. Se pueden identificar mediante métodos conocidos en el arte, los amino ácidos en una estructura de proteína de la presente invención que sean esenciales para la correcta función, como la mutagénesis dirigida a una zona o mutagénesis de barrido de alanina (p. ej., Ausubel, supra, Chapters 8, 15; Cunningham and Wells, *Science* 244: 1081-1085 (1989)). Este último procedimiento introduce mutaciones simples de alanina en cada residuo de la molécula. Las moléculas mutantes resultantes son después probadas para la actividad biológica, tales como, pero no limitándose a, al menos una actividad neutralizadora. Las zonas críticas para la unión de la estructura de proteína también pueden ser identificadas mediante análisis estructural, como la cristalización, resonancia magnética nuclear o indicadores de foto-afinidad (Smith et al., *J. Mol. Bio.* 224:899-904 (1992) y de Vos, et al., *Science* 255:306-312 (1992)).

Tal como los expertos podrán apreciar, la presente invención incluye al menos una estructura de proteína de la presente invención biológicamente activo. Los armazones de proteína biológicamente activos tienen una actividad específica de al menos el 20%, 30%, o el 40% y preferiblemente al menos el 50%, 60% o 70% y más preferiblemente, al menos el 80%, 90% o 95%-100% o más de los armazones de proteínas nativos (no sintéticos), endógenos o relacionados y conocidos. Los métodos de ensayo y medidas de cuantificación de la actividad enzimática y especificidad de sustrato son bien conocidos por los expertos en la materia.

Por otra parte, la descripción relata que los armazones de proteína y sus fragmentos, tal y como se describe en la presente, son modificados por el enlace covalente de restos orgánicos. Tal modificación puede producir un fragmento de la estructura de proteína con propiedades fármaco-kinésicas mejoradas (p. ej., aumento de la vida media del suero in vivo). Los restos orgánicos pueden ser de un grupo hidrófilo de polímeros ramificados o lineares, un grupo de ácidos grasos o un grupo éster de ácidos grasos. En realizaciones particulares, el grupo de polímeros hidrófilos puede tener un peso molecular de entre 800 y 120.000 Daltons y puede ser un glicol polialcalino (p. ej., glicol polietileno (PEG), glicol polipropileno (PPG)), polímero carbohidrato, polímero amino ácido o pirrolidona de polivinilo, y el ácido graso o grupo éster de ácidos grasos puede comprender entre ocho y cuarenta átomos de carbono.

Los armazones de proteína y fragmentos modificados de la presente invención pueden comprender uno o más restos orgánicos que son covalentemente enlazados, directa o indirectamente, al anticuerpo. Cada resto orgánico que es enlazado a una estructura de proteína o fragmento de la invención puede ser independientemente un grupo de polímeros hidrófilos, un grupo de ácidos grasos o un grupo éster de ácidos grasos. Tal y como se emplea en la presente, el término "ácido graso" abarca ácidos mono-carboxílicos y ácidos di-carboxílicos. Un "grupo de polímeros hidrófilos" tal y como se emplea en la presente, se refiere a un polímero orgánico que más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. De este modo, la estructura de proteína modificado por enlace covalente de polilisina está recogido por la invención. Los polímeros hidrófilos adecuados para modificar armazones de proteína de la invención pueden ser lineares o ramificados e incluir, por ejemplo, glicoles polialcanos (p. ej., PEG, glicol monometoxi-polietileno (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (p.

ej., dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de amino ácidos hidrófilos (p. ej., polilisina, poliarginina y similares), óxidos polialcanos (p. ej., óxido de polietileno, óxido de polipropileno y similares) y piroldiona de polivinilo. Preferiblemente, el polímero hidrófilo que modifica la estructura de proteína de la invención tendrá un peso molecular de entre 800 y 150.000 Dalton como entidad molecular separada. Por ejemplo, puede emplearse, PEG₅₀₀₀ y PEG_{20.000}, en los cuales el subíndice es el peso molecular medio del polímero en Dalton. El grupo polimérico hidrófilo puede ser sustituido con entre uno y seis alquilos, ácidos grasos o grupo éster de ácidos grasos. Los polímeros hidrófilos que son sustituidos por un ácido graso o grupo éster de ácidos grasos pueden ser preparados por medio de numerosos métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo de aminos puede acoplarse a un carboxilato de un ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (p. ej., activado con N, N-carbonilo diimidazol) de un ácido graso o éster de ácido graso puede ser acoplado a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y grupos éster de ácidos grasos adecuados para modificar los armazones de proteína de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de in-saturación. Los ácidos grasos que son adecuados para modificar los armazones de proteína de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquidato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), cis- Δ 9-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos los cis- Δ 5,8,11,14-eicosatetraenoato (C₂₀, araquidonato), ácido octanodioico, ácido tetradecanodioico, ácido octadecanodioico, ácido docosanodioico, y similares. Entre los ésteres de ácidos grasos adecuados se incluyen mono-ésteres de ácidos di carboxílicos que comprenden grupos bajos en alquilos lineares o ramificados. Los grupos bajos en alquilos pueden comprender entre uno y doce, preferiblemente, entre uno y seis, átomos de carbono.

Los armazones de proteína y fragmentos modificados pueden ser preparados utilizando métodos adecuados, tales como la reacción con uno o más agentes modificadores. Un "agente modificador" tal y como el término es empleado en la presente, se refiere a un grupo orgánico adecuado (p. ej., polímero hidroclicórico, un ácido graso, o un éster de ácido graso) que comprende un grupo activador. Un "grupo activador" es un resto químico o grupo funcional que puede, bajo condiciones adecuadas, reaccionar con un segundo grupo químico del mismo formando un enlace covalente entre el agente modificador y el segundo grupo químico. Por ejemplo, los grupos activadores de amino reactivos incluyen grupos electrofilicos, como el tosilato, mesilato, halo (cloro, bromo, flúor, yodo), éster N-hidroxisucinimidilo (NHS), y similares. Los grupos activadores que pueden reaccionar con tioles incluyen, por ejemplo, maleimida, iodo-acetilo, acrililoilo, di-sulfitos de piridilo, ácido tiol 5-tiol-2-nitrobenzoico (TNB-tiol) y similares. Un grupo de aldehídos funcionales puede acoplarse a una amina - o hidracida -que contienen moléculas, y un grupo ácido puede reaccionar con un grupo fosforoso trivalente para formar enlaces de fosforamido o fosforamida. Métodos adecuados para introducir grupos activadores en moléculas son conocidos en el arte (ver como ejemplo, Hermanson, G. T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996)). Un grupo activador puede ser directamente enlazado al grupo orgánico (p. ej., polímero hidrófilo, ácido graso, éster de ácido graso), o a través de un resto conector, por ejemplo, un grupo C₁-C₁₂ divalente en el cual uno o más átomos de carbono pueden ser reemplazados por un hetero-átomo, como el oxígeno, nitrógeno o azufre. Entre los restos conectores adecuados se incluyen, por ejemplo, el glicol tetra-etileno, (CH₂)₃, NH-(CH₂)₆-NH, (CH₂)₂-NH y CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH₂-CH₂-O-CH-NH. Los agentes modificadores que comprenden un resto conector pueden ser producidos, por ejemplo, mediante reacción de un mono-Boc-alquildiamina (p. ej., mono-Boc-etilenodiamona, mono-Boc-diaminohexano) con un ácido graso en presencia de 1-etil-3-(3-dimetilaminopropilo) carbodiimida (EDC) para formar un enlace amido entre la amina libre y el ácido graso carboxilato. El grupo protector de Boc puede ser eliminado del producto mediante tratamiento con ácido trifluoroacético (TFA) para exponer una amina primaria que pueda ser acoplada a otro carboxilato, tal y como se ha descrito, o puede reaccionar con anhídrido maleico y el producto resultante ciclado para producir un maleimido activado derivado del ácido graso. (Ver, por ejemplo, Thompson et al., WO 92/16221).

La estructura de proteína de la descripción puede producirse mediante reacción de una estructura de proteína o fragmento con un agente modificador. Por ejemplo, los restos orgánicos pueden ser enlazados a una estructura de proteína en un modo de zona no específica mediante empleo de un agente modificador amino reactivo, por ejemplo, un éster NHS de PEG. Los armazones de proteína modificados que comprenden un resto orgánico pueden prepararse utilizando métodos adecuados, tales como proteólisis reversa (Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992); Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994); Kumaran et al., Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1):59-68 (1996); Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997) y los métodos descritos en Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Composiciones de Armazones de Proteína que comprenden más Ingredientes Terapéuticamente Activos

Las composiciones de armazones de proteína de la invención, opcionalmente, pueden comprender una cantidad efectiva de al menos un compuesto o proteína (molécula pequeña o grande) seleccionada de al menos uno de los fármacos anti-infecciosos, un fármaco del sistema cardio-vascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autonómico (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de los fluidos o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmunomodulador, un fármaco oftalmológico, ótico o nasal, un

fármaco nutricional o similares. Dichos fármacos son conocidos en el arte, incluyendo la formulación, indicación, dosificación y administración para cada uno presentado en la misma (ver, p. ej., Nursing 2001 handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug Guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-hall, Inc, Upper Saddle River, NJ; Pharmacotherapy Handbook, Wells et al., ed., Appleton & Lange, Stamford, CT).

5

El fármaco anti-infeccioso puede ser al menos uno seleccionado entre amebicidas o al menos uno entre anti protozoarios, antihelmínticos, anti fúngicos, anti-maláricos, anti-tuberculosos o al menos uno de entre antipiréticos, amino glucósidos, penicilina, cefalosporinas, tetraciclinas, sulfonamidas, fluoroquinolonas, antivirales, macrólidos anti-infecciosos y misceláneas anti-infecciosas. El fármaco CV puede ser al menos uno seleccionado entre inotrópicos, anti-arritmicos, anti-anginosos, anti-hipertensivos, antilipémicos, y una miscelánea de fármacos cardiovasculares. El fármaco CNS puede ser al menos uno seleccionado de entre analgésicos no narcóticos o al menos uno de entre antipiréticos, fármaco no esteroide anti-inflamatorio, narcótico o al menos un analgésico opiáceo, sedantes hipnóticos, anticonvulsivos, antidepressivos, fármacos anti-ansiedad, antisicóticos, estimulantes del sistema nervioso central, anti-Parkinson, y una miscelánea de Fármacos para el sistema nervioso central. El fármaco ANS puede ser al menos uno seleccionado de entre colinérgicos (parasimpatomimético), anticolinérgicos, adrenérgicos (simpatomiméticos), bloqueadores adrenérgicos (simpatolíticos), relajantes musculares esqueléticos, y bloqueadores neuromusculares. El fármaco del tracto respiratorio puede ser al menos uno seleccionado de entre antihistamínicos, bronquio-dilatadores, expectorantes o al menos uno de entre anti-tusivos, y una miscelánea de fármacos para el tracto respiratorio. Los fármacos para el tracto GI puede ser al menos uno seleccionado de entre antiácidos o al menos uno adsorbente o al menos un anti-flatulencias, enzima digestiva o al menos un solubilizante de cálculos biliales, anti-diarreico, laxante, antiemético y fármaco anti-ulceroso. El fármaco hormonal puede ser al menos uno seleccionado de entre cortico-esteroides, andrógenos o al menos un esteroide anabólico, estrógeno o al menos una progestina, gonadotropina, fármaco anti-diabético o al menos un glucagón, hormona tiroidea, antagonista de la hormona tiroidea, hormona pituitaria, y fármacos similares a los paratiroides. El fármaco para el equilibrio de fluidos y electrolitos puede ser al menos uno seleccionado de entre diuréticos, electrolitos o al menos una solución reemplazante, acidulante o al menos un alcalinizador. El fármaco hematológico puede ser al menos uno seleccionado de entre anti anémicos, anticoagulantes, derivados de la sangre y enzimas trombolíticas. Los antineoplásicos pueden ser al menos uno seleccionado de entre fármacos alquilantes, anti-metabolitos, antibiótico antineoplásico, antineoplásicos que pueden alterar el equilibrio hormonal, y una miscelánea de antineoplásicos. El fármaco inmunomodulador puede ser al menos uno seleccionado de entre inmunosupresores, vacunas o al menos un toxoide, antitoxina o al menos una antitoxina, suero inmune, y modificador de la respuesta biológica. Los fármacos oftalmológicos, óticos y nasales pueden ser al menos uno seleccionado de entre anti-infeccioso oftalmológico, anti-inflamatorio oftalmológico, mióticos, midriáticos, vasoconstrictores oftalmológicos, misceláneas oftalmológicas, fármacos óticos y nasales. El fármaco tópico puede ser al menos uno seleccionado de entre anti-infecciosos locales, escabicidas o al menos un pediculicida o corticosteroide tópico. El fármaco nutricional puede ser al menos uno seleccionado de entre vitaminas, minerales, o calóricos. Ver, p.ej. el contenido de Nursing 2001 Drug Handbook, supra.

Al menos un amebicida o anti-protozoario puede ser al menos uno seleccionado de entre atovacuna, clorhidrato de cloroquina, fosfato de cloroquina, metronidazol, clorhidrato de metronidazol, e isetonato de pentamidina. Al menos un vermífugo puede ser al menos uno seleccionado de entre mebendazol, pamoato de pirantel y tiabendazol. Al menos un anti-fúngico puede ser al menos uno seleccionado de entre anfotericina B, complejo de anfotericina B sulfato de colesterol, complejo lípido anfotericina B, liposoma de anfotericina B, fluconazol, flucitosina, microfromato de griseofulvina, ultra-microfromato de griseofulvina, itraconazol, ketoconazol, nistatina y clorhidrato de terbinafina. Al menos un antipalúdico puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de cloroquina, fosfato de cloroquina, sulfato hidroxiclороquina, clorhidrato de mefloquina, fosfato de primaquina, pirimetamina y pirimetamina con sulfadoxina. Al menos un anti-tuberculoso o anti-lepra puede ser al menos uno seleccionado de entre clofacimina, cicloserina, dapsona, clorhidrato de etambutol, isoniazida, pirazinamida, rifabutino, rifampicina, y sulfato de estreptomina. Al menos un aminoglicosido puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato de amikacina, sulfato de gentamicina, sulfato e neomicina, sulfato de estreptomina, y sulfato de tobramicina. Al menos una penicilina puede ser uno seleccionado de entre amoxicilina/clavulanato de potasio, amoxicilina trihidrato, ampicilina, sodio de ampicilina, trihidrato de ampicilina, sodio de ampicilina/sodio de sulbactam, sodio de cloxacilina, sodio de dicloxacilina, sodio de mezlocilina, sodio de nafcilina, sodio de oxacilina, benzatino de penicilina G, potasio de penicilina G, procaina de penicilina G, sodio de penicilina G, potasio de penicilina V, sodio de piperacilina, sodio de piperacilina/sodio de tazobactam, disodio de ticarcilina y disodio de ticarcilina/potasio clavulanato. Al menos una cefalosporina puede ser al menos uno seleccionado de entre cefaclor, cefadroxilo, sodio de cefazolina, cefdinir, clorhidrato de cefapima, cefixima, sodio de cefmetazol, sodio cefonicido, sodio de cafoperazona, sodio de cefotaxima, disodio de cefotetan, sodio de cefoxitina, cefpodoxima proxetil, cefprozil, ceftazidima, ceftibuteno, sodio de ceftizomina, sodio de ceftriazona, cefuroxamina acetil, sodio de cefuroxamina, clorhidrato de cefalexina, monohidrato de cefalexina, cefradina, y loracarbef. Al menos una teracicilina puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de demeclociclina, calcio de doxiciclina, hclato de doxiciclina, clorhidrato de doxiciclina, monohidrato de doxiciclina, clorhidrato de minociclina y clorhidrato de tetracicilina. Al menos una sulfonamida puede ser al menos una seleccionada de entre co-trimoxazol, sulfadiazina, sulfametoxazol, sulfisoxazol y acetilo de sulfisoxazol. Al menos una fluoroquinolona puede ser al menos una seleccionada de entre mesilato de alatrofloxacina, ciprofloxacina, enoxacina, levofloxacina, clorhidrato de lomefloxacina, ácido nalidixico, norfloxacina, ofloxacina, esparfloxacina, y melisato de trovafloxacina. Al menos un

65

antiviral puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato abacavir, sodio aiclovir, clorhidrato de amantadina, amprenavir, cidofovir, melisato de delavirdina, didanosina, efavirenz, famciclovir, sodio de fomivirsen, sodio de foscarnet, ganciclovir, sulfato de indinavir, lamivudina, lamivudina/zidovudina, melisato de delavirdina, didanosina, efavirenz, famciclovir, sodio de fomivirsen, sodio de foscarnet, ganciclovir, sulfato de indinavir, lamivudina, lamivudina/zidovudina, melisato de nelfinavir, nevirapina, fosfato de oseltamivir, ribavirin, clorhidrato de rimantadina, ritonavir, saquinavir, melisatode saquinavir, estavudina, clorhidrato de valaciclovir, zalcitabina, zanamivir y zidovudina. Al menos una macro línea anti-infecciosa puede ser al menos una seleccionada de entre azitromicina, claritromicina, diritromicina, base de eritromicina, estolato de eritromicina, etlisuccionato de eritromicina, lactobionato de eritromicina, y estearato de eritromicina. Al menos una miscelánea anti-infecciosa puede ser al menos una seleccionada de entre aztreonam, bacitracina, succionato sódico de cloranfenicol, clorhidrato de clindamicina, clorhidrato de palmitato de clindamicina, fosfato de clindamicina, sodio de imipenem y cilastatina, meropenem, macrocristales de nitrofurantoina, microcristales de nitrofurantoina, quinupristina/dalfopristina, clorhidrato de espectinomicina, trimetoprim, y clorhidrato de vancomicina. (Ver, p. ej., pp. 24-214 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un inotrópico puede ser al menos uno seleccionado de entre lactato de amrinona, digoxina, y lactato de milrinona. Al menos un anti-arrítmico puede ser al menos uno seleccionado de entre adenosina, clorhidrato de amiodarona, sulfato de atropina, tosilato de bretilio, clorhidrato de diltiazem, disopiramida, fosfato de disopiramida, clorhidrato de esmolol, acetato de flecainida, fumarato de ibutilido, clorhidrato de lidocaína, clorhidrato de mexiletino, clorhidrato de moricizina, fenitoina, sodio de fenitoina, clorhidrato de procainamida, clorhidrato de propafenona, clorhidrato de propanolol, bisulfato de quinidina, gluconato de quinidina, poligalacturonato de quinidina, sulfato de quinidina, sotalol, clorhidrato de tocainida, y clorhidrato verapamil. Al menos un anti-anginoso puede ser al menos uno seleccionado de entre besilato de amlodipidina, nitrito de amilo, clorhidrato de bepridilo, clorhidrato de diltiazem, dinitrato de isosorbida, mononitrato de isosorbida, nadolol, clorhidrato de nicarpidina, nifedipina, nitroglicerina, clorhidrato de propanolol, verapamil, y clorhidrato de verapamil. Al menos un anti-hipertensivo puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de acebutolol, besilato de amlodipina, atenolol, clorhidrato de benozepiril, clorhidrato de betaxolol, fumarato de bisoprolol, candesartan cilexetil, captopril, clorhidrato de carteolol, carvedilol, clonidina, clorhidrato de clonidina, diazoxide, clorhidrato de diltiazem, mesilato de doxazosina, enalaprilato, maleato de enaprilato, mesilato de eprosartan, felodipina, mesilato de fenoldopam, sodio de fosinopril, acetato de guanabenz, sulfato de guanadrel, clorhidrato de gauanfaccina, clorhidrato de hidrazalina, irbesartan, isradipina, clorhidrato de labetalol, lisinopril, potasio de losartan, metildopa, clorhidrato de metildopa, succinato de metoprolol, tartrato de metoprolol, monoxidillo, clorhidrato de moexipril, nadolol, clorhidrato de nicarpidina, nifedipina, nisoldipina, sodio nitroprusiato, sulfato de penbutolol, erbumina de perindropilo, mesilato de fentolamina, pindolol, clorhidrato de prazosina, clorhidrato de propanolol, clorhidrato de quinapril, ramipril, telmisartan, clorhidrato de terazosin, maleato de timolol, tandrolapril, valsartan, y clorhidrato de verapamil. Al menos un antilipemico puede ser al menos uno seleccionado de entre calcio de atorvastatina, sodio de cerivastatina, colestiramina, clorhidrato de colestipol, fenofibrato (micronizado), sodio de fluvastatina, gemfibrozilo, lovastatina, niacina, sodio de pravastatina, y simvastatina. Al menos un fármaco miscelánea CV puede ser al menos uno seleccionado de entre abciximab, alprostadilo, clorhidrato de arbutamina, cilostazol, bisulfato de clopidrogel, dipiridamol, eptifabatida, clorhidrato de midodrina, pentoxifilina, clorhidrato de ticlopidina, y clorhidrato de tirofiban. (Ver, p. ej., pp. 215-336 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un analgésico no-narcótico o antipirético puede ser al menos uno seleccionado de entre acetaminofén, aspirina, magnesio trisalicilato de colina, diflunisal, y silicato de magnesio. Al menos un fármaco anti-inflamatorio no-esteroide puede ser al menos uno seleccionado de entre celecoxib, potasio diclofenaco, sodio diclofenaco, etodolac, calcio fenoprofeno, flurbiprofeno, ibuprofeno, indometacina, sodio trihidrato de indometacina, ketoprofeno, trometamina de ketolorac, nabumetona, naproxeno, sodio de naproxeno, oxaprocina, piroxicam, rofecoxib, y sulindac. Al menos un narcótico o analgésico opiáceo puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato alfentanilo, clorhidrato buprenorfina, tartrato de butorfanol, fosfato de codeína, sulfato de codeína, citrato de fentanilo, sistema transdérmico fentanilo, fentanilo transmucosal clorhidrato de hidromorfona, clorhidrato de meperidina, clorhidrato de metadona, clorhidrato de morfina, sulfato de morfina, tartrato de morfina, clorhidrato de nalbufina, clorhidrato de oxycodona, pectinato de oxycodona, clorhidrato de oximorfona, clorhidrato de pentazocina, clorhidrato de pentazocina y clorhidrato de naloxona, lactato de pentazocina, clorhidrato de propoxifeno, napsilato de propoxifeno, clorhidrato de remifentanilo, citrato de sufentanilo, y clorhidrato de tramadol. Al menos un sedante-hipnótico puede ser al menos uno seleccionado de entre hidrato de cloro, estazolam, clorhidrato de flurazepam, pentobarbital, sodio pentobarbital, sodio fenobarbital, sodio secobarbital, temazepam, triazolam, zaleplon, y tartrato de zolpidem. Al menos un anti-convulsivo puede ser al menos uno seleccionado de entre sodio acetazolamida, carbamazepina, clonazepam, dipotasio clorazepato, diazepam, sodio divalproex, etosuximide, sodio fosfenitoina, gabapentina, lamotrigina, sulfato de magnesio, fenobarbital, sodio de fenobarbital, fenitoina, sodio de fenitoina, sodio de fenitoina (extendida), primidona, clorhidrato de tiagabina, topiramato, sodio valproato, y ácido valproato. Al menos un antidepresivo puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de amitriptilina, pamoato de amitriptilina, amoxapina, clorhidrato de bupropión, bromhidrato de citalopram, clorhidrato de clomipramina, clorhidrato de desipramina, clorhidrato de doxepina, clorhidrato de fluoxetina, clorhidrato de imipramina, pamoato de imipramina, mirtazapina, clorhidrato nefazodona, clorhidrato de nortriptilina, clorhidrato de paroxetina, sulfato de fenecina, clorhidrato de sertralina, sulfato de tranilcipromina, maleato de trimipramina, y clorhidrato de venlafaxina. Al menos un fármaco anti-ansiedad puede ser al menos uno seleccionado de entre alprazolam, clorhidrato de buspirona, clordiazepóxido, clorhidrato de clordiazepóxido, dipotasio de clorazepato, diazepam, clorhidrato de doxepina,

embonato hidroxizina, pamoato de hidroxizina, lorazepam, mefrobamato, clorhidrato de midazolam, y oxazepam. Al menos un fármaco anti-psicótico puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de clorpromacina, clozapina, decanoato de flufenacina, enantato de flufenacina, clorhidrato de flufenacina, haloperidol, decanoato de haloperidol, lactato de haloperidol, clorhidrato loxapina, succinato de loxapina, besilato de mesoridacina, clorhidrato de molindona, olanzapina, perfenacina, primocida, proclorperacina, fumarato de quetiapina, risperidona, clorhidrato de tioridacina, tiotixeno, clorhidrato tiotixeno, y clorhidrato trifluoperacina. Al menos un simulador del sistema nervioso central puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato de anfetamina, cafeína, sulfato de dextroanfetamina, clorhidrato de doxapram, clorhidrato de metanfetamina, clorhidrato de metilfenidato, modafinilo, y clorhidrato de metanfetamina. Al menos un anti-parkinsoniano puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de amantadina, mesilato de bztropina, clorhidrato de biperideno, lactato de bipiredeno, mesilato de bromocriptina, carbidopa-levodopa, entacapona, levodopa, mesilato de pergolida, dihidrocloruro de pramipexol, clorhidrato de ropinirol, clorhidrato de selegilina, tolcapona, y clorhidrato de trihexifenidil. Al menos un fármaco misceláneo del sistema nervioso central puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de bupropión, clorhidrato de donepecilo, droperidol, maleato de fluvoxamina, carbonato de litio, citrato de litio, clorhidrato de naratriptano, polacrilex de nicotina, sistema de nicotina transdérmico, propofol, benzoato de rizatriptano, clorhidrato de sibutramina monohidrato, succinato de sumatriptan, clorhidrato de tacrina, y zolmitriptano. (Ver, p. ej., pp 337-530 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un colinérgico (p. ej., parasimatomimético) puede ser al menos uno seleccionado de entre cloruro de betanecol, cloruro de edrofonio, bromuro de neostigmina, metilsulfato de neostigmina, salicilato de fisostigmina y bromuro de piridostigmina. Al menos un anti-colinérgico puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato de antropina, clorhidrato de diciclomina, glicopirrolato, hiosciamina, sulfato de hiosciamina, bromuro de propantelina, escopolamina, butilbromuro de escopolamina, y bromhidrato de escapolamina. Al menos un adrenérgico (simpatomiméticos) puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de dobutamina, clorhidrato dopamina, bitartrato de metaraminol, bitartrato de norepinefrina, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de pseudoefredina, y sulfato de pseudoefredina. Al menos un bloqueador adrenérgico (simpatolítico) puede ser al menos uno seleccionado de entre mesilato de dihidroergotamina, tartrato de ergotamina, maleato de metisergida y clorhidrato de propanolol. Al menos un relajante muscular puede ser al menos uno seleccionado de entre baclofeno, carisodropol, clorzoxazona, clorhidrato de ciclobenzaprina, sodio de datroleno, metocarbamol, y clorhidrato de tizanidina. Al menos un bloqueador neuromuscular puede ser al menos uno seleccionado de entre besilato de atracurio, besilato de cisatracurio, cloruro de doxacurio, cloruro de mivacurio, bromuro de pancuronio, bromuro de pipecuronio, bromuro de rapacuronio, bromuro de rocuronio, cloruro de succinilcolina, cloruro de tubocurarina, y bromuro de vecuronio. (Ver, p. ej., pp. 531-84 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un antihistamínico puede ser al menos uno seleccionado de entre maleato de bronfeniramina, clorhidrato de cetiricína, maleato de clorfeniramina, fumarato de clemastina, clorhidrato de ciproheptadina, clorhidrato de difenhidramina, clorhidrato de fexofenadina, y clorhidrato de tripolidina. Al menos un broncodilatador puede ser al menos uno seleccionado de entre albuterol, sulfato de albuterol, aminofilina, sulfato de atropina, sulfato de efedrina, epinefrina, bitartrato de epinefrina, clorhidrato de epinefrina, bromuro de ipratropio, isoproterenol, clorhidrato de isoproterenol, sulfato de isoproterenol, clorhidrato de levalbuterol, sulfato de metaproterenol, oxtrifilina, acetato de pirbuterol, xinafoato de salmeterol, sulfato de terbutalina, y teofilina. Al menos un expectorante o antitusivo puede ser al menos uno seleccionado de entre benzonatato, fosfato de codeína, sulfato de codeína, bromohidrato de dexametorfan, clorhidrato de difenhidramina, guafenesina, y clorhidrato de hidromorfona. Al menos un fármaco misceláneo respiratorio puede ser al menos uno seleccionado de entre acetil cisteína, dipropionato de beclometasona, beractant, budesonida, calfactant, sodio cromolín, alfa dornasa, sodio nedocromilo, palivizumab, acetona de triamcinolona, zafirlukast y cileuton. (Ver, p. ej., pp. 585-642 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un anti-acido, adsorbente o anti-flatulencias puede ser al menos uno seleccionado de entre carbonato de aluminio, hidróxido de aluminio, carbonato cálcico, magaldrato, hidróxido de magnesio, óxido de magnesio, simeticona, y bicarbonato sódico. Al menos una enzima digestiva o solubilizador gástrico puede ser al menos uno seleccionado de entre pancreatina, pancrelipasa, y ursodiol. Al menos un anti-diarreico puede ser al menos uno seleccionado de entre atapulgita, subsalicilato de bismuto, policarbofilo de calcio, clorhidrato de difenoxilato y sulfato de atropina, loperamida, acetato octreotido, tintura de opio y tintura de opio (alcanforado). Al menos un laxante puede ser al menos uno seleccionado de entre bisocodilo, policarbofilo cálcico, cáscara sagrada, fluidextrato aromático de cáscara sagrada, fluidextrato de cáscara sagrada, aceite de ricino, calcio docusato, glicerina, lactulosa, citrato de magnesio, hidróxido de magnesio, sulfato de magnesio, metilcelulosa, aceite mineral, polietileno glicol o solución de electrolitos, psilio, senna, y fosfato de sodio. Al menos un antiemético puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de clorpromacina, deminhidrato, melisato de dolasetrona, dronabinol, clorhidrato de granisetrona, clorhidrato de meclizina, clorhidrato de metocloproamina, clorhidrato de ondasetrona, ferfenacina, proclorperacina, edisilato de proclorperacina, maleato de proclorperacina, clorhidrato de prometacina, escopolamina, maleato de tietilperacina, y clorhidrato de trimetobenzamida. Al menos un fármaco anti-ulceroso puede ser al menos uno seleccionado de entre cimetidina, clorhidrato de cimetidina, famotidina, lansoprazol, misoprostol, nizatidina, omeprazol, sodio de rabeprazol, citrato de bismuto ratidina, clorhidrato de ranitidina, y sualfato. (Ver, p. ej., pp. 643-95 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un cortico-esteroide puede ser al menos uno seleccionado de entre betametasona, acetato de

betametasona o fosfato de sodio betametasona, fosfato de sodio betametasona, acetato de cortisona, dexametasona, acetato de dexametasona, fosfato de sodio dexametasona, acetato de fludrocortisona, acetato de hidrocortisona, cipionato de hidrocortisona, fosfato de sodio hidrocortisona, succionato de sodio hidrocortisona, metilprednisolona, acetato de metilprednisolona, succinato de sodio metilprednisolona, prednisolona, acetato prednisolona, fosfato de sodio prednisolona, tebutato de prednisolona, prednisona, triamcinolona, acetona de triamcinolona, y diacetato de triamcinolona. Al menos un andrógeno o esteroide anabólico puede ser al menos uno seleccionado de entre danazol, fluoximesterona, metiltestosterona, decanoato de nandrolona, fenpropionato de nandrolona, testosterona, cipionato de testosterona, anantato de testosterona, propionato de testosterona, y sistema transdérmico de testosterona. Al menos un estrógeno o progestina puede ser al menos uno seleccionado de entre estrógenos esterificados, estradiol, cipionato estradiol, sistema transdérmico de acetato estradiol/noretindrona, valerato estradiol, estrógenos (conjugados), estropipato, estradiol etinilo, estradiol etinilo y desogestrel, estradiol etinilo y diacetato de etinodiol, estradiol etinilo y disogestrel, estradiol etinilo y diacetato de etinodiol, estradiol etinilo y levonorgestrel, estradiol etinilo y norgestrel, estradiol etinilo y noretindrona y acetato y fumarato ferroso, levonorgestrel, acetato de medroxiprogesterona, mestranol y noretindrona, noretindrona, acetato de noretindrona, norgestrel, y progesterona. Al menos una gonodroptapina puede ser al menos una seleccionada de entre acetato de ganirelix, acetato de gonadorelina, acetato de histidina, y menotropina. Al menos un antidiabético o glucagón puede ser al menos uno seleccionado de entre acarbosa, clorpropamina, glibenclamol, glipicida, glucagón, gliburida, insulina, clorhidrato de metformina, miglitol, clorhidrato de pioglitazona, repaglinida, maleato de rosiglitazona, y troglitazona. Al menos una hormona tiroidea puede ser al menos una seleccionada de entre sodio de levotiroxina, sodio de lioironina, liotrix y tiroides. Al menos un antagonista de hormona tiroidea puede ser al menos uno seleccionado de entre metimazol, yoduro de potasio, yoduro de potasio (solución saturada), propiltiouracilo, yoduro radiactivo (sodio yoduro I), y una fuerte solución de yodo. Al menos una hormona pituitaria puede ser al menos una seleccionada de entre corticotropina, cosintropina, acetato de desmofresina, acetato de leuprolida, corticotropina repositoria, somatrem, somatropin, y vasopresina. Al menos un fármaco similar al para-tiroidea puede ser al menos uno seleccionado de entre calcifediol, calcitonina (humana), calcitonina (salmón), calcitriol, dihidrotaquisterol y disodio de etidronato. (Ver, p. ej., pp. 696-796 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un diurético puede ser al menos uno seleccionado de entre acetazolamida, sodio de acetazolamida, clorhidrato de amilorida, bumetanida, clortalidona, sodio de etacrinato, ácido etacrinico, furosemida, hidroclorotiacida, indapamida, manitol, metolazona, espironolactona, torsemida, triamtereno, y urea. Al menos un electrolito o solución de reemplazo puede ser al menos uno seleccionado de entre acetato cálcico, carbonato cálcico, cloruro cálcico, citrato cálcico, glubionato cálcico, gluceptato cálcico, gluconato cálcico, lactato cálcico, fosfato cálcico (dibásico), fosfato cálcico (tribásico), dextrano (alto peso molecular), dextrano (bajo peso molecular), hetalmidón, cloruro de magnesio, sulfato de magnesio, acetato potásico, bicarbonato potásico, cloruro potásico, gluconato potásico, inyección de Ringer, inyección de Ringer (lactato) y cloruro sódico. Al menos un adificador o alcalinizador puede ser al menos uno seleccionado de entre bicarbonato, lactato de sodio y trometamina. (Ver, p. ej., pp. 797-833 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un anti-anémico puede ser al menos uno seleccionado de entre fumarato ferroso, gluconato ferroso, sulfato ferroso, sulfato ferroso (seco), hierro dextrano, hierro sorbitol, complejo de hierro polisacárido, y complejo de gluconato férrico de sodio. Al menos un anticoagulante puede ser al menos uno seleccionado de entre ardeparin de sodio, dalteparin de sodio, danaparoides de sodio, enoxaparina de sodio, heparina de calcio, heparina de sodio y warfarina de sodio. Al menos un derivado de la sangre puede ser al menos uno seleccionado de entre albumina 5%, albumina 25%, factor anti-hemofílico, complejo coagulante anti-inhibidor, antitrombina III (humano), factor IX (humano), complejo de factor IX, y fracciones de proteína de plasma. Al menos una enzima trombolítica puede ser al menos una seleccionada de entre alteplasa, anistreplasa, reteplasa (recombinante), estreptoquinasa, y uroquinasa. (Ver, p. ej., pp. 836-66 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un fármaco alquilante puede ser al menos uno seleccionado de entre busulfan, carboplatina, carmustina, clorambucil, cisplatina, ciclofosfamida, ifosfamida, lomustina, clorhidrato de mecloretamina, melfalan, clorhidrato de melfalan, estreptococina, temozolomida y tiopene. Al menos un antimetabolito puede ser al menos uno seleccionado de entre capecitabina, cladribina, citarabina, floxuridina, fosfato de fludarabina, fluoruracil, hidroxiurea, mercaptopurina, metotrexato, sodio de metotrexato, y tioguanina. Al menos un antibiótico antineoplásico puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato de bleomicina, dactinomomicina, citrato de daunorrubicina en liposomas, clorhidrato de daunorrubicina, clorhidrato de doxorubicina, clorhidrato de doxorubicina en liposomas, clorhidrato de epirubicina, clorhidrato de idarrubicina, mitomicina, pentostatina, plicamicina, y valrubicina. Al menos un antineoplásico que altera el equilibrio hormonal puede ser al menos uno seleccionado de entre anastrozol, bicalutamida, sodio de fosfato de estramustina, exemestano, flutamida, acetato goserelino, letrozol, acetato de leuprolida, acetato de megestrol, nilutamida, citrato de tamoxifeno, testolactona, y citrato de toremifano. Al menos un misceláneo antineoplásico puede ser al menos uno seleccionado de entre asparaginasa, bacilo Calmette- Guerin (BCG) (intravesical en vivo), decarbazina, docetaxel, fosfato de etoposida, clorhidrato de gemcitabina, clorhidrato de irinotecano, mitotano, clorhidrato de mitoxantrona, paclitaxel, pegaspargasa, sodio porfímero, clorhidrato de procarbazona, rituximab, teniposida, clorhidrato de topotecano, trastuzumab, tretinoína, sulfato de vinblastina, sulfato de vincristina y tartrato de vinorelbina. (Ver, p. ej., pp. 867-963 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un inmunosupresor puede ser al menos uno seleccionado de entre azatioprina, basiliximab, ciclosporina, daclizumab, linfocito inmuno globulina, muromonab-CD3, microfenolato mofetilo, clorhidrato de microfenolato mofetilo, sirolimus, y tacrolimus. Al menos una vacuna o toxoide puede ser al menos uno seleccionado de entre vacuna BCG, vacuna del cólera, toxoides de la difteria y el tétano (adsorbido), toxoides de la difteria y el tétanos y vacuna adsorbida de tos ferina acelular, toxoides de la difteria y el tétanos y vacuna de la tos ferina de células enteras, vacunas conjugadas de Haemophilus b, vacuna de la Hepatitis A (inactivada), vacuna de la Hepatitis B (recombinante), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 tipos trivalentes A&B (antígenos de superficie purificada), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 tipos trivalentes A&B (surviriones o surviriones purificados), vacuna del virus de la gripe 1999-2000 tipos trivalentes A&B (viriones completos), vacuna del virus de la encefalitis japonesa (inactivado), vacuna del mal de Lyme (recombinante OspA), vacuna de los virus del sarampión, paperas y rubeola (en vivo), vacuna de los virus del sarampión, paperas y rubeola (en vivo atenuados), vacuna del virus de sarampión (en vivo atenuado), vacuna de meningococos polisacárido, vacuna del virus de paperas (en vivo), vacuna contra la peste, vacuna de neumococos (polivalente), vacuna del virus de la poleo (inactivado), vacuna de virus de la poleo (en vivo, oral, trivalente), vacuna contra la rabia (adsorbida), vacuna contra la rabia (célula humana diploide), vacunas contra los virus de las paperas y la rubeola (en vivo), vacuna contra el virus de la rubeola (en vivo, atenuada), toxoide de tétanos (adsorbida), toxoide del tétanos (fluida), vacuna contra las fiebres tifoideas (oral), vacuna contra las fiebres tifoideas (parenteral), vacuna contra las fiebres tifoideas VI polisacáridos, vacuna contra el virus de la varicela, vacuna contra la fiebre amarilla. Al menos una antitoxina puede ser al menos una seleccionada de entre antitoxina de la araña viuda negra, anti-veneno Crotalidae (polivalente), antitoxina de la difteria (equina), y anti-veneno Micrurus fulvius. Al menos un suero inmune puede ser al menos uno seleccionado de entre citomegalovirus inmuno globulina (intravenoso), hepatitis B inmuno globulina (humana), inmuno globulina intramuscular, inmuno globulina intravenosa, inmuno globulina de la rabia (humana), inmuno globulina intravenosa del virus respiratorio sincitial (humana), inmuno globulina Rh₀ (D) (humana), inmuno globulina intravenosa Rh₀ (D) (humana), inmuno globulina del tétanos (humano), e inmuno globulina de la varicela-zoster. Al menos un modificador de la respuesta biológica puede ser al menos uno seleccionada de entre aldesleucina, epoetina alfa, filgastrim, acetato de glatiramer para inyección, interferona alfacon-1, interferona alfa-2a (recombinante), interferona alfa-2b (recombinante), interferona beta-1a, interferona beta-1b (recombinante), interferona gamma-1b, clorhidrato de levamisola, oprelvecina, y sargramostim. (Ver, p. ej., pp. 964-1040 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un anti-infeccioso oftálmico puede ser al menos uno seleccionado de entre bacitacina, cloranfenicol, clorhidrato de ciprofloxacina, eritromicina, sulfato de gentamicina, ofloxacina 0,3%, sulfato de polimixina B, sulfacetamida de sodio 10%, sulfacetamida de sodio 15%, sulfacetamida de sodio 30%, tobramicina, y vidarabina. Al menos un anti-inflamatorio oftálmico puede ser al menos uno seleccionado de entre dexametasona, fosfato de sodio dexametasona, sodio diclofenaco 0,1%, fluorometolona, sodio flurbiprofeno, kerotolac trometamina, acetato de prednisolona (suspensión) y fosfato de sodio prednisolona (solución). Al menos un miótico puede ser al menos uno seleccionado de entre cloruro de acetilcolina, corbacol (intraocular), corbacol (tópico), yoduro de ecotiofato, pilocarpina, clorhidrato de pilocarpina, y nitrato de pilocarpina. Al menos un midriático puede ser al menos uno seleccionado de entre sulfato de atropina, clorhidrato de ciclopentolato, clorhidrato epinefrina, borato de epinefrilo, bromhidrato de homatropina, clorhidrato de fenilefrina, bromhidrato de escopolamina, y tropicamida. Al menos un vasoconstrictor oftálmico puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato nafazolina, clorhidrato de oximetazolina, y clorhidrato de tetrahidrozolina. Al menos un oftálmico misceláneo puede ser al menos uno seleccionado de entre clorhidrato de apraclonidina, clorhidrato betaxolol, tartrato de brimonidina, clorhidrato de carteolol, clorhidrato de dipivefrina, clorhidrato de dorzolamida, difumarato de emedastina, fluoresceína sódica, fumarato de ketotifen, latanoprost, clorhidrato de levobunolol, clorhidrato metipranolol, sodio cloruro (hipertónico), y maleato de timol. Al menos un otico puede ser al menos uno seleccionado de entre ácido bórico, peróxido de carbamida, cloranfenicol, y trietanolamina polipéptida oleo-condensada. Al menos un fármaco nasal puede ser al menos uno seleccionado de entre dipropionato de beclometasona, budesonida, sulfato de efedrina, clorhidrato de epinefrina, flunisolido, propionato de fluticasona, clorhidrato de nafazolina, clorhidrato de oximetazolina, clorhidrato de fenilefrina, clorhidrato de tetrahidrozolina, triamcinolona acetona y clorhidrato de xilometazolina. (Ver, p. ej., pp. 1041-97 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos un anti-infeccioso local puede ser al menos uno seleccionada de entre Aciclovir, anfotericina B, crema de ácido acelaico, becitracina, nitrato de butaconazol, fosfato de clindamicina, clotrimazol, nitrato de econazol, sulfato de gentamicina, eritromicina, ketoconazol, acetato mafenido, metronidazol (tópico), nitrato de miconazol, mupirocina, clorhidrato de naftifina, sulfato de neomicina, nitrofurazona, nistatina, sulfadiacina de plata, clorhidrato de terbinafina, terconazol, clorhidrato de tetraciclina, tioconazol y tolnafatato. Al menos un escabicida o pediculicida puede ser al menos uno seleccionado de entre crotamitona, lindano, permetrina, y piretrina. Al menos un cortico-esteroide tópico puede ser al menos uno seleccionado de entre dipropionato de betametasona, valerato de betametasona, propionato clobetasol, desonida, desoximetasona, dexametasona, fosfato de sodio dexametasona, diacetato diflorasona, fluocinolona acetona, fluocinonida, flurandrenolida, fluticasona propionato, halcionida, hidrocortisona, acetato de hidrocortisona, butirato de hidrocortisona, valerato de hidrocortisona, furoato de mometasona, y acetonido de triamcinolona. (Ver, p. ej., pp. 1098-1136 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Al menos una vitamina o mineral puede ser al menos uno seleccionado de entre vitamina A, complejo de vitamina B, cianocobalamina, ácido fólico, hidroxocobalamina, calcio de leucovorina, niacina, niacinamida, clorhidrato de pirodoxina, riboflavina, clorhidrato de tiamina, vitamina C, vitamina D, colecalciferol, análogo de

vitamina D, doxercalciferol, paricalcitol, vitamina E, análogo de vitamina K, fitonadiona, fluoruro sódico, fluoruro sódico (tóxico), oligoelementos, cromo, yodo, manganeso, selenio y zinc. Al menos un calórico puede ser al menos uno seleccionado de entre infusiones de amino ácidos (cristalino), infusiones de amino ácidos en dextrosa, infusiones de amino ácidos con electrolitos, infusiones de amino ácidos con electrolitos en dextrosa, infusiones de amino ácidos para fallo hepático, infusiones de amino ácidos para alto estrés metabólico, infusiones de amino ácidos para fallo renal, dextrosa, emulsiones grasas y triglicéridos de cadena media. (Ver, p. ej., pp. 1137-63 de Nursing 2001 Drug Handbook).

Las composiciones de armazones de proteína de la presente invención pueden comprender además al menos uno de cualquier compuesto farmacéutico adecuado y en cantidad efectiva que comprenda una estructura de proteína contactado o administrado a una célula, tejido, órgano, animal o paciente con necesidad de dicha modulación, tratamiento o terapia, opcionalmente además comprenderá al menos uno seleccionado de al menos un antagonista TNF (p. ej., pero no limitado a TNF químico o proteína antagonista, TNF monoclonal o anticuerpo policlonal o fragmento, un receptor soluble TNF (p. ej., p55, p70 o p85) o fragmento, fusión de Polipéptidos de las mismas, o un pequeña molécula TNF antagonista, p. ej., TNF aglutinante de proteína I o II (TBP-I o TBP-II), nerelimonmab, infliximab, etanercept, CDP-571, CDP-870, afelimomab, lanercept, y similares), un anti-reumático (p. ej., metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, etanercept, tiomalato de sodio de oro, sulfato de hidroxiclороquina, leflunomida, sulfasalicina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no-esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (p. ej., aminoglicosida, un anti fúngico, un anti-parasitario, un antiviral, un carbapenemo, cefalosporina, una fluorquinolona, un macrolido, una penicilina, una sulfonamida, una tetraciclina, otro anti-microbiano), un antisorriático, un cortico esteroide, in esteroide anabólico, un agente relacionado a la diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un anti-diarreico, un anti-tusivo, un antiemético, un anti-ulceroso, un laxante, un anti-coagulante, una eritropoyetina (p. ej., epoetina alfa), un filgastrim (p. ej., G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), un inmunizador, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (p. ej., basiliximab, ciclosporina, daclizumab), una hormona de crecimiento, un fármaco de hormona de reemplazo, un modulador de receptor de estrógeno, un midriático, un ciclopegico, un agente alquilante, un antimetabolito, un inhibidor miótico, un radio farmacéutico, un antidepresivo, un agente anti-maniaco, un anti-psicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, donopecil, tacrina, medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leucotrieno, una metilxantina, un cromolin, epinefrina o un análogo, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o antagonista de citoquina. Entre los ejemplos no limitados de dichas citoquinas se incluye, pero no está limitado a, cualquier IL-1 o IL-28 (p. ej., IL-1, IL-2, etc.). Las dosis adecuadas son bien conocidas en el arte. Ver, p. ej., Wells et al., eds., *Pharmacotherapy Handbook*, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); *PDR Pharmacopoeia*, *Taracon Pocket Pharmacopoeia 2000*, Deluxe Edition, Talascon Publishing, Loma Linda, CA (2000).

Dichos anti-cancerígenos o anti-infecciosos también pueden incluir moléculas de toxinas que son asociadas, enlazadas, co-formuladas o co-administradas con al menos una estructura de proteína de la presente invención. Opcionalmente la toxina puede actuar para matar de manera selectiva las células o tejidos patológicos. La célula patológica puede ser un cáncer u otro tipo de célula. Tales toxinas pueden ser, pero no están limitadas a, toxinas purificadas o recombinantes o fragmentos de toxina que comprendan al menos un dominio citotóxico funcional, p. ej., seleccionado al menos uno de entre ricino, toxina de la difteria, toxina de veneno, o toxina bacteriana. El termino toxina también incluye endotoxinas y exotoxinas producidas por cualquier actividad natural, una bacteria o virus mutante o recombinada que puede causar cualquier condición patológica en humanos y otros mamíferos, incluso el choque toxico, que puede terminar en muerte. Dichas toxinas deben incluir, pero no están limitadas a, enterotoxina lábil al calor enterotoxigénica *E. coli* (LT), enterotoxina lábil al calor (ST), citotoxina *Shigella*, enterotoxinas aeromonas, toxina-1 del síndrome de choque toxico (TSST-1), enterotoxina A de estafilococos (SEA), B (SEB), o C (SEC), enterotoxinas de estreptococos y similares. Entre las bacterias se incluyen, pero no están limitadas a, cepas de especies del *E.coli* enterotoxigenico (ETEC), *E.coli* enterohemorrágico (p. ej., cepas de serotipo O157:H7), especies de estafilococos (p. ej., *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus pyogenes*), especies de *Shigella* (p. ej., *Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella boydii*, y *Shigella sonnei*), especies de *Salmonella* (p. ej., *Salmonella typhi*, *Salmonella choleraesuis*, *Salmonella enteritidis*), especies de *Clostridium* (p. ej., *Clostridium perfringens*, *Clostridium difficile*, *Clostridium botulinum*), especies de *Camphobacter* (p. ej., *Camphobacter jejuni*, *Camphobacter fetus*), especies de *Heliobacter* (p. ej., *Heliobacter pylori*), especies de *Aeromonas* (p. ej., *Aeromonas sobria*, *Aeromonas hydrophila*, *Aeromonas caviae*), *Pleisomonas shigelloides*, *Yersinia enterocolitica*, especies de *Vibrios* (p. ej., *Vibrios cholerae*, *Vibrios parahemolyticus*), especies de *Klebsiella*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Streptococci*. Ver, p. ej., Stein, ed., *INTERNAL MEDICINE*, 3rd ed., pp 1-13, Little, Brown and Co., Boston, (1990); Evans et al., eds., *Bacterial Infections of Humans: Epidemiology and Control*, 2d. Ed., pp 239-254, Plenum Medical Book Co., New YORK (1991); Mandell et al, *Principles and Practice of Infectious Disease*, 3d. Ed., Churchill Livingstone, New York (1990); Berkow et al., eds., *The Merck Manual*, 16th Edition, Merck and co., Rahway, N.J., 1992; Wood et al., *FEMS Microbiology Immunology*, 76:121-134 (1991); Marrack et al, *Science*, 248:705-711 (1990).

Los compuestos, composiciones o combinaciones de la estructura de proteína de la presente invención pueden comprender, además, al menos uno de cualquier auxiliar adecuado, como, pero no limitándose a, diluyente, aglutinador, estabilizador, solución amortiguadora, sales, solventes lipofilicos, conservantes, adyuvantes o similares. Son preferentes los auxiliares farmacéuticamente aceptados. Hay ejemplos ilimitados de, métodos de preparación

tales soluciones estériles como bien se conoce en el arte, tales como, pero no limitándose a, Gennaro, Ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Edition, Mack Publishing Co. (Easton, PA) 1990. Los portadores farmacéuticamente aceptados pueden ser seleccionados rutinariamente de acuerdo con el medio de administración adecuado, solubilidad y/o estabilidad de la estructura de proteína, fragmento o variantes en la composición como es bien conocido en el arte y descrito en la presente.

Entre los excipientes farmacéuticos y aditivos útiles en la presente composición se incluyen, pero no se limitan a, proteínas, péptidos, amino ácidos, lípidos, y carbohidratos (p. ej., azúcares, incluyendo los monosacáridos, di-, tri-, tetra-, y oligosacáridos; azúcares derivados, tales como alditoles, ácidos aldónicos, azúcares esterificados, y similares; polisacáridos o polímeros de azúcar), los cuales pueden estar presentes individualmente o en combinación, comprendiendo solo o en combinación entre el 1-99.99% del peso o volumen. Entre los excipientes de proteína ejemplares se incluyen albumina de suero, como la albumina de suero humano (HSA), recombinantes de la albumina de suero (rHA), gelatina, caseína, y similares. Los componentes representativos de amino ácidos/proteínas, que también funcionan como solución amortiguadora, incluyen alanina, arginina, betaina, histidina, ácido glutámico, ácido aspártico, cisteína, lisina, leucina, isoleucina, valina, metionina, fenilamina, aspartamo y similares. La glicina es un amino ácido preferente.

Entre los carbohidratos adecuados para su uso en la invención se incluyen, por ejemplo, monosacáridos, tales como la fructosa, maltosa, galactosa, glucosa, D-manosa, sorbosa, y similares; disacáridos, tales como la lactosa, sacarosa, trehalosa, celobiosa, y similares; polisacáridos, tales como la rafinosa, melicitosa, malto dextrinas, dextranos, almidones y similares; y alditoles, como el manitol, xilitol, maltitol, lactitol, xilitol sorbitol (glucitol), mioinositol y similares. Los excipientes de carbohidrato preferentes para ser empleados en la presente invención son el manitol, trehalosa y rafinosa.

Las composiciones de la estructura de proteína también pueden incluir una solución amortiguadora o agente ajustador del pH; generalmente, la solución amortiguadora es un preparado de sal de un ácido o base orgánico. Las soluciones amortiguadoras representativas incluyen sales ácidas orgánicas, tales como sales de ácido cítrico, ácido ascórbico, ácido gluconico, ácido carbónico, ácido tartárico, ácido succínico, ácido acético, o ácido ftálico; Tris, clorhidrato de trometamina o soluciones amortiguadoras de fosfato. Las soluciones amortiguadoras preferentes para ser empleadas en la presente invención son las sales de ácidos orgánicos, tales como el citrato.

Adicionalmente, las composiciones de la estructura de proteína de la invención pueden incluir excipientes poliméricos/aditivos, tales como polivinilpirrolidones, ficoles (un azúcar polimérico), dextratos (p. ej., ciclodextrinas, tales como el 2-hidroxipropil- β -ciclodextrina), glicoles de polietileno, agentes saborizantes, edulcorantes, antioxidantes, agentes antiestáticos, surfactantes (p. ej., polisorbatos, tales como "TWEEN 20" and "TWEEN 80"), lípidos, (p. ej., fosfolípidos, ácidos grasos), esteroides (p. ej., colesterol), y agentes quelantes (p. ej., EDTA).

Estos y otros excipientes y/o aditivos farmacéuticos conocidos y adecuados para su uso en las composiciones de armazones de proteína de acuerdo con la invención son conocidos en el arte, p. ej., tal y como se enumeran en "Remington: The Science & Practice of Pharmacy", 19th ed., Williams & Williams, (1995), y en el "Physician's Desk Reference", 52nd ed., Medical Economics, Montvale, NJ (1998). Como portadores o materiales excipientes preferentes tenemos los carbohidratos (p. ej., sacáridos y alditoles) y soluciones amortiguadoras (p. ej., citrato) o agentes poliméricos. Una molécula portadora ejemplar es el mucopolisacárido, ácido hialurónico, que puede ser útil para el suministro intra-articular.

45 Formulaciones

Tal y como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona formulaciones estables, que comprenden preferiblemente una solución amortiguadora de fosfato con un salino o sal escogida, así como soluciones conservadas y formulaciones que contienen un conservante, así como formulaciones de conservantes multiusos adecuadas para el uso farmacéutico o veterinario, comprendiendo al menos una estructura de proteína en una formulación farmacológicamente aceptada. Las formulaciones conservadas contienen al menos un conservante conocido u opcionalmente seleccionado de un grupo que consiste en al menos un fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencilo, nitrito fenilmercurico, fenoxietanol, formaldehido, clorobutanol, magnesio cloruro (p. ej., hexahidrato), alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio, sodio dehidroacetato y timerosal, polímeros, o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. Cualquier concentración adecuada o mezcla puede ser utilizada tal y como se conoce en el arte, como a un 0.0015% o cualquier rango, valor o fracción del mismo. Entre los ejemplos ilimitados se encuentran, no conservantes, 0.1-2% m-cresol (p. ej., 0.2, 0.3, 0.4, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.1-3% alcohol bencilo (p. ej., 0.5, 0.9, 1.1, 1.5, 1.9, 2.0, 2.5%), 0.001-0.5% timerosal (p. ej., 0.005-0.01), 0.001-2% fenol (p. ej., 0.05, 0.25, 0.28, 0.5, 0.9, 1.0%), 0.0005-1.0% alquilparabeno(s) (p. ej., 0.00075, 0.0009, 0.001, 0.002, 0.005, 0.0075, 0.009*, 0.01, 0.02, 0.05, 0.075, 0.09, 0.1, 0.2, 0.3, 0.75, 0.9, 1.0%) y similares.

Tal y como se ha indicado anteriormente, la invención proporciona un artículo de fabricación, que comprende un envoltorio y al menos un vial que comprende una solución de al menos una estructura de proteína con las soluciones amortiguadoras prescritas y/o conservantes, opcionalmente en un diluyente acuoso, donde dicho envoltorio comprende una etiqueta que indique que dicha solución puede ser conservado durante un periodo de 1, 2,

3, 4, 5, 6, 9, 12, 18, 20, 24, 30, 36, 40, 48, 54, 60, 66, 72 horas o más. Además la invención incluye un artículo de fabricación, que comprende un envoltorio, un primer vial que comprende al menos una estructura de proteína liofilizado, y un segundo vial que comprende un diluyente acuoso con la solución amortiguadora prescrita o un conservante, donde dicho envoltorio tenga una etiqueta que instruye al paciente a reconstituir al menos una estructura de proteína en el diluyente acuoso para formar una solución que puede ser conservada un periodo de veinticuatro horas o superior.

Al menos una estructura de proteína utilizado de acuerdo con la presente invención puede ser producido por medios recombinantes, incluso de células mamíferas o preparados transgénicos, o puede ser un purificado de otros recursos biológicos, como se describe en la presente y se conoce en el arte.

El rango de al menos una estructura de proteína en el producto de la presente invención incluye cantidades que se producen después de su reconstitución, en un sistema húmedo/seco, concentraciones desde 1.0 µg/ml hasta 1000 µg/ml, aunque concentraciones menores y mayores son operables y dependen del sistema de administración previsto, p. ej., las formulaciones difieren si es un parche transdérmico, pulmonar, transmucosal, u osmótico o métodos de micro bombeo.

Preferiblemente, el diluyente acuoso además puede comprender u conservante farmacéuticamente aceptado. Entre los conservantes preferentes se encuentran los seleccionados del grupo de fenoles, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencilo, alquilparabenos (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), cloruro benzalcónio, cloruro bencetónio, sodio dehidroacetato y timerosal, o mezclas de los mismos. La concentración de conservantes empleada en la formulación será suficiente para generar un efecto anti-microbiano. Tales concentraciones dependen del conservante seleccionado y son fácilmente determinados por un experto en la materia.

Otros excipientes, p. ej., agentes de isotonicidad, soluciones amortiguadoras, antioxidantes, y potenciadores del conservante, pueden ser opcionalmente añadidos al diluyente. Un agente de isotonicidad, como la glicerina, es comúnmente empleado en concentraciones conocidas. Una solución amortiguadora fisiológicamente tolerada es preferiblemente añadida para mejorar el control sobre el pH. Las formulaciones pueden cubrir un amplio rango de pHs, entre el pH4 y el pH 10, y preferiblemente rangos de entre pH5 a pH9, y un rango aún más preferente de entre pH6 y pH9. Preferiblemente, las formulaciones de la presente invención tendrán un pH de entre 6.8 y 7.8. entre las soluciones amortiguadoras preferentes se encuentran las soluciones amortiguadoras de fosfato, más preferiblemente, sodio fosfato, particularmente, salina amortiguada con fosfato (PBS).

Otros aditivos, como los solubilizadores farmacéuticamente aceptados Tween 20 (polipoxietileno (20) sorbitán monolaurato), Tween 40 (polioxietileno (20) sorbitán monopalmitato), Tween 80 (polioxietileno (20) sorbitán monooleato), Pluronic F68 (polioxietileno polioxipropileno block copolímeros) y PEG (polietileno glicol) o surfactantes no iónicos, tales como polisorbato 20 u 80 o poloxamer 184 o 188, polioles Pluronic[®], otros copolímeros de bloque y quelatores, tales como el EDTA y EGTA, pueden ser opcionalmente añadidos a las formulaciones o composiciones para reducir la agregación. Estos aditivos son particularmente útiles si una bomba o contenedor plástico es utilizado para administrar la formulación. La presencia de un surfactante farmacéuticamente aceptable mitiga la propensión a la agregación de proteínas.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser preparadas mediante un proceso que comprende la mezcla de al menos una estructura de proteína y un conservante seleccionado ente el grupo formado por fenol, m-cresol, p-cresol, o-cresol, clorocresol, alcohol bencilo, alquilparabeno (metilo, etilo, propilo, butilo y similares), benzalcónio cloruro, bencetónio cloruro, sodio dehidroacetato y timerosal o mezclas de los mismos en un diluyente acuoso. La mezcla de al menos una estructura de proteína y un conservante en un diluyente acuoso es llevada a cabo utilizando disoluciones convencionales y procedimientos de mezcla. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, una cantidad medida de al menos una estructura de proteína en una solución amortiguadora, es combinada con el conservante deseado en una solución amortiguadora en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y el conservante en las cantidades deseadas. Las variaciones de este proceso serán fácilmente reconocibles por los expertos en la materia. Por ejemplo, el orden en que se añaden los componentes, si se emplean aditivos adicionales, la temperatura y el pH al que se prepara la formulación, son factores que pueden optimizar la concentración y los medios de administración empleados.

Las formulaciones reclamadas pueden ser proporcionadas a pacientes como soluciones claras o como viales dobles que comprenden un vial de al menos una estructura de proteína liofilizado reconstituido con un segundo vial que contiene agua, un conservante y/o excipientes, preferiblemente, una solución amortiguadora de fosfato y/o un salino y una sal elegida, en un diluyente acuoso. Además, un vial con una solución única o un vial doble que requiere de reconstitución puede ser reutilizado múltiples veces y puede bastar para una aplicación única o ciclos múltiples de tratamiento de un paciente y así puede proporcionar un régimen de tratamiento más conveniente y habitualmente disponible.

Los presentes artículos de fabricación reclamados son útiles para la administración en un rango de tiempo de entre inmediatamente a veinticuatro horas o más. De acuerdo con esto, los artículos de fabricación reclamados

por la presente ofrecen ventajas significativas al paciente. Las formulaciones de la invención pueden, opcionalmente, ser almacenados con seguridad a temperaturas de entre 2°C y 40°C para mantener la actividad biológica de la proteína para periodos amplios de tiempo, permitiendo una etiqueta en el envase que indique que la solución puede ser conservadas y/o utilizadas en un periodo de tiempo de 6, 12, 18, 24, 36, 48, 72 y 96 horas o más. Si el diluyente conservado es utilizado, dicha etiqueta puede incluir una fecha de consumo de 12 meses, medio año, año y medio y/o dos años.

Las soluciones de al menos una estructura de proteína de la invención pueden ser preparados por un proceso que comprende la mezcla de al menos una estructura de proteína en un diluyente acuoso. La mezcla se lleva a cabo utilizando disoluciones y procedimientos de mezcla convencionales. Para preparar un diluyente adecuado, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos una estructura de proteína en agua o solución amortiguadora en cantidades suficientes para proporcionar una proteína y, opcionalmente, un conservante o solución amortiguadora en las concentraciones deseadas. Las variaciones de este proceso serán fácilmente reconocibles por los expertos en la materia. Por ejemplo, el orden en el que los componentes son añadidos, si se emplean aditivos adicionales, la temperatura y el pH en el cual la formulación es preparada, todos los factores que pueden ser optimizados en la concentración y los medios de administración empleados.

Los productos reclamados pueden ser proporcionados al paciente como solución clara o como un vial doble que comprende un vial liofilizado de al menos una estructura de proteína que es reconstituido con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. Además, un vial de solución única o vial doble que requiere ser reconstituido puede ser reutilizado múltiples veces y puede ser suficiente para un tratamiento simple o para un tratamiento de ciclos múltiples y así proporciona un régimen de tratamiento más conveniente y fácilmente disponible.

Los productos reclamados pueden ser proporcionados indirectamente a los pacientes proporcionando a farmacias, clínicas, u otras instituciones o instalaciones, soluciones claras o viales dobles que comprende un vial de al menos una estructura de proteína liofilizado que es reconstituido con un segundo vial que contiene el diluyente acuoso. La solución clara este caso puede ser de más de un litro o incluso de mayor tamaño, proporcionando una gran reserva de la cual pueden obtenerse porciones menores de solución de al menos una estructura de proteína, una o múltiples veces para ser transferidas en viales más pequeñas y proporcionado por la farmacia o la clínica a los usuarios y/o pacientes.

Entre los dispositivos reconocidos para la administración de la solución se encuentran los sistemas de vial único como los dispositivos de inyección tipo bolígrafo, como el BD Pens, BD Sutojector®, Humaject®, NovoPen®, B-D Pen®, AutoPen®, y OptiPen®, GenotropinPen®, Genotronorm Pen®, Humatro Pen®, Reco-Pen®, Roferon Pen®, Biojector®, lject®, J-tip Needle-Free Injector®, Intraject®, Medi-Ject®, p. ej., como los fabricados por Becton Dickinson (Franklin Lakes, NJ, www.bectondickenson.com), Disetronic (Burgdorf, Switzerland, www.disetronic.com); Bioject, Portland, Oregon (www.bioject.com); National Medical Products, Weston Medical (Peterborough, UK, www.weston-medical.com), Medi-Ject Corp (Minneapolis, MN, www.mediject.com) y dispositivos similares. Entre los dispositivos reconocidos para la administración por vial doble se incluyen los sistemas de inyección tipo bolígrafo para la reconstitución de un fármaco liofilizado en un cartucho para la administración de la solución reconstituida, como el HumatronPen®. Como ejemplo de otros dispositivos adecuados se incluyen las jeringas precargadas, auto-inyectores, inyectores sin aguja y sets de infusiones sin aguja IV.

Los productos reclamados mediante la presente incluyen el envoltorio. El envoltorio proporciona, además de la información requerida por las agencias reguladoras, las condiciones bajo las cuales deber ser utilizado el producto. El envoltorio de la presente invención proporciona las instrucciones para el paciente para reconstituir al menos una estructura de proteína en un diluyente acuoso para formar una solución y para utilizar la solución durante un periodo de 2-4 horas o más para el producto, húmedo/seco, de los dos viales. Para el vial único, la etiqueta indica que la solución puede ser empleada en un periodo de 2-4 horas o superior. Los productos reclamados por la presente son útiles para el uso farmacéutico humano.

Las formulaciones de la presente invención pueden ser preparados mediante un proceso que comprenda la mezcla de al menos una estructura de proteína y una solución amortiguadora seleccionada, preferiblemente, una solución amortiguadora de fosfato que contienen un salino o una sal elegida. La mezcla de al menos una estructura de proteína y una solución amortiguadora en un diluyente acuoso son llevados a cabo utilizando disoluciones y procesos de mezcla convencionales. Para preparar una formulación adecuada, por ejemplo, se combina una cantidad medida de al menos una estructura de proteína en agua o solución amortiguadora con el agente amortiguador deseado en agua en cantidades suficientes para proporcionar la proteína y la solución amortiguadora en las cantidades deseadas. Las variaciones de este proceso serán reconocidas por cualquier experto en la materia. Por ejemplo, el orden de los componentes añadidos, si se emplean aditivos adicionales, la temperatura y el pH en el cual la formulación es preparada, son factores que pueden ser optimizados según la concentración y el medio de administración utilizados.

Las formulaciones estables o conservadas reclamadas pueden ser proporcionadas a pacientes como soluciones claras o como viales dobles que comprenden un vial de la estructura de proteína liofilizado que es reconstituido con un segundo vial que contienen un conservante o solución amortiguadora y excipientes en un

diluyente acuoso. Además, tanto el vial de solución única como el vial doble que requiere reconstitución pueden ser reutilizados múltiples veces y pueden ser suficientes para un tratamiento único o de ciclo múltiple y así se proporciona un régimen de tratamiento más conveniente y fácilmente disponible.

5 Otras formulaciones o métodos para estabilizar la estructura de proteína pueden resultar que no sea una solución clara de polvo liofilizado que incluye una estructura de proteína. Entre las soluciones no-claras hay formulaciones que comprenden partículas en suspensión, siendo dichas partículas una composición que contiene la estructura de proteína en una estructura de dimensiones variables, también conocidas como micro-esferas, micro-partículas, nano-partículas, nano-esferas o liposomas. Tales relativamente homogéneas, esencialmente esféricas, formulaciones particulares que contienen un agente activo pueden ser formadas mediante contacto de una fase acuosa que contenga el agente activo y un polímero y una fase no acuosa seguida de la evaporación de la fase no acuosa para originar la coalescencia de las partículas desde la fase acuosa como se muestra en U.S. 4.589.330. las micro-partículas porosas pueden ser preparadas utilizando una primera fase que contenga un agente activo y un polímero disperso en un solvente continuo y eliminando dicho solvente de la suspensión mediante secado en frío o dilución-extracción-precipitación como se muestra en U.S. 4.818.542. Los polímeros preferentes para tales preparados son co-polímeros naturales o sintéticos o polímeros seleccionados de un grupo formado por agar de gelatina, almidón, arabinogalactano, albumina, colágeno, ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicólido-L(-) lactido poli (epsilon-caprolactona), poli (epsilon-caprolactona-CO- ácido láctico), poli (epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico), poli (beta-ácido hidroxibutírico), óxido de polietileno, polietileno, poli (alquil-2-cianoacrilato), poli (hidroxietilo metacrilato), poliamidas, poli (amino ácidos), poli (2-hidroxietilo DL-aspartamida), poli (éster urea), poli (L-fenilalanina/etileno glicol/1, 6-diisocianatohexano) y poli (metil metacrilato). Los polímeros o poliésteres particularmente preferentes son, tales como el ácido poliglicólico, ácido poliláctico, glicólido-L (-) lactido poli (epsilon-caprolactona), poli (epsilon-caprolactona-CO-ácido láctico) y el poli zeta (epsilon-caprolactona-CO-ácido glicólico). Entre los solventes útiles para disolver los polímeros y/o el activo se incluyen: agua, hexafluoroisopropanol, metilencloruro, tetrahydrofurano, hexano, benceno, o hexafluoroacetona sesquihidrato. La fase del proceso de dispersión que contiene el activo con una segunda fase debe incluir la presurización a la fuerza de la primera fase a través del orificio de una boquilla para tener efecto en la formación de gotas.

Las formulaciones de polvo seco pueden ser resultado de procesos diferentes a la liofilización, tales como el secado por spray o la extracción del solvente por evaporación o por precipitación de una composición cristalina seguido de uno o más pasos para eliminar el solvente acuoso o no acuoso. La preparación de una estructura de proteína por spray seco se muestra en U.S. 6.019.968. los armazones de proteína basados en composiciones de spray seco deben ser producidos por soluciones de secado por spray o lechadas de la estructura de proteína y, opcionalmente, excipientes, en un solvente bajo condiciones que proporcionen un polvo seco respirable. Los solventes deben incluir componentes polares, tales como el agua o el etanol, que deben ser inmediatamente secados. La estabilidad de la estructura de proteína debe ser mejorada realizando los procedimientos de secado por spray en ausencia de oxígeno, por ejemplo, bajo una manta de nitrógeno o utilizando nitrógeno como gas seco. Otra formulación seca relativa es la dispersión de numerosas micro partículas perforadas en una suspensión que generalmente comprende un propulsor hidrofluoroalcano como se indica en WO 9916419. Las dispersiones estabilizadas deben ser administradas al pulmón del paciente utilizando un inhalador de dosis medidas. El equipamiento útil para la fabricación comercial de medicamentos a base de spray seco es fabricados por Buchi Ltd. O Niro Corp.

Al menos una estructura de proteína de las tanto estables como conservadas formulaciones o soluciones descritas en la presente, pueden ser administradas a un paciente de acuerdo con la presente descripción vía una gran variedad de métodos entre los que se incluye la inyección SC o IM; transdérmica, pulmonar, transmucosal, implante, bomba osmótica, cartucho, micro bomba u otros medios apreciados por los expertos en la materia, tal y como se conoce en el arte.

50 **Aplicaciones Terapéuticas**

En la presente se describe un método de modulación o tratamiento para una enfermedad, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, tal y como se conoce en el arte o se describe en la presente, utilizando al menos una estructura de proteína de la presente invención, p. ej., administrando o contactando la célula, tejido, órgano, animal o paciente con una cantidad terapéuticamente efectiva de armazones de proteína. También se describe en la presente un método para modular o tratar una enfermedad, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo, pero sin limitarse a, al menos una entre obesidad, enfermedad inmuno-relacionada, enfermedad cardiovascular, enfermedad infecciosa, enfermedad maligna o enfermedad neurológica.

La presente descripción también proporciona un método para modular o tratar al menos una enfermedad inmuno-relacionada, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente incluyendo pero limitándose a, al menos una entre artritis reumatoide, artritis sorbitica, espondilitis anquilosante, úlcera gástrica, artropatías seronegativas, osteoartritis, osteolisis, aflojamiento aséptico de implantes ortopédicos, enfermedad inflamatoria del intestino, colitis ulcerosa, lupus eritematoso sistémico, síndrome anti-fosfolípido, iridociclitis/uveítis/neuritis óptica, fibrosis pulmonar idiopática, vasculitis sistémica/granulomatosis de Wegener, sarcoidosis, orquitis/procedimientos de vasectomía reversible, enfermedades alérgicas/atópicas, asma, rinitis alérgica, eczema, dermatitis alérgica por contacto,

conjuntivitis alérgica, neumonitis por hipersensibilidad, trasplantes, rechazo al trasplante de órganos, enfermedad de injerto contra huésped, síndrome de la respuesta inflamatoria sistémica, síndrome de sepsis, sepsis de Gram positiva, sepsis de Gram negativa, cultivo de sepsis negativa, sepsis fúngica, fiebre neutropénica, urosepsis, meningococemia, trauma/hemorragia, quemaduras, exposición a la radiación ionizada, pancreatitis aguda, síndrome de dificultad respiratoria en el adulto, artritis reumatoide, hepatitis inducida por el alcohol, patologías inflamatorias crónicas, sarcoidosis, patología de Crohn, anemia falciforme, diabetes, nefrosis, enfermedades atópicas, reacciones a la hipersensibilidad, rinitis alérgica, fiebre del heno, rinitis perineal, conjuntivitis, endometritis, asma, urticaria, anafilaxia sistémica, dermatitis, anemia perniciosa, enfermedad hemolítica, trombocitopenia, rechazo de injertos de cualquier órgano o tejido, rechazo al trasplante de riñón, rechazo al trasplante de corazón, rechazo al trasplante de hígado, rechazo al trasplante de hígado, rechazo al trasplante de páncreas, rechazo al trasplante de pulmón, rechazo al trasplante de médula ósea (BMT), rechazo de aloinjertos de piel, rechazo al trasplante de cartílago, rechazo al injerto de hueso, rechazo al trasplante de intestino delgado, rechazo al implante de timo fetal, rechazo al trasplante paratiroideo, rechazo de xenoinjerto de cualquier órgano o tejido, rechazo de aloinjerto, reacciones de hipersensibilidad al anti-receptor, enfermedad de Graves, enfermedad de Raynaud, diabetes resistente a la insulina tipo B, asma, miastenia grave, citotoxicidad por medio de anticuerpos, reacciones de hipersensibilidad tipo III, síndrome POEMS (polineuropatía, organomegalía, endocrinopatía, gamopatía monoclonal, y síndrome de cambios de piel), polineuropatía, organomegalía, síndrome anti fosfolípido, péñfigo, escleroderma, enfermedades mixtas de conectividad de tejidos, enfermedad idiopática de Addison, diabetes melita, hepatitis crónica activa, cirrosis biliar primaria, vitíligo, vasculitis, síndrome de la cardiectomía post-MI, hipersensibilidad tipo IV, dermatitis por contacto, neumonitis de hipersensibilidad, rechazo al aloinjerto, granulomas debido a organismos intracelulares, sensibilidad a los fármacos, metabólica/idiopática, enfermedad de Wilson, hemocromatosis, deficiencia de alfa-1-antitripsina, retinopatía de diabetes, tiroiditis de Hashimoto, osteoporosis, evaluación del eje hipotálamo-pituitaria-suprarrenal, cirrosis biliar primaria, tiroiditis, encefalomiелitis, caquexia, fibrosis cística, enfermedad neonatal de pulmón crónica, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (COPD), linfocitosis hematopatológica nefrótica, condiciones dermatológicas, soriasis, alopecia, síndrome nefrítico, nefritis, nefritis glomerular, fallo renal agudo, hemodiálisis, uremia, toxicidad, pre eclampsia, terapia okt3, terapia anti-cd3, terapia citoquina, quimioterapia, radioterapia (incluyendo pero no limitándose a, astenia, anemia, caquexia, y similares), intoxicación por salicilato crónica, y similares. Ver, p. ej., the Merck Manual, 12th-17th Editions, Merck & Company, Rathway, NJ (1972, 1977, 1982, 1987, 1992, 1999), Pharmacotherapy Handbook, Well et al., eds., Second Edition, Appleton and Lange, Stamford, Conn. (1998, 2000).

La presente descripción también proporciona un método para la modulación o tratamiento de al menos una enfermedad cardiovascular en una célula, tejido, órgano, animal, o paciente incluyendo pero limitándose a, al menos un síndrome de aturdimiento cardíaco, infarto de miocardio, fallo congestivo de corazón, golpe, golpe isquémico, hemorragia, síndrome coronario agudo, arterioesclerosis, aterosclerosis, retinosis, enfermedad de diabetes arterioesclerótica, hipertensión, hipertensión arterial, hipertensión reno vascular, síncope, shock, sífilis del sistema cardiovascular, fallo cardíaco, cor pulmonar, hipertensión pulmonar primaria, arritmias cardíacas, latidos ectópicos auriculares, aleteo auricular, fibrilación auricular (sostenida o paroxismal), síndrome post-perfusión, respuesta inflamatoria al bypass cardiopulmonar, taquicardia auricular caótica o multifocal, taquicardia QRS estrecha regular, arritmias específicas, fibrilación ventricular, arritmias de rama His, bloqueo atrio ventricular, bloqueo de rama, desordenes isquémicos de miocardio, enfermedad de la arteria coronaria, angina pectoral, infarto de miocardio, cardiomiopatía, cardiomiopatía congestiva dilatada, cardiomiopatía restrictiva, enfermedad de las válvulas del corazón, endocarditis, enfermedad pericárdica, tumores cardiacos, aneurismas aórticos y periféricos, disección aórtica, inflamación de la aorta, oclusión de la aorta abdominal y sus ramificaciones, desordenes vasculares periféricos, desordenes oclusivos arteriales, enfermedad aterosclerótica periférica, tromboangitis obliterana, desordenes arteriales periféricos funcionales, fenómeno o enfermedad de Raynaud, acrocianosis, eritomegalgia, enfermedades venosas, trombosis venosa, venas varicosas, fistula artero venosa, linfedema, lipedema, angina inestable, lesión por reperfusión, síndrome post bombeo, enfermedad de isquemia por reperfusión, y similares. Dichos métodos pueden opcionalmente comprender la administración de una cantidad efectiva de la composición o composición farmacológica que comprenda al menos una estructura de proteína en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento o terapia.

La presente descripción también proporciona aun método para modular o tratar al menos la enfermedad infecciosa en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero no limitándose a, al menos un: infección bacteriana aguda o crónica, incluyendo infecciones bacterianas, virales fúngicas, infección VIH/neuropatía VIH, meningitis, hepatitis (p. ej., A, B o C, o similares), artritis séptica, peritonitis, neumonía, epiglotitis, E. coli O157:h7, síndrome hemolítico urémico/púrpura trombocitopénica trombótica, malaria, fiebre hemorrágica dengue, leishmaniasis, lepra, síndrome del shock tóxico, miositis estreptococal, gas gangrena, tuberculosis mico bacteriana, mico bacteriana aviar intracelular, neumonía por Pneumocystis carinii, enfermedad inflamatoria pélvica, orquitis/epididimitis, legionella, enfermedad de Lyme, gripe A, virus Epstein-barr, síndrome hemafagocítico asociado a un virus, meningitis aséptica/encefalitis viral, y similares.

La presente descripción también proporciona un método para la modulación o tratamiento de al menos una enfermedad maligna en un célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos uno entre: leucemia, leucemia aguda, leucemia aguda linfoblástica (ALL), leucemia aguda linfocítica, células B, células T o FAB ALL, leucemia aguda mielóide (AML), leucemia aguda mielógena, leucemia crónica mielítica (CML),

leucemia crónica linfocítica (CLL), leucemia de células peludas, síndrome mielodiplástico (MDS), linfoma, enfermedad de Hodgkin, linfoma maligno, linfoma no-Hodgkin, linfoma de Burkitt, mieloma múltiple, sarcoma de Kaposi, carcinoma colorrectal, carcinoma pancreático, carcinoma nasofaríngea, histiocitos maligno, síndrome paraneoplásico/hipercalcemia maligna, tumores sólidos, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer colorectal, 5
cáncer endometrial, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer hereditario nonpoliposico, linfoma de Hodgkin, cáncer de hígado, cáncer de pulmón, cáncer de pulmón de células no pequeñas, cáncer de ovario, cáncer pancreático, cáncer de próstata, carcinoma celular renal, cáncer testicular, adenocarcinomas, sarcomas, melanoma maligno, hemangioma, metástasis, resorción ósea inducida por el cáncer, dolor óseo inducido por el cáncer y similares.

10 La presente descripción también proporciona un método para modular o formular al menos una enfermedad neurológica en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero no limitándose a, al menos uno entre: enfermedades neurodegenerativas, esclerosis múltiple, migrañas, complejo de demencia por SIDA, enfermedades desmielinizantes, tales como la esclerosis múltiple y la mielitis transversal aguda; desordenes extra piramidales y cerebrales, tales como las lesiones del sistema cortico espinal; desordenes del ganglio basal, desordenes del movimiento hiperquinético, tales como Corea Huntington o corea senil; desordenes del movimiento inducidos por fármacos, tales como los inducidos por fármacos que bloquean los receptores de dopamina CNS; desordenes del movimiento hipoquinético, tales como la enfermedad de Parkinson; Palsy progresivo de supra núcleo; lesiones estructurales del cerebro; degeneraciones espino cerebrales, tales como la ataxia espinal, ataxia de Friedrich, 20
degeneraciones cerebrales corticales, degeneraciones de sistemas múltiples (Mencel, Dejerine-Thomas, Shi-Drager, y Machado-Joseph); desordenes sistémicos (enfermedad de Refsum, abetalipopotemia, ataxia, telangiectasia, y desorden mitocondrial multi-sistema); desordenes desmielinizantes del núcleo, tales como la esclerosis múltiple, mielitis transversal aguda; y desordenes de la unidad motora, tales como atrofas musculares neurogenéticas (degeneración de las células del asta anterior, tales como esclerosis lateral amiotrópica, atrofia muscular de la espina infantil y atrofia muscular de la espina juvenil); Alzheimer; Síndrome de Down en mediana edad; enfermedad de cuerpos difusos de Lewy; Demencia senil o de cuerpos tipo Lewy; síndrome Wenickle-Korsakoff; alcoholismo crónico; enfermedad de Creutzfeldt-Jakob; panencefalitis esclerósica subaguda, enfermedad de Hallerorden-Spatz; Demencia pugilística; enfermedad neurotraumática (p. ej., lesión de la medula espinal, lesión cerebral, conmoción cerebral, conmoción cerebral repetitiva); dolor; dolor inflamatorio; autismo; depresión; golpes; desordenes cognitivos; 30
epilepsia; y similares. Dicho método puede opcionalmente comprende la administración de una cantidad efectiva de una composición o composición farmacológica que comprende al menos un anticuerpo TNF o porción específica o variante en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita tal modulación, tratamiento o terapia. Ver, p. ej., the Merck Manual, 16th Edition, Merck & Company, pathway, NJ (1992).

35 La presente invención también proporciona un método para la modulación o tratamiento de al menos una herida, trauma o lesión de tejidos o condiciones crónicas relacionadas, en una célula, tejido, órgano, animal o paciente, incluyendo, pero sin limitarse a, al menos uno entre: lesión corporal o trauma asociado con la cirugía oral incluyendo la cirugía periodontal, extracción dental, tratamiento endodóncico, implantes o inserciones dentales, aplicación y uso de prótesis dentales, o cualquiera en la que la herida es seleccionada de un grupo consistente en 40
heridas asépticas, heridas contusionadas, heridas incisivas, heridas laceradas, heridas no-penetrantes, heridas abiertas, heridas penetrantes, heridas perforadas, heridas puntuales, heridas sépticas, heridas subcutáneas y de miocardio; o cualquiera en la que la herida es seleccionada de un grupo consistente en úlceras isquémicas, úlceras de decúbito, fistulas, mordeduras graves, quemaduras térmicas y heridas de zonas donantes; o cualquiera en la cual la herida es ulcerosa, traumática o un herpes asociado a una herida.

45 Las heridas y/o úlceras se encuentran generalmente sobresaliendo de la piel o superficie mucosa o al menos como resultado de un infarto en un órgano ("golpe"). Una herida puede ser el resultado de un defecto en el tejido blando o una lesión o cualquier condición subyacente. En este contexto, el término "piel" se refiere a la superficie exterior de un cuerpo o animal, incluso el humano, y abarca toda o casi toda la piel, así como una 50
superficie de piel lesionada. El término "mucosa" se refiere a la mucosa sin dañar o casi sin dañar de un animal, como el humano, y puede ser oral, bucal, aural, nasal, pulmonar, del ojo, gastrointestinal, vaginal o rectal.

55 El este contexto el término "herida" denota una lesión corporal con interrupción de la integridad normal o estructura del tejido. El termino también abarca los términos "llaga", "lesión", "necrosis", y "úlceras". Normalmente, el término "llaga" es popular para casi todas las lesiones de la piel o membranas mucosas y el término "úlceras" es un defecto local, o excavación, de la superficie de un órgano o tejido, que es producido por el desprendimiento de tejido necroso. "Lesión" generalmente se refiere a un defecto en el tejido. La necrosis se refiere a tejido muerto resultante de una infección, lesión, inflamación o infarto.

60 El término "herida" en este contexto denota cualquier herida (ver más abajo la clasificación de heridas) y en cualquier estado en el proceso de curación, incluyendo el estado antes de que la curación haya comenzado o incluso antes de que una herida específica como una incisión quirúrgica sea realizada (tratamiento profiláctico). Entre los ejemplos de heridas que van en acordancia con esta descripción tenemos, p. ej., heridas asépticas, 65
contusiones, incisiones, laceraciones, heridas no penetrantes (p. ej., heridas en las cuales no hay interrupción de la piel, pero hay lesión en la estructura subyacente), heridas abiertas, heridas penetrantes, perforaciones, punciones, heridas sépticas, heridas subcutáneas, etc. Como ejemplos de llagas tenemos, llagas por presión, aftas, llagas de

5 cromos, llagas frías, llagas por yacer en cama, etc. Como ejemplos de úlceras tenemos, p. ej., úlceras pépticas, úlceras duodenales, úlceras gástricas, úlcera de la gota, úlcera diabética, úlcera isémica hipersensible, úlcera de estasis, úlcera cruris (úlcera venosa), úlcera sublingual, úlcera submucosa, úlcera sintomática, úlcera trópica, úlcera tropical, úlcera venérea, p. ej., causada por gonorrea (incluyendo uretritis, endocervicitis y proctitis). Las condiciones relacionadas con las heridas y llagas que deben ser satisfactoriamente tratadas de acuerdo con la descripción son las quemaduras, ántrax, tétanos, gas gangrena, escarlatina, erisipela, sicosis de la barba, foliculitis, impétigo contagioso, o impétigo ampollar, etc. Frecuentemente existe cierta superposición entre el uso del término “herida” y “úlceras” y “herida” y “llaga” y, además, los términos son habitualmente utilizados aleatoriamente. Por este motivo, como se ha mencionado anteriormente, en este contexto el término “herida” abarca los términos “úlceras”, “lesión”, “llaga” e “infarto” y los términos serán indiscriminadamente utilizados a no ser que se indique lo contrario.

10 El tipo de heridas a ser tratadas de acuerdo con la descripción incluye (i) heridas generales, como, p. ej., quirúrgicas, traumáticas, infecciosas, isquémicas, térmicas, químicas y ampollas; (ii) heridas específicas de la cavidad bucal, como, p. ej., heridas post-extracción, heridas endodancias especialmente en conexión con el tratamiento de quistes y abscesos, úlceras y lesiones de bacterias, virus u origen inmunológico, mecánicos, químicos, térmicos, infecciosos y liquenoides; herpes, estomatitis aftosa, gingivitis ulcerosa con necrosis aguda y síndrome de la boca quemada son ejemplos específicos; y (iii) heridas en la piel, tales como, p. ej., neoplasma, quemaduras (p. ej., químicas, térmicas), lesiones (bacterianas, virales, auto inmunológicas), mordeduras e incisiones quirúrgicas. Otro modo de clasificación de heridas es (i) pequeñas pérdidas de tejido debido a incisiones quirúrgicas, abrasiones menores y mordeduras pequeñas, o (ii) pérdidas de tejido significantes. El último grupo incluye úlceras isquémicas, llagas de presión, fistulas, laceraciones, mordeduras severas, quemaduras térmicas y heridas en zonas donantes (en tejidos blandos y duros) e infartos.

15 Otras heridas que son de importancia en conexión con la presente descripción son las úlceras isquémicas, llagas de presión, fistulas, mordeduras severas, quemaduras térmicas y heridas en zonas donantes. Las úlceras isquémicas y llagas de presión son heridas que normalmente curan muy lentamente y en especial en esos casos, un proceso de curación más rápido y mejorado es de gran importancia para el paciente. Además, los costes que envuelven el tratamiento de los pacientes que sufren de estas heridas que son marcadamente reducidos cuando la curación es mejorada y se lleva a cabo rápidamente.

20 Las heridas en zonas donantes, son heridas que p. ej., suceden en conexión con el reemplazo de tejido duro de una parte del cuerpo a otra parte del cuerpo, p. ej., en conexión con un trasplante. Las heridas resultantes de tales operaciones son muy dolorosas y, por lo tanto, la rápida curación es muy valorable. El término “piel” es empleado en un sentido muy amplio abarcando la capa epidérmica y – en los casos en los que la superficie de la piel está más o menos lesionada – también la capa dermal de la piel. Aparte del stratum corneum, la capa epidérmica de la piel es la capa exterior (epitelial) y la capa más profunda que conecta el tejido de la piel es llamada dermis.

25 Cualquier método de la presente descripción puede comprender la administración de una cantidad efectiva de la composición o composición farmacéutica que comprenda al menos una estructura de proteína en una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesita dicha modulación, tratamiento o terapia. Dicho método, opcionalmente puede, comprender la coadministración o combinación de terapias para el tratamiento de enfermedades o desórdenes, mediante la administración de al menos una estructura de proteína, porción específica o variante del mismo, además comprende la administración, antes concurrentemente, y/o después, de al menos uno seleccionado de entre antagonistas TNF (p. ej., pero no limitándose a, TNF químico o antagonista de proteína, anticuerpo TNF monoclonal o policlonal o fragmento del mismo), un receptor TNF soluble (p. ej., p55, p70 o p85) o fragmento del mismo, fusión de polipéptidos de los mismos, o un pequeña molécula antagonista TNF, (p. ej., una proteína I o II aglomerante de TNF (TBP-1 o TBP-II), nerlimonmab, infliximab, etanercept (Enbrel™), adalimumab (Humira™), CDP-571, CDP-870, afelimomab, lenercept, y similares), un anti-reumático (p. ej., metotrexato, auranofina, aurotioglucosa, azatioprina, tiomolato sodio de oro, sulfato de hidroxyclozoquina, leflunomida, sulfasalicina), un relajante muscular, un narcótico, un fármaco anti-inflamatorio no esteroide (NSAID), un analgésico, un anestésico, un sedante, un anestésico local, un bloqueador neuromuscular, un antimicrobiano (p. ej., aminoglicosido, un anti fúngico, un antiparasitario, un antiviral, un carbapenem, cefalosporina, una fluoroquinolona, un macrolido, una penicilina, una sulfamida, una tetraciclina, otro antimicrobiano), un anti-soriática, un cortico esteroide, un esteroide anabólico, un agente relacionado con la diabetes, un mineral, un nutricional, un agente tiroideo, una vitamina, una hormona relacionada con el calcio, un anti-diarreico, un antitusivo, un antiemético, un anti-ulceroso, un laxante, un anti-coagulante, una eritropoyetina (p. ej., epoetin alfa), un filgastrim (p. ej., G-CSF, Neupogen), un sargramostim (GM-CSF, Leukine), una inmunización, una inmunoglobulina, un inmunosupresor (p. ej., basiliximab, ciclosporina, declizumab), una hormona del crecimiento, un fármaco de reemplazo de hormonas, un modulador de receptor de estrógeno, un midriático, un cicloplegico, un agente alquilante, un anti metabolito, un inhibidor miótico, un radiofármaco, un antidepresivo, agente anti maníaco, un anti-psicótico, un ansiolítico, un hipnótico, un simpatomimético, un estimulante, doneprezil, tacrina, medicación para el asma, un beta agonista, un esteroide inhalado, un inhibidor de leukotrieno, una metilxantina, una cromolina, una epinefrina o análoga, dornasa alfa (Pulmozyme), una citoquina o antagonista de citoquina. Las dosis adecuadas son conocidas en el arte. Ver, p. ej., Wells eta l., eds., Pharmacotherapy Handbook, 2nd Edition, Appleton and Lange, Stamford, CT (2000); PDR Pharmacopoeia, Tarascon Pocket Pharmacopoeia 2000, Deluxe Edition, Tarascon Publishing, Loma Linda, CA

(2000); Nursing 2001 Handbook of Drugs, 21st edition, Springhouse Corp., Springhouse, PA, 2001; Health Professional's Drug guide 2001, ed., Shannon, Wilson, Stang, Prentice-Hall, Inc, Upper Saddle River, NJ.

5 Entre las citoquinas se incluye cualquier citoquina conocida. Ver, p. ej., CopewithCitokines.com. Entre los antagonistas de Citoquina se incluyen, pero no se limitan a, cualquier estructura de proteína, anticuerpo, fragmento o mimético, cualquier receptor soluble, fragmento o mimético, cualquier pequeña molécula antagonista, o combinación de las mismas.

10 Generalmente, el tratamiento de las condiciones patológicas es afectado mediante la administración de una cantidad efectiva o dosificación de una composición de al menos una estructura de proteína que en total, de media, está en un rango de entre 0,001 a 500 miligramos de al menos una estructura de proteína por kilogramo de paciente por dosis, y, preferiblemente, de al menos entre 0,1 y 100 miligramos de la estructura de proteína/kilogramo de paciente para administraciones simples o múltiples, dependiendo de la actividad específica del agente activo que contenga la composición. Alternativamente, la concentración de suero efectivo puede comprender 0,1-5000µg/ml de concentración de suero por administración simple o múltiple. Las dosis adecuadas son conocidas por los practicantes médicos y, por supuesto, dependerán del estado de enfermedad particular, actividad específica de la composición que va a ser administrada, y las particularidades del paciente que va a ser tratado. En algunos casos, para alcanzar la dosis terapéutica deseada, puede ser necesario proporcionar administraciones repetidas, p. ej., administraciones individuales repetidas de un dosis particular monitorizada o medida, donde las administraciones individuales son repetidas hasta que se logra la dosis diaria o el efecto deseado.

25 Las dosis preferibles pueden opcionalmente incluir entre 0,1-99 y/o 100-500 mg/kg/administración, o cualquier rango, valor o fracción de la misma, para conseguir una concentración de suero de 0,1-5000µg/ml para administraciones simples o múltiples, o cualquier rango, calor o fracción de la misma. Un rango de dosis preferente para la estructura de proteína de la presente invención está comprendido entre desde 1 mg/kg, a más de 3, 6 o 12 mg/kg del peso del cuerpo del paciente.

30 Alternativamente, la dosis administrada puede variar dependiendo de factores conocidos, como las características fármaco-dinámicas del agente particular, y su modo y vía de administración; edad, salud, y peso del recipiente; naturaleza y extensión de los síntomas, clase del tratamiento, frecuencia del tratamiento, y los efectos deseados. Normalmente una dosis de ingrediente activo puede ser de entre 0,1 a 100 miligramos por kilogramo de peso del cuerpo del paciente. Ordinariamente, 0,1 a 50, y preferiblemente, 0,1 a 10 miligramos por kilogramo de administración en forma de liberación sostenida es efectiva para obtener los resultados deseados.

35 Como ejemplo no-limitador, el tratamiento de humanos y animales puede ser proporcionado como una dosis de una vez o periódica de la menos una estructura de proteína de la presente invención de entre 0,1 a 100 mg/kg o cualquier rango, valor o fracción de la misma por día, de al menos una del día, o, alternativa o adicionalmente, al menos una a la semana 1-, o, alternatively o adicionalmente, al menos una cada 1-20 años, o cualquier combinación de las mismas, utilizando dosis simples, infusiones o repetidas. –

40 Las formas de dosificación (composición) adecuadas para la administración interna generalmente contienen entre 0,001 miligramos a 500 miligramos de ingrediente activo por unidad o contenedor. En estas composiciones farmacéuticas el ingrediente activo será generalmente presentado en una cantidad de entre 0,5-99,999% de peso basado en el peso total de la composición.

45 Para la administración parenteral, la estructura de proteína puede ser formulado como una solución, suspensión, emulsión, partícula, polvo, o polvo liofilizado, o proporcionado separadamente, con un vehículo parenteral farmacéuticamente aceptado. Son ejemplos de dichos vehículos el agua, salino, solución de Ringer, solución de dextrosa, y alrededor de 1-10% de albumina de suero humano. Los liposomas y vehículos no acuosos, como los aceites estables, también pueden ser utilizados. El vehículo o polvo liofilizado puede contener aditivos que mantienen la isotonicidad (p. ej., cloruro de sodio, manitol) y estabilidad química (p. ej., soluciones amortiguadoras y conservantes). La formulación será esterilizada por técnicas conocidas y adecuadas.

50 Los portadores farmacéuticamente adecuados están descritos en la edición más reciente de Remington's Pharmaceutical Sciences, A. Osol, un texto de referencia estándar en este ámbito.

Administración Alternativa

60 Muchos modos conocidos y desarrollados pueden ser empleados de acuerdo con la presente descripción para administrar cantidades farmacéuticamente efectivas de al menos una estructura de proteína de acuerdo con la presentan invención. Mientras que en la siguiente descripción se emplea la administración pulmonar, otros modos de administración pueden ser utilizados de acuerdo con los resultados presentados en la presente descripción. Los armazones de proteína de la presente invención pueden ser liberados en un portador, como una solución, emulsión, coloide, suspensión, o como polvo seco, utilizando cualquier herramienta o método adecuado para la administración por inhalación o cualquier otro método descrito en la presente o tal y como se conoce en el arte.

Formulaciones y Administración Parenteral

Las formulaciones para la administración parenteral pueden contener como excipiente común agua esterilizada o salino, glicoles poli-alcalinos, como el polietileno glicol, aceites de origen vegetal, naftalenos hidrogenados y similares. Las suspensiones acuosas o aceitosas para inyección pueden ser preparadas utilizando un emulsionante o humectante y un agente en suspensión, de acuerdo con los métodos conocidos. Los agentes para inyección pueden ser un no-tóxico, un agente diluido para la administración no-oral, como una solución acuosa, una solución estéril inyectable o suspensión en un solvente. Como vehículo o portador solvente están permitidos, agua, solución de Ringer, salino isotónico, etc.; como solvente ordinario o solvente en suspensión, puede utilizarse un aceite estéril no volátil. Con este objetivo, puede utilizarse cualquier tipo de aceite no volátil y ácido graso, incluyendo aceites grasos naturales, sintéticos o semi-sintéticos o ácidos grasos; mono-, di- o tri-glicéridos naturales, sintético o semi-sintéticos. La administración parenteral es conocida en el arte e incluye, pero no se limita a, medios convencionales de inyección, un aparato de inyección sin aguja de gas presurizado como se describe en U.S. Pat. No. 5.851.198 y un aparato laser perforados tal y con ose describe en U.S. Pat. No. 5.839.446.

Liberación Alternativa

La descripción también se refiere a la administración de al menos una estructura de proteína por medio parenteral, subcutáneo, intra-muscular, intra-venoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginoso, intra-cavitario, intra-celial, intra-cerebral, intra-cerebro ventricular, intra-cólico, intra-cervical, intra-gástrico, intra-hepático, intra-miocardial, intra-ostial, intra-pélvico, intra-pericárdico, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostático, intra-pulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retinal, intra-espinal, intra-sinovial, intra-torácico, intra-uterino, intra-vesical, intra-lesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal, o transdérmico. Al menos una composición de la estructura de proteína puede ser preparada para uso parenteral (subcutáneo, intramuscular o intravenoso) o cualquier otra administración particularmente en forma de solución líquida o suspensión; para el uso particular en administración vaginal o rectal en formas semisólidas, tales como, pero no limitándose a, cremas y supositorios; para la administración bucal o sublingual, tales como, pero no limitado a, pastillas o capsulas; o intra-nasalmente, tales como, pero no limitados a, polvos, gotas nasales o aerosoles o ciertos agentes; o transdérmicamente, tales como pero no limitados a geles, ungüentos, lociones, suspensiones o sistemas de liberación por parches con potenciadores químicos como el dimetil sulfoxido que tanto modifican la estructura de la piel como aumentan la concentración del fármaco en el parche transdérmico (Junginger et al., In "Drug Permeation Enhancement"; Hsieh, D. S., Eds., pp. 59-90; Marcel Dekker, Inc. New York 1994) o con agentes oxidantes que capacitan la aplicación de formulaciones que contengan proteínas y péptidos en la piel (WO 98/53847) o aplicaciones de ámbitos eléctricos para crear vías de transporte transitorias, tales como la electroporación, o para mejorar la movilidad de fármacos cargados a través de la piel, como la iontoforesis, o aplicación de ultrasonidos, tales como la sonoforesis (U.S. Pat. Nos. 4.309.989 y 4.767.402).

Administración Pulmonar/Nasal

Para la administración pulmonar, preferiblemente, se libera al menos una estructura de proteína con tamaño de partícula para alcanzar las vías respiratorias inferiores del pulmón o seno. De acuerdo con la descripción, al menos una estructura de proteína puede ser liberado por cualquier otra variedad de aparatos para la inhalación o nasales conocidos en el arte para la administración de un agente terapéutico por inhalación. Estos aparatos capaces de depositar formulaciones aerosolizadas en la cavidad del seno o alveolar de un paciente incluye inhaladores de dosis medidas, nebulizadores, generadores de polvo seco, espráis y similares. Otros aparatos adecuados para dirigir la administración pulmonar o nasal de una estructura de proteína son también conocidos en el arte. Todos estos aparatos pueden utilizar formulaciones adecuadas para la administración dla estructura de proteína en un aerosol. Tales aerosoles pueden comprender tanto soluciones (tanto acuosa como no-acuosa) o partículas sólidas.

Los inhaladores de dosis medidas como Ventolin®, generalmente utilizado como propulsor de gas que requiere la actuación durante la inspiración (ver, p.ej., WO 94/16970, WO 98/35888). Inhaladores en polvo seco como Turbuhaler™ (Astra), Rotahaler® (Glaxo), Diskus® (Glaxo), inhalador Spiros™ (Dura), aparatos comercializados por Inhale Therapeutics, y el inhalador de polvo Spinhaler® (Fisons), utilizan el accionado por respiración de un polvo mixto (US 4668218 Astra, EP 237507 Astra, WO 97/25086 Glaxo, WO 94/08552 Dura, US 5458135 Inhale, WO 94/06498 Fisons). Nebulizadores como AERx™ Aradigm, el nebulizador Ultravent® (Mallinckrodt) y el nebulizados Acorn II® (Marquest Medical Products) (US 5404871 Aradigm, WO 97/22376), produce aerosoles desde soluciones, mientras que los inhaladores de dosis medidas, inhaladores de polvo seco, etc. generan aerosoles de pequeñas partículas. Estos ejemplos específicos de aparatos inhaladores comercialmente asequibles se presentan como una representación de aparatos específicos adecuados para la práctica de esta descripción, y no limitan el objetivo de la descripción.

Preferiblemente, una composición que comprende al menos una estructura de proteína es liberada por un inhalador de polvo seco o espray. Hay muchos elementos deseables en un aparato de inhalación para la administración de al menos una estructura de proteína de la presente descripción. Por ejemplo, la liberación por aparato de inhalación es ventajosamente fiable, reproducible, y precisa. El aparato de inhalación puede liberar opcionalmente pequeñas partículas secas, p. ej., menos de 10µm, preferiblemente entre 1-5µm, para la buena

respirabilidad.

Administración de Composiciones de la estructura de Proteína como Espray

5 Un espray que incluye la composición de una estructura de proteína puede ser reproducido forzando una solución o suspensión de al menos estructura de proteína a través de una boquilla bajo presión. El tamaño de la boquilla y la configuración, la presión aplicada, y la velocidad de alimentación líquida puede ser elegido para alcanzar la cantidad y el tamaño de partícula deseado. Un electro espray puede ser producido, por ejemplo, mediante un campo eléctrico en conexión con un capilar o boquilla de alimentación. Ventajosamente, las partículas de al menos una composición de la estructura de proteína liberada por un espray tienen un tamaño de partícula inferior a 10µm, preferiblemente, en un rango de entre 1µm a 5µm, y, más preferiblemente, entre 2- 3µm.

15 Las formulaciones de al menos una composición de la estructura de proteína adecuada para el uso con un espray, generalmente incluye la composición de una estructura de proteína en una solución acuosa en una concentración de entre 0,1-100 mg de al menos una composición de la estructura de proteína por ml de solución o mg/gm, o cualquier rango, valor o fracción de las mismas. La formulación puede incluir agentes, tales como excipientes, una solución amortiguadora, un agente de isotonicidad, un conservante, un surfactante, y preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de la composición de la estructura de proteína, como la solución amortiguadora, un agente reductor, granel de proteína, o carbohidrato. Los graneles de proteína útiles en la formulación de composiciones de la estructura de proteína incluyen albumina, protamina, o similares. Los típicos carbohidratos utilizados en la formulación de composiciones de la estructura de proteína incluyen la sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, y similares. La formulación de la composición de la estructura de proteína también puede incluir un surfactante, el cual puede reducir o prevenir la agregación inducida por la superficie de la composición de la estructura de proteína causada por la atomización de la solución en forma de aerosol. Pueden emplearse varios surfactantes convencionales, como ésteres de ácidos grasos polioxietileno y alcoholes, y ésteres de sorbitol de ácidos grasos polioxietileno. Las cantidades generalmente oscilarán entre 0,001 y 14% del peso de la formulación. Los surfactantes preferidos para los objetivos de esta descripción son el monooleato de polioxietileno sorbitán, polisorbato 80, polisorbato 20, o similares. Otros agentes adicionales conocidos en el arte para la formulación de una proteína, como los armazones de proteína, o sus porciones específicas o variantes, también pueden incluirse en la formulación.

Administración de Composiciones de la estructura de Proteína mediante Nebulizador

35 Las composiciones de la estructura de proteína de la invención pueden ser administradas con un nebulizador, como un nebulizador de chorro o un nebulizador ultrasónico. Generalmente, en un nebulizador a chorro, se utiliza una fuente de aire comprimido para crear un chorro de aire a alta velocidad a través de un orificio. Según el gas se expande más allá de la boquilla, se crea una región de baja presión, que dirige la solución de composición de la estructura de proteína a través de un tubo capilar conectado a la reserva de líquido. La corriente líquida del tubo capilar se abre camino a través de unos filamentos inestables y las gotas que están en el tubo, creando el aerosol. Se pueden emplear diferentes rangos de configuraciones, velocidades de flujo y tipos de deflación para lograr las características necesarias de un nebulizador a chorro. En un nebulizador ultrasónico, se utiliza energía eléctrica de alta frecuencia para crear energía mecánica de vibración, generalmente utilizando un transductor piezoeléctrico. Esta energía se trasmite a la formulación de la composición de la estructura de proteína tanto directamente como a través de un fluido de acoplamiento, creando un aerosol que incluye la composición de la estructura de proteína. Ventajosamente, partículas de la composición de la estructura de proteína liberadas por un nebulizador tienen un tamaño de partícula menor a 10µm, preferiblemente, en un rango de entre 1-5µm, y, más preferentemente, entre 2 y 3µm.

50 Las formulaciones de al menos una estructura de proteína adecuadas para su uso con nebulizador, tanto de chorro como ultrasónico, generalmente incluyen una concentración de entre 0,1-100 mg de al menos una estructura de proteína por ml de solución. La formulación puede incluir agentes, tales como un excipiente, una solución amortiguadora, un agente de isotonicidad, un conservador, un surfactante, y preferiblemente, zinc. La formulación también puede incluir un excipiente o agente para la estabilización de al menos una composición de la estructura de proteína, como una solución amortiguadora, un agente reductor, un granel de proteína, o un carbohidrato. Los graneles de proteína útiles en la formulación de composiciones de al menos una estructura de proteína incluyen albumina, protamina y similares. Los típicos carbohidratos útiles en la formulación de al menos una estructura de proteína incluyen sacarosa, manitol, lactosa, trehalosa, glucosa, y similares. La formulación de al menos una estructura de proteína también puede incluir un surfactante, el cual puede reducir o prevenir la agregación por superficie inducida de al menos una estructura de proteína causado por la atomización de la solución en forma de aerosol. Los surfactantes preferibles para los propósitos de esta descripción son el monoolato de sorbitán polioxietileno, polisorbato 80, polisorbato 20 y similares. También pueden incluirse en la formulación agentes conocidos en la materia para la formulación de una proteína, como una estructura de proteína.

Administración de Composiciones de la estructura de Proteína mediante Inhalador de Dosis Medidas

65 Un inhalador de dosis medidas (MDI) contiene, un propulsor, al menos una estructura de proteína, y

cualquier excipiente o aditivo en un frasco como mezcla que incluye un gas comprimido en estado líquido. La actuación de la válvula de medición libera la mezcla como un aerosol, preferiblemente conteniendo partículas de un tamaño de menos de 10µm, preferentemente, entre 1 y 5µm, y, más preferentemente, entre 2 y 3µm. El tamaño deseado de partícula de aerosol puede conseguirse empleando una formulación de composición de la estructura de proteína producida por varios métodos conocidos por los expertos en la materia, incluyendo el chorro, el espray en seco, el punto crítico de condensación, o similares. Los inhaladores de dosis medidas preferentes incluyen a los fabricados por 3M o Glaxo y que utilizan un propulsor de hidrofluorocarbono. Las formulaciones de al menos una estructura de proteína para ser utilizadas con un inhalador de dosis medidas generalmente incluirán un polvo fino dividido que contenga al menos una estructura de proteína como una suspensión en un medio no acuoso, por ejemplo, suspendido en un propulsor con la ayuda de un surfactante. El propulsor puede ser cualquier material convencional empleado para este propósito, como el clorofluorocarbono, el hidroclorefluorocarbón, el hidrofluorocarbón, o el hidrocarbono, incluyendo triclorofluorocarbón, diclorodifluorometano, diclorotetrafluoroetano y 1,1,1,2-tetrafluoroetano, HFA-134^a (hidrofluoroalcano-134^a), HFA-227 (hidrofluoroalcano-227) o similares. Preferiblemente, el propulsor es un hidrofluorocarbón. El surfactante puede ser elegido para estabilizar al menos una estructura de proteína como suspensión en el propulsor, para proteger el agente activo contra la degradación química, y similares. Entre los surfactantes apropiados se encuentra el triolato de sorbitán, lecitina de soja, ácido oleico, y similares. En algunos casos, en las soluciones de aerosol se prefiere usar solventes, como el etanol. También se pueden emplear agentes adicionales conocidos en el arte para la formulación de una proteína. Cualquier experto en la materia reconocerá que los métodos de la presente descripción pueden lograrse por administración pulmonar de al menos una composición de la estructura de proteína mediante aparatos no descritos en la presente.

Formulación y Administración Oral

Las formulaciones para la administración oral se basan en la coadministración de adyuvantes (p. ej., resorcinoles y surfactantes noniónicos, como el éter oleílico de polioxietileno y el éter n-hexadecilpolietileno) para aumentar artificialmente la permeabilidad de las paredes del intestino, así como la coadministración de inhibidores enzimáticos (p. ej., inhibidores de tripsina pancreática, diisopropilfluorofosfato (DFF) y trasilol) para inhibir la degradación enzimática. Las formulaciones para la liberación de los agentes hidrófilos que incluyen proteínas y armazones de proteína y una combinación de al menos dos surfactantes para la administración oral, bucal, mucosal, nasal, pulmonar, transmembrana vaginal o rectal son mostrado en U.S. 6.309.663. el constituyente compuesto activo de la forma de dosificación tipo sólida para la administración oral puede ser mezclada con al menos un aditivo, que incluye la sacarosa, lactosa, celulosa, manitol, trehalosa, rafinosa, maltitol, dextrano, almidones, agar, arginatos, quitinas, quitosanos, pectinas, goma tragacanto, goma arábiga, gelatina, colágeno, caseína, albumina, polímeros sintéticos o semisintéticos y glicéridos. Estas formas de dosificación también pueden contener otros tipos de aditivos, p. ej., agentes diluyentes inactivos, lubricantes, como el magnesio estearato, parabeno, agente conservador, como el ácido sórbico, ácido adsórbico, alfa-tocoferol, antioxidantes como la cisteína, desintegradores, aglutinantes, espesantes, agentes amortiguadores, agentes dulcificantes, agentes saborizantes, agentes perfumadores, etc.

Las pastillas y comprimidos pueden ser procesados en preparados con recubrimiento entérico. Las preparaciones líquidas para administración oral incluyen emulsiones, jarabes, elixires, suspensiones y preparados de solución permitidas para el uso médico. Los preparados pueden contener agentes diluyentes inactivos generalmente utilizados en este ámbito, p. ej., agua. Los liposomas también han sido descritos como sistema de liberación de fármacos para insulina y heparina (U.S. Pat. No. 4.239.754). Más recientemente, se han utilizado micro esferas de polímeros artificiales o mezclas de amino ácidos (poteinoides) para liberar fármacos (U.S. Pat. No. 4.925.673). Además, los compuestos portadores descritos en U.S. Pat. No. 5.879.681 y U.S. Pat. No. 5.871.753 y utilizados para liberar oralmente agentes biológicamente activos como se conoce en el arte.

Formulaciones y Administración Mucosal

La formulación para administrar oralmente un agente bioactivo encapsulado en uno o más polímeros biocompatibles o excipientes copolímeros, preferiblemente, un polímero o copolímeros biodegradable, proporcionando micro cápsulas que debido al tamaño adecuado de las micro cápsulas resultan ser alcanzados por el agente y tomados para la folliculi lymphatic aggregati, conocido como "Parche de Peter) o "GALT" del animal sin pérdida de efectividad debido a que los agentes han paso por el tracto gastrointestinal. Se puede encontrar una folliculi lymphatic aggregati similar en los tubos bronquiales (BALT) y el intestino delgado. Los tejidos anteriormente descritos son generalmente conocidos como tejidos linforreticulares asociados a la mucosa (MALT). Para la absorción a través de las superficies mucosas, las composiciones y métodos de administración de al menos una estructura de proteína incluyen una emulsión que comprende un gran número de partículas submicrónicas, una macromolécula mucoadhesiva, un péptido bioactivo, y una fase acuosa continua, que promueve la absorción a través de las). Las superficies mucosas logrando la mucoadhesión de las partículas de emulsión (U.S. Pat. No. 5.514.670). las superficies mucosas adecuadas para la aplicación de la emulsión de la presente descripción pueden incluir vías de administración corneal, conjuntival, bucal, sublingual, nasal, vaginal, pulmonar, estomacal, intestinal, y rectal. Las formulaciones para la administración vaginal o rectal, p. ej., supositorios, pueden contener como excipientes, por ejemplo, polialquilenoglicoles, vaselina, mantequilla de coco y similares. Las formulaciones para la

administración intranasal pueden ser sólidas y contener como excipientes, por ejemplo, lactosa o pueden ser soluciones acuosas o aceitosas de gotas nasales. Para la administración bucal, entre los excipientes se incluye el azúcar, estearato cálcico, estearato magnésico, almidón pre gelatinizado y similares (U.S. Pat. No. 5.849.695).

5 Formulaciones y Administración Transdérmica

Para la administración transdérmica, al menos una estructura de proteína es encapsulado en un aparato de liberación, como un liposoma o nano partícula polimérica, micro partícula, micro cápsula o micro esfera (refiriéndonos colectivamente como micro partículas si no se indica lo contrario). Se conoce un gran número de aparatos adecuados, incluyendo micro partículas hechas de polímeros sintéticos, como los ácidos poli hidróxidos, como los ácidos poli lácticos, ácidos poli glicoles y copolímeros de los mismos, poliortoesteres, poli anhídridos, y polifosfazanos y polímeros naturales, como el colágeno, y combinaciones de los mismos (U.S. Pat. No. 5.814.599).

Administración Prolongada y Formulaciones

Puede ser deseable para liberar los compuestos de la presente descripción al sujeto durante periodo prolongados en el tiempo, por ejemplo, para periodos de una semana a un año de administración sencilla. Varias formas de dosificación por liberación lenta, depósitos o implantes pueden ser utilizadas. Por ejemplo, una forma de dosificación puede contener una sal no toxica farmacéuticamente aceptada de los compuestos que tienen un bajo grado de solubilidad en cuerpos fluidos, por ejemplo, (a) una sal de adición ácida con un ácido polibásico, como el ácido fosfórico, ácido sulfúrico, ácido cítrico, ácido tartárico, ácido tánico, ácido pámico, ácido alginico, ácido poliglútemico, ácidos de naftaleno mono- o di-sulfónicos, ácidos poligalacturónicos y similares; (b) una sal con un catión metálico polivalente como el zinc, calcio, bismuto, bario, magnesio, aluminio, cobre, cobalto, níquel, cadmio o similares; o con un catión orgánico formado desde p. ej., N,N'-dibencil-etilenodiamina o etilenodiamina; o (c) combinaciones de (a) y (b), p. ej., una sal de tanato de zinc. Adicionalmente, los compuestos de la presente descripción o, preferiblemente, una sal relativamente insoluble, como aquellas recientemente descritas pueden ser formuladas como gel, por ejemplo, un gel de aluminio monoestearato con, p. ej., aceite de sésamo, adecuado para la inyección. Las sales preferentes son las sales de zinc, sales de tanato de zinc, sales pamoatos, y similares. Otro tipo de formulaciones para depósitos de liberación lenta para la inyección contendrían el compuesto o sal dispersa para la encapsulación en un polímero no antigénico, de degradación lenta, no toxico, como el ácido poli láctico/polímero de ácido poliglicólico como se describe en U.S. Pat. No. 3.773.919. Los compuestos o, preferiblemente, las sales relativamente insolubles, como las descritas anteriormente, también pueden ser formulados en pellets silásticos de matrices de colesterol, especialmente para su uso en animales. Formulaciones para sistemas de liberación lenta, depósitos o implantes, p. ej., liposomas gases o líquidos, son conocidos en la literatura (U.S. Pat. No. 5.770.222 y "Sustained and Controlled Release Drug Delivery Systems", J.R. Robinson ed., Marcel Dekker, Inc., NY, 1978).

Habiendo descrito la invención de manera general, la misma se entenderá mejor con los siguientes ejemplos de referencia, los cuales son proporcionados por medio de la ilustración y no se entienden como limitadores.

Ejemplos

Ejemplo 1 – Diseño Tencon

El tercer dominio FN3 de Tenascin humano (SEQ ID NO: 3) puede ser utilizado como estructura alternativo capaz de ser diseñado para unirse a moléculas objetivo específicas vía bucles de superficies expuesta estructuralmente análogas a las regiones que determinan la complementariedad de los anticuerpos (CDR). La temperatura de fusión de este dominio es de 54°C en PBS en su forma original. Con el objeto de producir una estructura de molécula con una estructura similar y propiedades físicas mejoradas, como la estabilidad térmica, se diseñó una secuencia de consenso basada en la alineación de los dominios 15FN3 del Tenascin humano (SEQ ID NO: 1-15).

El análisis del alineamiento de la secuencia múltiple en la Tabla 1 muestra que estos 15 dominios tienen identidad de secuencias con respecto al resto que va desde el 13 al 80%, con una media de identidad de secuencia entre pares del 29%. Una secuencia de consenso (SWQ ID NO: 16) fue diseñada mediante incorporación del amino ácido más conservado (frecuente) en cada posición desde la alineación mostrada en la Tabla 1. En los alineamientos en pares, la secuencia de consenso de la presente descripción (SEQ ID NO: 16), designada como Tencon, es idéntica a los dominios FN3 de Tenascin en el 34-59% de las posiciones con una media de identidad de secuencia del 43%.

Expresión y Purificación

La secuencia de amino ácido de Tencon (SEQ ID NO: 16) fue traducida de vuelta, resultando la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 17. Esta secuencia se ensambló por superposición de PCR, sub-clonado en un vector modificado pET15, transformado en BL21Star(DE3) E. coli (Invitrogen) y placado en platos de agar LB con 75µg/ml de carbenicilina. Se cogió una colonia simple y se cultivó durante la noche a 37°C en 50 ml de medio TB

que contiene 2% de glucosa y 100 µg/ml de carbenicilina. Este cultivo se empleó para sembrar 500 mL de medio de autoinducción (Overnight Express Instant TB Media, Novagen) en un matraz de 2,5 L de Ultra Yield (Thompson Instrument Company). El cultivo y la expresión se realizaron utilizando un programa doble (3 horas a 37°C, 300 rpm, seguido de 16 horas a 30°C, 250 rpm) en una incubadora con agitación ATR Multitron.

El cultivo se recolectó y centrifugó a 7000 rpm durante 15 minutos en un rotor JL8.1 para sedimentar las células. Las células se re-suspendieron en 30 ml de solución amortiguadora que contenía 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 0,37 mg/mL lisozima, inhibidor IX Complete Protease (EDTA-free: Roche) y Benzonase (Sigma-Aldrich, 0,25 µl/ml final) y lisado con un aparato de ultrasonidos Misonix XL2020 durante 5 minutos en hielo en modo pulso (5 segundos encendido, 30 segundos apagado). El material insoluble se retiró por centrifugado a 17.000 rpm durante 30 minutos e un rotor JA-17.

La proteína Tencon se purificó del lisado soluble con un proceso cromatográfico de 2 etapas. Primero, se capturó la proteína por cromatografía de afinidad con un metal inmovilizado, añadiéndole cuentas de 2 mL de agarosa Ni-NTA (Qiagen) al lisado y colocándolo en una plataforma oscilante durante una hora a 4°C. Después se empacó la resina en una columna de Poly-Prep (Bio-Rad) y lavado con 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol y 20 mM imidazol para eliminar el material no ligado. Las proteínas se eluyeron desde la resina con 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol y 500 mM imidazol. Se analizaron las fracciones mediante SDS-PAGE, tanto con tinte Coomassie como con tinte Western utilizando un conjugado HRP anti-His anticuerpo (Immunology Consultants Laboratory). Las fracciones deseadas se agruparon y dializaron en PBS pH 7.4. Como segundo paso de la purificación, se cargó la proteína en una columna Superdex-75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) equilibrada en PBS. Se analizaron las fracciones por medio de SDS-PAGE, y se agruparon y concentraron las fracciones que contenían Tencon utilizando Centriprep UltraCel YM-3 concentrator (Amicon).

Se determinó la concentración de proteínas utilizando un lector de placas BioTek para medir la absorbencia de la muestra a 280 nm. Se analizó la preparación final con tinte de Coomassie (Figura 1), tinte Western con anticuerpos anti-His, y mediante HPLC-SEC utilizando la columna G3000SW-XL (TOSOH Biosciences) equilibrado en PBS. El análisis SDS-PAGE demuestra que el Tencon migra entre 6 y 14 kDa, de acuerdo con la masa esperada de 10,7 kDa para la proteína monomérica. Se obtuvo un rendimiento de >50 mg de Tencon puro por litro de cultivo.

Caracterización Biofísica

La estructura y estabilidad del Tencon se caracterizó mediante espectroscopio de dicroísmo circular y escáner de calorimetría diferencial respectivamente. Las medidas de CD se realizaron en un espectrómetro AVIV a 20°C en PBS a una concentración de 0,2 mg/ml. El espectro en la Figura 2 muestra un mínimo de 218 nm, sugestivo de estructura β-sheet como era de esperar para una proteína que pertenece a la familia del FN3. Los datos DSC se obtuvieron calentando 0,5 mg/ml de solución del tercer dominio del FN3 de Tenascin o Tencon en PBS de 35°C a 95°C a un ratio de 1°C/minuto en un calorímetro N-DSCII (Applied Thermodynamics). Se sustrajo una curva de solo la solución amortiguadora para producir los perfiles mostrados en la Figura 3. Con estos datos, se calculó la temperatura de fusión de entre 54°C a 78°C para el tercer dominio de FN3 y Tencon, respectivamente, empleando el software CpCalc (Applied Thermodynamics). El plegado y desplegado de ambos dominios es reversible a estas temperaturas.

Análisis de Inmunogenicidad

Se utilizó un programa informático que modela la inmunogenicidad de las secuencias de amino ácidos humano para comparar la predicha inmunogenicidad de las secuencias de amino ácidos representados en el tercer dominio del FN3 del Tenascin humano, Tencon, y un gran número de anticuerpos terapéuticos (como se muestra en la Tabla 2). El chimeric mAbs y el mAb humano (adalimumab) analizado con el programa fue seguido de la aplicación de una tolerancia límite (elimina 9-mer péptidos con identidad del 100% de una secuencia codificada del genoma humano). La tolerancia límite no fue aplicada al Tenascin o Tencon. La tolerancia límite asume una amplia tolerancia de las células T a las secuencias mAb codificadas del genoma y se concentra en el análisis principalmente de nuevas secuencias en CDRs y dominios de acompañamiento.

Estos análisis predicen un bajo riesgo inmunogénico tanto del Tenascin como del Tencon basados en la probabilidad de un péptido 9-mer, derivado de la secuencia analizada se unirá a una o más moléculas HLA. La puntuación se pondera respecto a la prevalencia de cada alelo HLA. Se sumaron las puntuaciones de los modelos para que cada secuencia indicara un número sencillo que diese una descripción global PIR de cada secuencia (suma de puntuaciones). Los resultados de este análisis están sumados en la Tabla 2. El Tenascin demostró tener la puntuación global más baja (11,9). El Tencon, al igual que el Tenascin, puntuó principalmente no-aglutinantes y según lo previsto un bajo nivel en agretopes de riesgo inmunogénico (13,2). Las secuencias de Tenascin y Tencon puntúan favorablemente comparado con los anticuerpos terapéuticos.

Representación de Tencon en fago M13 mediante fusión pIX

El gen que codifica la secuencia de amino ácidos Tencon fue sub-clonada en el vector pPep9 de expresión

fagémida mediante PCR y restricción de la digestión de clonación, dando como resultado en el vector pTencon-pIX. Este sistema expresa N-terminally Myc-tagged Tencon como una fusión de T-terminal con el N-terminus de la proteína M13 pIX (Figura 4). El promotor Lac permite niveles inferiores de expresión sin IPTG y una expresión ampliada después de la adición de IPTG. La secuencia de señal OmpA fue adjuntada al N-terminus del Tencon para promover la translocación eficiente al peri-plasma. Se construyó un enlace corto TSGGGGS (SEQ ID NO: 141) entre el Tencon y el pIX para prevenir interacciones estéricas entre estas proteínas.

Como confirmación de la representación en la superficie de la partícula fago M13, se transformó el pTencon-pIX en XL1-Blue E. coli y se empleó una colonia sencilla para inocular 5 ml de cultivo LB suplementado con ampicilina. Este cultivo se cultivó a 37°C hasta alcanzar una fase mid-log, momento en el cual se le añadió 6^{10} pfu del fago ayudante VCSM13 y se incubó el cultivo a 37°C por 10 minutos sin agitación seguido de 50 minutos con agitación. El cultivo de fago ayudantes rescatado se diluyó en 50 ml de medio 2YT suplementado con ampicilina y kanamicina y cultivado a 37°C con agitación hasta que el O.D.₆₀₀ alcanza el 0,7, momento en el cual se añade el IPTG a la concentración final de 1 mM y se reduce la temperatura a 30°C. Tras 16 horas, se centrifugó el cultivo a 4000X g por 20 minutos y se recogió el flotante y se almacenó a 4°C para su análisis.

El enlace de las fago partículas con un anticuerpo anti-Myc (Invitrogen) fue empleado para confirmar la representación del Myc-Tencon construido en la superficie del fago M13. Se recubrió una placa de Maxisorp durante la noche con una concentración de 2,5 µg/ml con α-Myc o un anticuerpo anti-α (control negativo) y bloqueado con SuperBlock T20 (Pierce). Se realizó una serie de soluciones de dos tiempos flotantes del cultivo fagémido arriba descrito en PBS y se añadió a los pocillos de la placa recubierta. Tras una hora, la placa fue lavada con TBST y se añadió un anticuerpo α-M13 HRP a cada pocillo y de nuevo lavado con TBST seguido de una hora de incubación. Se le añadió el sustrato de Roche BD ELISA POD y se detectó la luminiscencia en un lector de placas (Tecan). La Figura 5 muestra que las partículas de Tencon-Myc se enlazan con las α-myc, pero no los pocillos recubiertos con anticuerpo anti-α o los pocillos de control no recubiertos de la placa en un modo dependiente de la concentración, confirmando la representación específica del Myc-Tencon en la partícula de fago M13.

Puede construirse un vector fagémido adicional para representar el Tencon y los miembros de la colección (ver Ejemplo 2) en fago M13 como fusión para recubrir la proteína pIII. Para este sistema, se reemplaza el gen pIX por el gen que codifica una versión trunca de pIII (Bass et al. 1990). Los cambios adicionales en comparación con el sistema mostrado en la Figura 4 incluyen el reemplazo de la secuencia de señal OmpA por la secuencia de señal DsbA, como secreción utilizando las secuencias que han sido mostradas para que sean beneficiosas para la representación de moléculas de la estructura alternativo estables (Steiner et al. 2006).

Ejemplo 2 – Generación de Colecciones Tencon

Se pueden realizar colecciones de variaciones de Tencon por diferentes métodos, dependiendo de la complejidad buscada y la ubicación relativa de las mutaciones en la molécula. Los métodos de síntesis de ADN son preferibles para crear mutaciones dispersadas alrededor del gen de Tencon. También se puede utilizar la clonación de la enzima de restricción para recombinar fragmentos de ADN que contengan mutaciones en diferentes regiones del gen. La mutación saturada en una pequeña región definida, como por ejemplo un bucle de Tencon sencillo, puede ser introducida utilizando un oligonucleótido degenerado y la mutagénesis dirigida por un oligonucleótido (Kunkel et al. 1987).

Se construyó una colección de Tencon, colección FG7, diseñada para reemplazar el bucle FG con 7 amino ácidos aleatorios utilizando mutagénesis dirigida de oligonucleótidos. Se sintetizó un oligonucleótido (TconFG-For-5'pho) para tener una secuencia degenerada de NSS de 21 pares base (bp) en las posiciones codificadoras del bucle FG y secuencias nucleótidas a dos tiempos de entre 20-27 bp de complementariedad con la secuencia codificadora de Tencon. En este diseño, los veinte amino ácidos son capaces de ser representados en el bucle FG. La diversidad calculada a nivel nucleótido es de $1,3 \times 10^9$.

TconFG7-For5'pho: (SEQ ID NO: 18)

GAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTNNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSCCGCTGTCTGCGGAATTCAC

El modelo de mutagénesis dirigida de oligonucleótidos, pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-pIII, se construyó reemplazando la secuencia codificadora del bucle F:G Tencon con una secuencia matriz en bucle que contenía una zona de restricción AscI. Este sistema permite la eliminación del modelo de ADN de fondo tras la mutagénesis mediante digestión del ADN resultante con AscI antes de la transformación. Para purificar un modelo de cadena simple de ADN mediante mutagénesis, una colonia sencilla de E. coli CJ236 que alberga pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-pIII, fue introducida en 5 ml de medio de cultivo 2YT con cabernicilina (50 µg/ml de concentración final) y Chloramphenicol (10 µg/ml). Después de 6 horas, se añadió el fago ayudante VCSM13 a la concentración final de 10^{10} pfu/ml y se incubó sin agitación durante 10 minutos antes de ser transferido a 150 ml de 2YT con carbenicilina (10 µg/ml) y uridina (0,25 µg/ml) e incubado a 37°C con agitación a 200 rpm durante la noche. Se sedimentaron las células por centrifugado y se recogió el flotante y el fago flotante con PEG NaCl. Se purificó el ADN de cadena simple del flotante utilizando un kit QIAprep Spin M13 (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones del fabricante.

Para hibridar el oligonucleótido degenerado con el modelo, se combinaron 5 µg de ADN modelo con oligo TconFG7-For-5-pho a una relación molar de 10:1 en Tris-HCl (50 mM, pH 7.5) y MgCl₂ (10 mM) e incubado a 90°C durante 20 minutos, a 60°C por 3 minutos y 20°C por 5 minutos. Después de la reacción de hibridación, ATP (10 mM), dNTPs (25 mM cada), DTT (100 mM), T4 ligasa (7 unidades) y polimerasa T7 ADN (10 unidades) fueron añadidos a la mezcla de la reacción e incubado a 14°C durante 6 horas seguido de 12 horas a 20°C. Se purificó en ADN resultante utilizando el kit de purificación PCR. La colección final de ADN se recubrió en 50 µl de agua. El producto resultante de ADN de cadena doble fue a continuación transformado en E. coli MC1061F por electroporación.

Los transformantes se recogieron en 20 ml de medio SOC y se permitió su recuperación tras una hora a 37°C. Tras la recuperación, una parte alícuota de la transformación se diluyó en serie y se colocó en placas Carbenicillin (100 µg/ml) que contenían un 1% de glucosa para asegurar el número total de transformaciones. El cultivo SOC remanente se utilizó después para inocular un litro de medio 2xYT con Carbonicillin y un 1% de glucosa y cultivado hasta que el OD₆₀₀ alcance el 0,6. Se inocularon 100 ml de este cultivo con fago ayudante M13 a 10¹⁰/ml e incubado a 37°C antes del centrifugado. Las células sedimentadas resultantes fueron re-suspendidas en 500 ml de medio fresco 2xYT que contenía Carbenicillin (100 µg/ml) y Kanamycin (35 µg/ml) y cultivados a 30°C durante la noche antes del centrifugado. Las fago partículas precipitaron por adición de PEG/NaCl y almacenadas a -80°C.

Una segunda colección, BC6/FG7, se diseñó para introducir diversidad en los bucles B:C y F:G de Tencon simultáneamente. Con el fin de lograr eso, se sintetizaron dos oligonucleótidos, Tc-BC6-For-5'phos y POP149. Se fosforiló el oligo principal y las 18 bases de codón NNS que contenía en cada posición codificando el bucle B:C, mientras que el oligo contrario era biotinilado al final del 5' y las 21 bases de codón NNS que contenía en cada posición codificando el bucle F:G. ambos oligonucleótidos son acompañados por dos secuencias de nucleótidos 18 bp idénticas a la región precedente y siguiente a la región a ser mutagenizada (ver más abajo para detalle de cebador).

Tc-BC6-For-5'phos: (SEQ ID NO: 19)

GactctctcgctctgctggNNSNNSNNSNNSNNSNNSSTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTACC

POP 2149: (SEQ ID NO: 20)

GTGAATCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATAGAAACGGTG

Para construir la colección, dieciséis reacciones 100 µL PCR fueron realizadas utilizando t oligos Tc-BC6-For5'phos y POP2149 para amplificar el modelo de ADN Tencon, introduciendo codones NNS en los bucles B:C y F:G simultáneamente en el proceso. El producto PCR de cadena doble se mezcló con perlas de estreptavidina magnética (Dyna) en una solución salina B&W (10 Mm Tris-HCl, pH 7.5, 1 Mm EDTA, 2M NaCl, 0,1% Tween-20) e incubado por 20 minutos, rebajado con un imán y lavado dos veces con solución amortiguadora B&W. La cadena principal se eluyó de las perlas con 300 µl de 150 mM NaOH. Este "mega-cebador", una mezcla de cebadores largos con más de 8x10¹⁶ de diversidad teórica, se utilizó para hibridar un modelo de colección de cadena simple. Se llevó a cabo la construcción de la colección tal y como se ha descrito arriba para la colección FG7.

Ejemplo 3 – Selección de enlaces IgG

Con el fin de seleccionar miembros de la colección Tencon que se enlacen con el IgG, el recombinante IgG (subtipo IgG1 humano) fue biotinilado utilizando sulfato-NHS-LC-Biotin (Pierce) antes de ser dializado en PBS: Para las selecciones, se bloquearon 200 µL de colecciones representativas de fagos FG7 oBC6/FG7 con 200 µL de bloqueador químico antes de la adición de IgG biotinilado en concentraciones de 500 nM (ronda 1) o 100 nM (rondas 2 y 3). Se recuperaron los fagos en lazos mediante perlas magnéticas Neutrovidin (Seradyne) en la ronda 1^o con perlas magnéticas de estreptavidina (Promega) en las rondas 2 y 3. Los fagos no enlazados se lavaron de las perlas utilizando 5-10 ciclos de 1 mL de salino amortiguado tris con tween (TBST) seguido de otros dos lavados con 1 mL con salino amortiguado Tris (TBS). Se eluyeron de las perlas los fagos enlazados mediante la adición de E. coli MC1061F de fase mid-log. Se colocaron en placas agar LB las células infectadas suplementadas con carbenicilina y glucosa. Al día siguiente, se rascaron las células de la placa y se cultivaron en fase mid-log antes de ser rescatadas con fago ayudante VCSM13 y cultivadas durante la noche. Las fago partículas se aislaron con un precipitado PEG/NaCl y se emplearon para las selecciones de las siguientes rondas.

Después de tres rondas de cribado contra el IgG, se sub-clonó el producto en un vector modificado pET27 para incluir una zona de clonación de ligasa independiente mediante amplificación del gen de Tencon por PCR. Este producto PCR se hibridó al vector y se transformó en células BL21-GOLD(DE3) (Stratagene). Se pusieron colonias individuales en cultivos de 1 mL en placas de pocillos profundos (Corning) y se cultivaron hasta la saturación durante la noche a 37°C. Al día siguiente, se utilizaron 50 µL del cultivo de la noche anterior para inocular un cultivo fresco de 1 mL. Se cultivaron a 37°C durante 2 horas antes de añadir IPTG a 1 mM y se les redujo la temperatura a 30°C. Las células fueron recolectadas por centrifugado 16 horas después de la inducción y lisadas con 100 µL de BugBuster (Novagen). Los lisados resultantes fueron clarificados y empleados para testar por enlace con IgG

mediante ELISA.

Se recubrieron placas Maxisorp (Nunc) y bloquearon con Starting Block T20 (Thermo Scientific). Los lisados clarificados diluidos en 1:4 Starting Block fueron añadidos a las placas y se les permitió enlazarse durante una hora antes de ser lavados con TBST. El IgG biotinilado o el HSA biotinilado se añadió a la concentración de 1 µg/ml y se lavó TBST después de una hora de incubación. Se realizó la detección de IgG o HSA enlazado por adición de estreptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch) y se detectó con sustrato quimio-luminiscente POD. Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 7. Se secuenciaron los conductos que enlazan IgG biotinilado con más de diez pliegues sobre HSA biotinilado tal y como juzga la señal de ELISA. Tras llevar a cabo muchos experimentos de selección, sólo se obtuvieron 60 secuencias de enlace únicas de la colección FG7 y 10 secuencias únicas de la colección BC6FG7; la Tabla 4 muestra las numerosas mutaciones en otras regiones de la estructura.

La proteína de Tencon diseñada, expresada y purificada aquí tiene estabilidad térmica mejorada por 26°C con respecto al tercer dominio FN3 de Tenascin humano, el cual fue utilizado como estructura de la molécula alternativo. Basándonos en este incremento de la estabilidad, esta estructura de la molécula es probable que sea más sensible a la sustitución de amino ácidos y más fácil de fabricar. Las mutaciones que reducen la estabilidad de la proteína son más probables que sean mejor toleradas en el contexto de una estructura más estable y así una estructura con estabilidad aumentada es probable que se vuelva más funcional, aglutinantes bien plegados de la colección de variantes de la estructura. Esta nueva proteína no es una proteína codificada por el genoma humano, también debe proporcionar menor riesgo frente a la generación de una respuesta inmune que el riesgo en contra, por ejemplo, Tenascin de origen humano cuando se usa como terapéutico (esencialmente, menor riesgo que con un terapéutico basado en un dominio de tipo salvaje).

Para estos objetivos de la invención, se determina el 70-100% de la identidad de secuencias de amino ácidos o nucleótidos (p. ej., 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o cualquier rango o valor de los mismos) utilizando un algoritmo informático adecuado, como se conoce en el arte.

Tabla 1

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1  (1) ---SPPKDLAVTEVTEETVNLANDN-EMRVTEYLVVYTPTH--EGGLEMQFRVPGDQSTSI IQBLEPGVEYFIRVFAILENKKSI PVSARVAT-----
2  (1) TYLPAPRGLKFKSIKETSVEVEWDPDIAFETWEI IFRNMN-KEDEGEITKSLRRPRTSYRQTGLAPGQBYBISLHIVKNNTRGPGPKRVTTTRLD----
3  (1) ---DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKD--VFGDRRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTTEYEVSLI SRRGDMSSNPAKETFTT-----
4  (1) TGLDAPRNLRRVQSQTDNSITLEWRNGKAAIDSYRIKYAPI SGGDHAEVDPKSCQATTKTTLTGLRPGTEYGI GVS AVKEDKBSNPATINAATELDTPKD
5  (1) ---DEPKDLQVSETAETSLLTLNKTPLAKFDYRRLNYSLPT----GQWVGVLPRNTTSYVLRGLRPGQBYNVLLTAEKGRHKSKPAKSKPARVK-----
6  (1) -QAPELENLTVTEVGDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEAN--KVEAARNLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSVIYGVIGYRTFVLSAEASTGE-----
7  (1) -ETPNLGEVVAEAVGWDALKLNWTAPEGAYEYFPIQVQEAD--TVEAAQNLTVPGLRSTDLPLKAAATHYITIRGVTQDFSTTPLSVEVLTE-----
8  (1) -EVPDMGNLTVTEVSWDALRLNWTTPDGTQDFTI QVQEAD--QVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVGRHSTRPLAVEVYTE-----
9  (1) -DLPQLGDLAVSEVGDGLRLNWTAAADNAYEHFVIQVQEVN--KVEAAQNLTLPGLRRAVDIPGLEAATPYRVSVIYGVINGYRTFVLSAEASTAKEPE--
10 (1) -KEPEIGNLVSDITPESFNLSWMTDGI FETFTIEIIDSN--RLLETVEYNI SGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTKTISATATTE-----
11 (1) -ALPLENLTI SDINPEYFTVSWMAENAFDSFLVTVWDSG--KLLDPQEFTL SGTQRKLELRGLITGIGYEVVMVSGFTQGHQTKPLRAEIVTE-----
12 (1) -AEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVDFNFKIRDTK--KQSEPLBITLLAPERTDRLTGLREATBYBIBLYGISKGRRSQTVSAIATTAM-----
13 (1) ---GSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPI TG---GTPSMVTVDGTKTQRRLVKLI PGVEYLVSI IAMKGFEESEPVSGSPTTAL-----
14 (1) ---DGPGLVTANITDSEALARWQPAIATVDSYVSIYTG EK---VPEIIRTVSGNTVEYALTDLEPATEYTLRI PAEKGPQKSESTITAKFTTDL-----
15 (1) ---DSPRDLTATEVQSETALLTWRPPRASVTGYLLVYESVD---GTVKEVIVGPDPTTSYSLADLSPSTHYTAKIQALNGPLRSNMIQTIFTITIGL----
    
```

Tabla 2

Secuencia		Descripción	1ª Suma puntuación	2ª Suma puntuación	Suma Puntuación (cadena)	Suma Puntuación (molécula)
Tenascina		Alt. Scaff.	6.01	5.85	11.86	11.86
Tencon		Alt. Scaff.	5.83	7.37	13.20	13.20
adalimumab	Vh	mAb Humanizado	9.45	8.06	17.50	45.42
	VI		15.29	12.63	27.92	
cetuximab	Vh	mAb Quimérico	17.63	16.89	34.52	64.44
	VI		14.45	15.47	29.92	
Rituximab	Vh	mAb Quimérico	16.57	14.38	30.96	61.65
	VI		16.63	14.06	30.69	
basiliximab	Vh	mAb Quimérico	16.48	13.40	29.89	58.98
	VI		16.05	13.05	29.09	

5

Secuencias

10

SEC ID No. 1:

15

sppkdlvvtevtetvnlawdnemrvteylvvytpthegglemqfrvpgdqstiiqelepgevfyfirvfa
ilenkksipvsarvat

SEC ID No. 2:

20

tylpapeglkfkksiketsvevewdpldiafetweiifrnmnkedegeitkslrrpetsyrtglapggqeye
isihivknntrgpglkrvttrld

25

SEC ID No. 3:

dapsqievkdvtddtalitwfkplaeidgieltygikdvpgdrttidltedenqysignlkpdtteyevsli
srrgdmssnpaketftt

30

SEC ID No. 4

35

tgl dapnrlrrvsqtdnsitlewrngkaaidryikyapisggdhaevdvpksqqattkttltglrpgtey
gigvsavkedkesnpatinaateldtpkd

SEC ID No. 5

40

dtpkdlqvsetaetsltllwktplakfdryrlnyslptggwgvqlprnttsyvlrglepgqeynvlitae
kgrhkspakskparvk

45

SEC ID No. 6

qapelenltvtevgwdglrlnwtaadqayehfiiqvqeankvearnltvpgslravdipglkaatpytve
iygviggyrtpvlisaeastge

50

SEC ID No. 7

55

etpnlgevvaevgwdalklnwtapegayeyffiqvqeadtveaaqnltpvgglrstldlpglkaathytit
irgvtqdfsttplsvevlte

60

65

5

SEC ID No. 8

10

evpdmgnltvtevsdairlnwttpdgtydqftiqvqeadqveeahnltpgslrsmcipglragtpyvt
lhgevrgbstrplavevvt

SEC ID No. 9

15

dipqigdlavsevgwdgrlrnwtaadnayehfviqvqevnkveaaqnltpgslravdipgleaatpyrva
lygvirgyrtpvlisaaastakepe

SEC ID No. 10

20

kepeignlnvscitpesfnlswmatdgifetftieidsnrllletveynisgaertahisglppstdfivy
loglapsirtktisatatte

SEC ID No. 11

25

alpllenltisidinpygftvswmasenafdsflvtvvdsgkllqpqeftlsgtqrklelrglitgigyevm
vsgftqghqtkplraeivte

SEC ID No. 12

30

aepvndnlvscatpdgfrlswtadegvfdnfvkirdtkkqsepleitllapertrdltglreateyeie
lygiskgrreqtvsaiattam

35

SEC ID No. 13

gspkevfisditensatvswraptaqvesfrityvpitggtpsmvtvdgktqtrlvklipgvaylvsiia
mkgfeesepvsgsfttal

40

SEC ID No. 14

dpsglvtanitdsealarwqpaiatvdsyvisytgekveitrtvsgntveyaltdlepateytlrifae
kqpqkastitakfttdl

45

SEC ID No. 15

dsprdlitatevqsetalltwrpprasvtgyllvyesvdgtvkevivgpdttssyladlspthytakigal
ngplrxnmigtifttigi

50

SEC ID No. 16

LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQESEKVGAINLTPGSEERSYDLTGLKPGTEYTVSI
YGVKGGHRSNPLSAEFTT

55

SEC ID No. 17

60

ctgccggcgccgaaaaacctggttctgaagttaccgaagactctctgcgtctgtcttgaccgcgcc
ggacgcggcgttcgactctttcctgatccagtagaccaggaatctgaaaaagttggtagacgatcaacctga
ccggttcgggttctgaacgttcttacgacctgaccggtctgaaaccgggtaccgaatacacccgtttctatc
tacgggtgtaaagggtgacccgttctaacccgctgctgcggaattcaccacc

65

5

Secuencia Tencon mostrando lazos (SEC ID NO:16)

10

A-B lazo B-C lazo C-D lazo
 I-LPAPK~~N~~LVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFD~~S~~FLIQYQESEKVG~~E~~A

15

D-E lazo E-F lazo F-G lazo
 INLTVP~~G~~SERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT-89

Tabla 3 - Lazos de Tencon

Lazo	Residuos de SEC ID No:16	Secuencia de aminoácidos
A-B	13-16	TEDS
B-C	22-28	TAPDAAF
C-D	38-43	SEKVGE
D-E	51-54	GSER
E-F	60-64	GLKPG
F-G	75-81	KGGHRSN

20

25

30

Tabla 4 - Andamios de unión a IgG

Clon No.	B:C Residuos de lazo 22-28 (SEQ ID NO)	F:G Residuos de lazo 75-81 (SEQ ID NO)	Mutaciones Scaffold
1	SYGFNN (21)	QIGPIIP (46)	
2	TYEGES (22)	QIGPIIP (46)	
3	TYESES (23)	QIGPIIP (46)	
4	TNWMDS (24)	SIRTIDS (47)	
5	KSVFIM (25)	PKFHSPL (48)	
6	YSSYAT (26)	WKTTIWF (49)	
7	RFHPFP (27)	RKNWKTR (50)	
8	MMCMPL (28)	RLFRIYQ (51)	
9	YCRVRD (29)	WLSRSYD (52)	
10	SYGFNN (21)	WLSRSYD (52)	
11	MDCFMG (30)	WLSRSCD (53)	
12	TYRFNS (31)	WMGPYCD (54)	
13	ASRRSL (32)	RRRRYSF (55)	
14	TIESES (33)	HIVPMVP (56)	

35

40

45

50

55

60

65

ES 2 595 504 T3

5

(continua)

10

15

20

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Clone No.	B:CResiduos de lazo22-28 (SEQ ID NO)	F:GResiduos de lazo75-81 (SEQ ID NO)	Mutaciones Scaffold
15	TL*MQS (34)	QIEPIIR (57)	
16	IYDSES (35)	PSAANNP (58)	
17		VRLRYVQ (59)	
18		QVGPLIP (60)	
19		RIGPILP (61)	
20		QIGPLLP (62)	
21		RIGPLLP (63)	
22		QVGPLLP (64)	
23		RIGPMLP (65)	
24		QIGPVLP (66)	
25		RIGPVLP (67)	
26		QIGPMMP (68)	
27		QVGPLVP (69)	
28		QIGPMLP (70)	R18P
29		QVGPILP (71)	
30		QVGPLLP (64)	
31		QVGPMMLP (72)	
32		QIGPIVP (73)	I33V
33		MIGPLLP (74)	
34		QIGPLFP (75)	
35		QIGPVLP (66)	T59A
36		QIGPMVP (76)	
37		QIGPIVP (77)	
38		RIEPILP (78)	V74G
39		VAGSVWP (79)	
40		REGATLY (80)	
41		KQIPPIL (81)	S38G
42		LSLSSVL (82)	
43		HMLLPLP (83)	V74A
44		MIGPLIP (84)	
45		TIGPHIP (85)	
46		EIGPCLP (86)	
47		EIGPVLP (87)	
48		KIGPCLP (88)	Y35H
49		MIGPVLP (89)	
50		QIGPILP (90)	S52P
51		QIGPILP (90)	Q36R

ES 2 595 504 T3

5

(continua)

Clon No.	B: CResiduos de lazo22-28 (SEQ ID NO)	F: GResiduos de lazo75-81 (SEQ ID NO)	Mutaciones Scaffold
52		QIGPILP (90)	
53		EVGPILP (91)	
54		QVGPLL (92)	A23T
55		QIGPVMP (93)	
56		QIGPCVP (94)	
57		QIGPLVP (95)	
58		RGLVMPM (96)	V74A
59		MIGPILP (97)	
60		QIGPILP (90)	E37G
61		QIGPILP (90)	T68A
62		QIGPILP (90)	T22I
63		QIGPILP (90)	S52F
64		QIGPILP (90)	Y56H
65		QIGPILP (90)	A44V
66		QIGPILP (90)	P24S
67		RIGPILP (61)	
68		CIGPMVP (98)	
69		FIGPVLP (99)	
70		HIGPILP (100)	
71		HIGPIMP (101)	
72		HIGPYLP (102)	
73		HVGPILP (103)	
74		IIGPLL (104)	
75		LIGPLL (105)	
76		MVGPLL (106)	
77		NIGPYLP (107)	
78		NIGPYLP (108)	
79		QIGPHLP (109)	
80		QIGPIIP (46)	
82		QIGPILG (110)	
83		QIGPILS (111)	
83		QIGPILT (112)	
84		QIGPIMP (113)	
85		QIGPIPI (114)	
86		QIGPLLN (115)	
87		QIGPLL (62)	
88		QIGPVFP (116)	

65

5

(continua)

Clone No.	B:CResiduos de lazo22-28 (SEQ ID NO)	F:GResiduos de lazo75-81 (SEQ ID NO)	Mutaciones Scaffold
89		QIGPVLS (117)	
90		QIGPWLP (118)	
92		QVGPILP (71)	
93		QVGPILR (118)	
94		QVGPIMN (119)	
95		QVGPIMP (120)	
96		QVGPIVP (121)	
97		QVGPLLS (122)	
98		QVGPVLP (123)	
99		QVGPVLT (124)	
100		RIGPIMP (125)	
101		RIGPIVP (126)	
102		RIGPMFP (127)	
103		RIGPMIP (128)	
104		RIGPMVP (129)	
105		RIGPVIP (130)	
106		RVGPILP (131)	
107		RVGPLLP (132)	
108		TVGPHIP (133)	
109	DRKRFI (36)	PSWRSNW (134)	
110	EFWRGS (37)	QIGPLLP (62)	
111	GLLDPL (38)	ALRATLE (135)	
112	GLVLPE (39)	KYGYLTP (136)	
113	MASDGL (40)	RIGPMLP (137)	
114	NKTETN (41)	NPFCSRF (138)	
115	QAERKV (42)	QIGPLLP (62)	
116	QAERKV (42)	RIGPLLP (63)	
117	SQVCTL (43)	YYLHQWC (139)	
118	YFDKDS (44)	QIGPLLP (62)	
119	YFECEP (45)	H IVPLLR (140)	

55

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JACOBS, STEVEN O'NEIL, KARYN

60

<120> MÉTODOS Y USOS DE DOMINIO DE FIBRONECTINA TIPO III BASADO EN ESTRUCTURAS DE COMPOSICIONES

<130> CEN5240PCT

<140> PCT/US2009/062200

<141> 2009-10-26

65

<150> 61/110120

ES 2 595 504 T3

<151> 2008-10-31
 <160> 141
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 5 <211> 87
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 1

```

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

<210> 2
 <211> 95
 <212> PRT
 25 <213> Homo sapiens
 <400> 2

```

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

<210> 3
 <211> 88
 <212> PRT
 45 <213> Homo sapiens
 <400> 3

```

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

<210> 4
 <211> 100
 <212> PRT
 65 <213> Homo sapiens
 <400> 4

ES 2 595 504 T3

5

```

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

```

<210> 5
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 5

30

```

Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu
 1          5          10          15
Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu

```

35

```

          20          25          30
Asn Tyr Ser Leu Pro Thr Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg
          35          40          45
Asn Thr Thr Ser Tyr Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr
          50          55          60
Asn Val Leu Leu Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala
40          65          70          75          80
Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
          85

```

45

<210> 6
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 6

50

```

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

```

60

65

<210> 7
 <211> 91
 <212> PRT

ES 2 595 504 T3

<213> Homo sapiens
<400> 7

5

10
15
20

```

Glu Thr Pro Asn Leu Gly Glu Val Val Val Ala Glu Val Gly Trp Asp
 1          5          10          15
Ala Leu Lys Leu Asn Trp Thr Ala Pro Glu Gly Ala Tyr Glu Tyr Phe
          20          25          30

Phe Ile Gln Val Gln Glu Ala Asp Thr Val Glu Ala Ala Gln Asn Leu
          35          40          45
Thr Val Pro Gly Gly Leu Arg Ser Thr Asp Leu Pro Gly Leu Lys Ala
          50          55          60
Ala Thr His Tyr Thr Ile Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser
65          70          75          80
Thr Thr Pro Leu Ser Val Glu Val Leu Thr Glu

```

<210> 8

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

25
30
35

```

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

```

<210> 9

<211> 95

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 9

40
45
50

```

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

```

<210> 10

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 10

55
60
65

```

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

```

ES 2 595 504 T3

<210> 11
 <211> 91
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

5

<400> 11

10

```

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

15

20

<210> 12
 <211> 92
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

25

<400> 12

30

```

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

35

40

<210> 13
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

45

<400> 13

50

```

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

55

60

```

Val Ser Gly Ser Phe Thr Thr Ala Leu
          85
  
```

<210> 14

65

ES 2 595 504 T3

5

10

<211> 88
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 14

15

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

30

<210> 15
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 15

35

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

50

<210> 16
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Binding polypeptide

60

<400> 16

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15

65

ES 2 595 504 T3

5

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

<210> 17
 <211> 267
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Nucleotide encoding binding polynucleotide
 <400> 17

ctgccggcgc cgaaaaacct ggttgtttct gaagttaccg aagactctct gogtctgtct 60
 tggaccgcgc cggacgcggc gttcgactct ttctgatcc agtaccagga atctgaaaaa 120
 gttggtgaag cgatcaacct gaccgttccg ggttctgaac gttcttacga cctgaccggg 180
 30 ctgaaaccgg gtaccgaata caccgttct atctacggtg ttaaaggtgg tcaccgttct 240
 aaccgctgt ctgcggaatt caccacc 267

<210> 18
 <211> 68
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> unknown
 <222> (28) (29) (31) (32) (34) (35) (37) (38) (40) (41) (43) (44) (46) (47)
 <223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g
 <400> 18

gaatacaccg tttctatcta cgggtgttnns nnsnnsnnsn nsnnnsnscg gctgtctgcg 60
 45 gaattcac 68

<210> 19
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> unknown
 <222> (22) (23) (25) (26) (28) (29) (30) (31) (32) (34) (35) (37) (38)
 <223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g
 <400> 19

gactctctgc gtctgtcttg gnnsnnsnns nnsnnsnnsn tcgactcttt cctgatccag 60
 tacc 64

<210> 20
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <221> unknown
 <222> (22) (23) (25) (26) (28) (29) (30) (31) (32) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40)

ES 2 595 504 T3

<223> Primer wherein n can be represented by a, c, t or g and s can be represented by g or c.
 <400> 20

5 gtgaattccg cagacagcgg s nnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta gatagaaacg 60
 gtg 63

<210> 21

<211> 6

10 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 21

15

Ser Tyr Gly Phe Asn Asn
 1 5

<210> 22

<211> 6

20 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 22

25

Thr Tyr Glu Gly Glu Ser
 1 5

<210> 23

<211> 6

30 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 23

35

Thr Tyr Glu Ser Glu Ser
 1 5

<210> 24

<211> 6

40 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

45 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 24

50

Thr Asn Trp Met Asp Ser
 1 5

<210> 25

<211> 6

55 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 25

60

Lys Ser Val Phe Ile Met
 1 5

<210> 26

<211> 6

65 <212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

ES 2 595 504 T3

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 26
Tyr Ser Ser Tyr Ala Thr
1 5
5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 27
Arg Phe His Pro Phe Pro
1 5
15

<210> 28
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 28
Met Met Cys Met Pro Leu
1 5
20

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 29
Tyr Cys Arg Val Arg Asp
1 5
25

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 30
Met Asp Cys Phe Met Gly
1 5
30

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 31
Thr Tyr Arg Phe Asn Ser
1 5
35

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

ES 2 595 504 T3

<400> 32

Ala Ser Arg Arg Ser Leu
1 5

5 <210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

10 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 33

Thr Ile Glu Ser Glu Ser
1 5

15 <210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

20 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 34

Thr Leu Met Gln Ser
1 5

25 <210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

30 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 35

Ile Tyr Asp Ser Glu Ser
1 5

35 <210> 36
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

40 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 36

Asp Arg Lys Arg Phe Ile
1 5

45 <210> 37
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

50 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 37

Glu Phe Trp Arg Gly Ser
1 5

55 <210> 38
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>

60 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 38

Gly Leu Leu Asp Pro Leu
1 5

65 <210> 39
<211> 6
<212> PRT

ES 2 595 504 T3

```

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 39
5          Gly Leu Val Leu Pro Glu
          1                    5

<210> 40
<211> 6
10 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 40
15          Met Ala Ser Asp Gly Leu
          1                    5

<210> 41
<211> 6
<212> PRT
20 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 41
25          Asn Lys Thr Glu Thr Asn
          1                    5

<210> 42
<211> 6
<212> PRT
30 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 42
35          Gln Ala Glu Arg Lys Val
          1                    5

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
40 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 43
45          Ser Gln Val Cys Thr Leu
          1                    5

<210> 44
<211> 6
<212> PRT
50 <213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 44
          Tyr Phe Asp Lys Asp Ser
          1                    5

<210> 45
<211> 6
55 <212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 45
60          Tyr Phe Glu Cys Glu Pro
          1                    5

<210> 46
<211> 7
<212> PRT
65 <213> Secuencia Artificial
<220>

```

ES 2 595 504 T3

```

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 46
                Gln Ile Gly Pro Ile Ile Pro
                1                 5

5  <210> 47
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
10 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 47
                Ser Ile Arg Thr Ile Asp Ser
                1                 5

15 <210> 48
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
20 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 48
                Pro Lys Phe His Ser Pro Leu
                1                 5

25 <210> 49
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
30 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 49
                Trp Lys Thr Thr Ile Trp Phe
                1                 5

35 <210> 50
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
40 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 50
                Arg Lys Asn Trp Lys Thr Arg
                1                 5

45 <210> 51
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
50 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 51
                Arg Leu Phe Arg Ile Tyr Gln
                1                 5

55 <210> 52
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
60 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 52
                Trp Leu Ser Arg Ser Tyr Asp
                1                 5

65 <210> 53
    <211> 7
    <212> PRT

```

ES 2 595 504 T3

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 53

5

Trp Leu Ser Arg Ser Cys Asp
1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 54

10

Trp Met Gly Pro Tyr Cys Asp
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 55

15

Arg Arg Arg Arg Tyr Ser Phe
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 56

20

His Ile Val Pro Met Val Pro
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 57

25

Gln Ile Glu Pro Ile Ile Arg
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 58

30

Pro Ser Ala Ala Asn Asn Pro
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 59

35

Val Arg Leu Arg Tyr Val Gln
1 5

40

45

50

55

60

65

ES 2 595 504 T3

<210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 5 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 60
 Gln Val Gly Pro Leu Ile Pro
 1 5

10 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 15 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 61
 Arg Ile Gly Pro Ile Leu Pro
 1 5

20 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 25 <220>
 <223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain
 <400> 62
 Gln Ile Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

30 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 63
 Arg Ile Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

40 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 45 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 64
 Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

50 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 55 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 65
 Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro
 1 5

60 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

ES 2 595 504 T3

<400> 66
Gln Ile Gly Pro Val Leu Pro
1 5

5 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 67

Arg Ile Gly Pro Val Leu Pro
1 5

15 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 68

Gln Ile Gly Pro Met Met Pro
1 5

25 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 69

Gln Val Gly Pro Leu Val Pro
1 5

35 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 70

Gln Ile Gly Pro Met Leu Pro
1 5

45 <210> 71
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 71

Gln Val Gly Pro Ile Leu Pro
1 5

55 <210> 72
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 72

Gln Val Gly Pro Met Leu Pro
1 5

65 <210> 73

ES 2 595 504 T3

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 73
 Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro
 1 5

10 <210> 74
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 74
 Met Ile Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

20 <210> 75
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 75
 Gln Ile Gly Pro Leu Phe Pro
 1 5

30 <210> 76
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 76
 Gln Ile Gly Pro Met Val Pro
 1 5

40 <210> 77
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
45 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 77
 Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro
 1 5

50 <210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 78
 Arg Ile Glu Pro Ile Leu Pro
 1 5

60 <210> 79
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
65 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 79
 Val Ala Gly Ser Val Trp Pro
 1 5

ES 2 595 504 T3

```

<210> 80
<211> 7
5 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
   <400> 80
10           Arg Glu Gly Ala Thr Leu Tyr
              1             5

<210> 81
<211> 7
15 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
   <400> 81
20           Lys Gln Ile Pro Pro Ile Leu
              1             5

<210> 82
<211> 7
25 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
   <400> 82
30           Leu Ser Leu Ser Ser Val Leu
              1             5

<210> 83
<211> 7
35 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain
   <400> 83
40           His Met Leu Leu Pro Leu Pro
              1             5

<210> 84
<211> 7
45 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
   <400> 84
50           Met Ile Gly Pro Leu Ile Pro
              1             5

<210> 85
<211> 7
55 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial
   <220>
   <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
   <400> 85
60           Thr Ile Gly Pro His Ile Pro
              1             5

<210> 86
<211> 7
65 <212> PRT
   <213> Secuencia Artificial

```


ES 2 595 504 T3

```

<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 86
                Glu Ile Gly Pro Cys Leu Pro
                1             5
5
<210> 87
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 87
                Glu Ile Gly Pro Val Leu Pro
                1             5
15
<210> 88
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
20
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 88
                Lys Ile Gly Pro Cys Leu Pro
                1             5
25
<210> 89
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
30
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 89
                Met Ile Gly Pro Val Leu Pro
                1             5
35
<210> 90
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
40
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 90
                Gln Ile Gly Pro Ile Leu Pro
                1             5
45
<210> 91
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
50
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 91
                Glu Val Gly Pro Ile Leu Pro
                1             5
55
<210> 92
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
60
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 92
                Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro
                1             5
65
<210> 93

```

ES 2 595 504 T3

```

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 93
          Gln Ile Gly Pro Val Met Pro
           1                   5

10 <210> 94
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
15 <210> 94
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
20          Gln Ile Gly Pro Cys Val Pro
           1                   5

    <210> 95
    <211> 7
25 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Protein Scaffold Based On A Fibronectin Type III (FN3) Domain
    <400> 95
30          Gln Ile Gly Pro Leu Val Pro
           1                   5

    <210> 96
    <211> 7
35 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 96
40          Arg Gly Leu Val Met Pro Met
           1                   5

    <210> 97
    <211> 7
45 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 97
50          Met Ile Gly Pro Ile Leu Pro
           1                   5

    <210> 98
    <211> 7
55 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
    <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 98
60          Cys Ile Gly Pro Met Val Pro
           1                   5

    <210> 99
    <211> 7
65 <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial

```

ES 2 595 504 T3

```

<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 99
                Phe Ile Gly Pro Val Leu Pro
                1                 5
5  <210> 100
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
10 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 100
                His Ile Gly Pro Ile Leu Pro
                1                 5
15 <210> 101
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
20 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 101
                His Ile Gly Pro Ile Met Pro
                1                 5
25 <210> 102
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
30 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 102
                His Ile Gly Pro Tyr Leu Pro
                1                 5
35 <210> 103
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
40 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 103
                His Val Gly Pro Ile Leu Pro
                1                 5
45 <210> 104
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
50 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 104
                Ile Ile Gly Pro Leu Leu Pro
                1                 5
55 <210> 105
    <211> 7
    <212> PRT
    <213> Secuencia Artificial
    <220>
60 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
    <400> 105
                Met Val Gly Pro Leu Leu Pro
                1                 5
    <210> 106
    <211> 7

```

ES 2 595 504 T3

<212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 5 <400> 106
 Met Val Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

<210> 107
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 15 <400> 107
 Asn Ile Gly Pro Tyr Leu Pro
 1 5

<210> 108
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 25 <400> 108
 Asn Ile Gly Pro Tyr Leu Pro
 1 5

<210> 109
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 35 <400> 109
 Gln Ile Gly Pro His Leu Pro
 1 5

<210> 110
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 45 <400> 110
 Gln Ile Gly Pro Ile Leu Gly
 1 5

<210> 111
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 55 <400> 111
 Gln Ile Gly Pro Ile Leu Ser
 1 5

<210> 112
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 65 <400> 112
 Gln Ile Gly Pro Ile Leu Thr
 1 5

ES 2 595 504 T3

<210> 113
 <211> 7
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 113
 Gln Ile Gly Pro Ile Met Pro
 10 1 5

 <210> 114
 <211> 7
 <212> PRT
 15 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 114
 Gln Ile Gly Pro Ile Pro Ile
 20 1 5

 <210> 115
 <211> 7
 <212> PRT
 25 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 115
 Gln Ile Gly Pro Leu Leu Asn
 30 1 5

 <210> 116
 <211> 7
 <212> PRT
 35 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 116
 Gln Ile Gly Pro Val Phe Pro
 40 1 5

 <210> 117
 <211> 7
 <212> PRT
 45 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 117
 Gln Ile Gly Pro Val Leu Ser
 50 1 5

 <210> 118
 <211> 7
 <212> PRT
 55 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 118
 Gln Ile Gly Pro Trp Leu Pro
 60 1 5

 <210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 65 <213> Secuencia Artificial
 <220>

ES 2 595 504 T3

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 119
 Gln Val Gly Pro Ile Met Asn
 1 5
 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 120
 Gln Val Gly Pro Ile Met Pro
 1 5
 <210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 121
 Gln Val Gly Pro Ile Val Pro
 1 5
 <210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 122
 Gln Val Gly Pro Leu Leu Ser
 1 5
 <210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 123
 Gln Val Gly Pro Val Leu Pro
 1 5
 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 124
 Gln Val Gly Pro Val Leu Pro
 1 5
 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 <220>
 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
 <400> 125
 Arg Ile Gly Pro Ile Met Pro
 1 5
 <210> 126
 <211> 7
 <212> PRT

ES 2 595 504 T3

```

<213> Secuencia Artificial
<220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 126
          Arg Ile Gly Pro Ile Val Pro
5         1             5
<210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
10 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 127
          Arg Ile Gly Pro Met Phe Pro
15         1             5
<210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
20 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 128
          Arg Ile Gly Pro Met Ile Pro
25         1             5
<210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
30 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 129
          Arg Ile Gly Pro Met Val Pro
35         1             5
<210> 130
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
40 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 130
          Arg Ile Gly Pro Val Ile Pro
45         1             5
<210> 131
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
50 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 131
          Arg Val Gly Pro Ile Leu Pro
55         1             5
<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
60 <220>
<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 132
          Arg Val Gly Pro Leu Leu Pro
65         1             5
<210> 133

```

ES 2 595 504 T3

```

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
5 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 133

<210> 134                Thr Val Gly Pro His Ile Pro
10                        1                    5

<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
15 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 134

                Pro Ser Trp Arg Ser Asn Trp
                1                    5

20 <210> 135
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
25 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 135

                Ala Leu Arg Ala Thr Leu Glu
                1                    5

30 <210> 136
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
35 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 136

                Lys Tyr Gly Tyr Leu Thr Pro
                1                    5

40 <210> 137
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
45 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 137

                Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro
                1                    5

50 <210> 138
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
55 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 138

                Asn Pro Phe Cys Ser Arg Phe
                1                    5

60 <210> 139
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia Artificial
<220>
65 <223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio
<400> 139

                Tyr Tyr Leu His Gln Trp Cys
                1                    5

```


ES 2 595 504 T3

<210> 140

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

5 <220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 140

10

His Ile Val Pro Leu Leu Arg
1 5

<210> 141

<211> 7

<212> PRT

15 <213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Proteina Scaffold basada en Fibronectina Humana Tipo III (FN3) Secuencia dominio

<400> 141

20

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

25

30

35

40

45

50

55

60

65

Reivindicaciones

- 5 1. Una estructura de proteína aislado que comprenda una secuencia de amino ácido que tenga al menos el 75% de identidad de SEQ ID NO: 16, el cual tiene 7 cepas y 6 bucles entre las cepas, y el cual comprende la secuencia de amino ácidos SEQ ID NO: 16, pero en el cual uno o más de los bucles son alterados para enlazarse con un objetivo mientras las cepas mantienen su secuencia como porciones troncales, en las cuales los bucles se encuentran en los residuos 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 y 75-81 de SEQ ID NO: 16 y son capaces de enlazarse con proteínas celulares y/o moléculas de ácido nucleico.
- 10 2. La estructura de proteína aislado de la reclamación 1, en el cual las regiones en bucle en o cerca de los residuos 22-28, 51-54 y 75-81 de SEQ ID NO: 16 sean alteradas para aglutinar especificidad y afinidad.
- 15 3. La estructura de proteína aislado de las reclamaciones 1 y 2, en el cual los armazones de proteína aislados se enlacen a una proteína objetivo con un K_D sea igual o menor a 10^{-7} M, como por ejemplo $0,1-9,9 \times 10^{-8}$, 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} o 10^{-15} M, como se determina por resonancia de plasmones en superficie del método Kinexa.
- 20 4. Un método de construcción de una colección de armazones de proteína de acuerdo con cualquiera de las reclamaciones 1-3 que comprendan las etapas de proporcionar un polipéptido teniendo una secuencia de amino ácido SEQ ID NO: 16, e introducción de diversidad en las copias del polipéptido teniendo las secuencias de amino ácido SEQ ID NO: 16 para formar la colección de armazones de proteína, en la cual la etapa de introducción de diversidad comprenda la mutación de al menos una región bucle seleccionada de un grupo que consista en los residuos de las posiciones 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64 y 75-81 de SEQ ID NO: 16.
- 25 5. Una colección producida por el método de la reclamación 4.
- 30 6. Un método de generación una estructura de proteína que se enlace a un objetivo específico con una afinidad de aglutinado predefinida, que comprenda contactar la colección de la reclamación 5 con el objetivo específico y aislé la estructura que se une al objetivo específico con la afinidad predefinida.
- 35 7. El método de la reclamación 6, en el cual la etapa de aislamiento comprenda el aislamiento de moléculas de la estructura que se enlazan a un objetivo específico y el testado de las moléculas de la estructura aisladas para aglutinar afinidad al objetivo específico, en el cual opcionalmente:
 - a. La etapa de aislamiento comprenda la criba de la colección con el objetivo específico, identificando las moléculas de la estructura enlazadas a objetivos específicos, y aislamiento de las moléculas de la estructura enlazada; o
 - 40 b. La afinidad sea menos o igual a 10^{-7} M.
- 45 8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifique la estructura de proteína de cualquiera de las reclamaciones 1-3.
- 50 9. La molécula de la de ácido nucleico aislada de la reclamación 8, que comprenda la secuencia nucleótida establecida en SEQ ID NO: 17.
- 55 10. Un vector de ácido nucleico aislado que comprenda la molécula de ácido nucleico de acuerdo a la reclamación 8.
- 60 11. Una célula huésped procariótico o eucariótico que comprenda una molécula aislada de ácido nucleico de acuerdo con la reclamación 8, en la cual la citada célula huésped opcionalmente es al menos una seleccionada entre E. coli BL21Star(DE3), otra célula E. coli, levadura, COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, células de mieloma o linfoma, o cualquier otra célula derivada, inmortalizada o transformada de las mismas.
- 65 12. Una composición que comprenda la estructura de proteína de cualquiera de las reclamaciones 1-3 y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, que además de manera opcional comprenda al menos un compuesto o polipéptido seleccionado con un marcador o indicador detectable, un antagonista TNF, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco del sistema cardiovascular (CV), un fármaco del sistema nervioso central (CNS), un fármaco del sistema nervioso autonómico (ANS), un fármaco del tracto respiratorio, un fármaco del tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco para el equilibrio de fluido o electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmuno-modulador, un fármaco oftalmológico, ótico o nasal, un fármaco tópico, un fármaco nutricional y un antagonista de la citoquina.

- 5 13. Un aparato médico, que comprenda la estructura de proteína de cualquiera de las reclamaciones 1-3, en el cual dicho aparato es adecuado para contactar o administrar la citada estructura de proteína por al menos un método seleccionado de entre parenteral, subcutáneo, intra-muscular, intra-venoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginoso, intra-cavitario, intra-celial, intra-cerebral, intra-cerebro ventricular, intra-cólico, intra-cervical, intra-gástrico, intra-hepático, intra-miocardial, intra-óseo, intra-pélvico, intra-pericárdico, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostático, intra-pulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retinal, intra-espinal, intrasinovial, intra-torácico, intra-uterino, intra-vesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal y transdérmico.
- 10 14. Un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano o diagnóstico, que comprenda el material de envoltorio y un contenedor que contenga una solución o forma liofilizada de una estructura de proteína de cualquiera de las reclamaciones 1-3, en el cual dicho contenedor opcionalmente sea un componente de un sistema o aparato de liberación parenteral, subcutáneo, intra-muscular, intra-venoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginoso, intra-cavitario, intra-celial, intra-cerebral, intra-cerebro ventricular, intra-cólico, intra-cervical, intra-gástrico, intra-hepático, intra-miocardial, intra-óseo, intra-pélvico, intra-pericárdico, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostático, intra-pulmonar, intra-rectal, intra-renal, intra-retinal, intra-espinal, intrasinovial, intra-torácico, intra-uterino, intra-vesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal o transdérmico.
- 15
- 20
- 25
- 30
- 35
- 40
- 45
- 50
- 55
- 60
- 65

FIG. 1

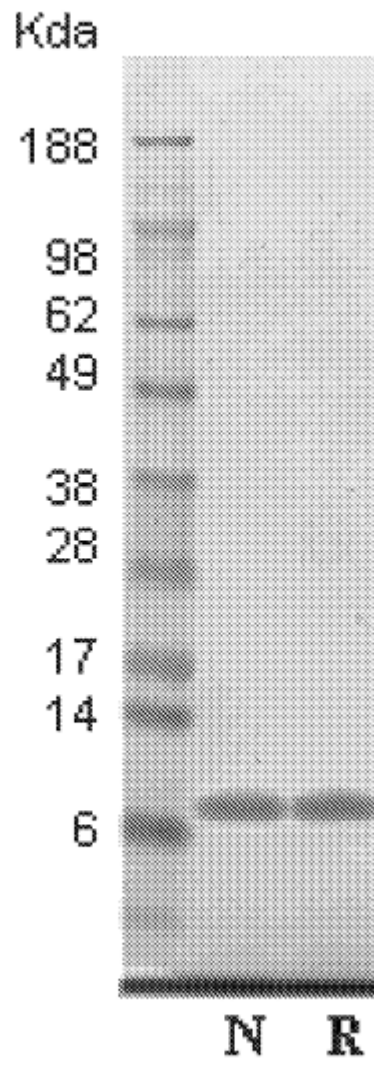


FIG. 2

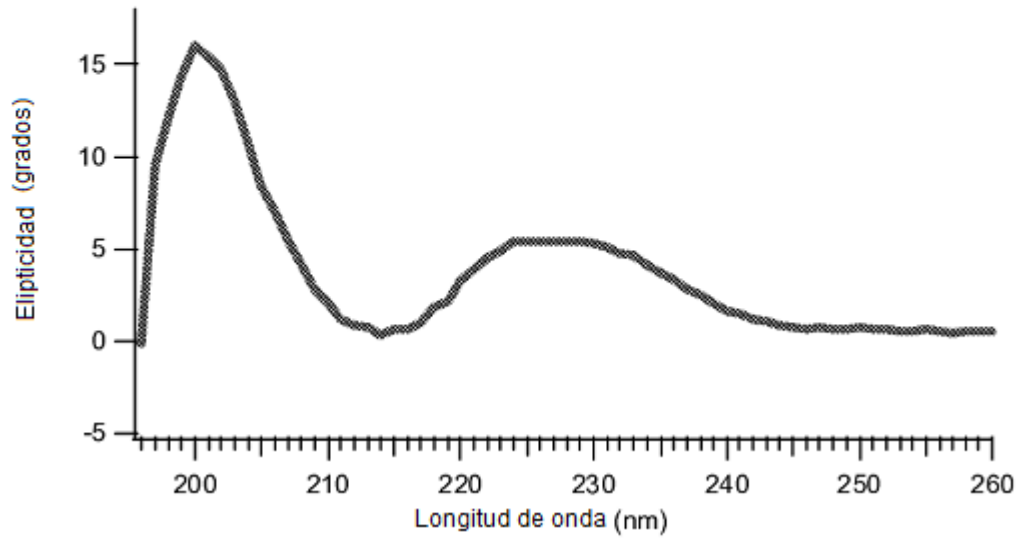


FIG. 3

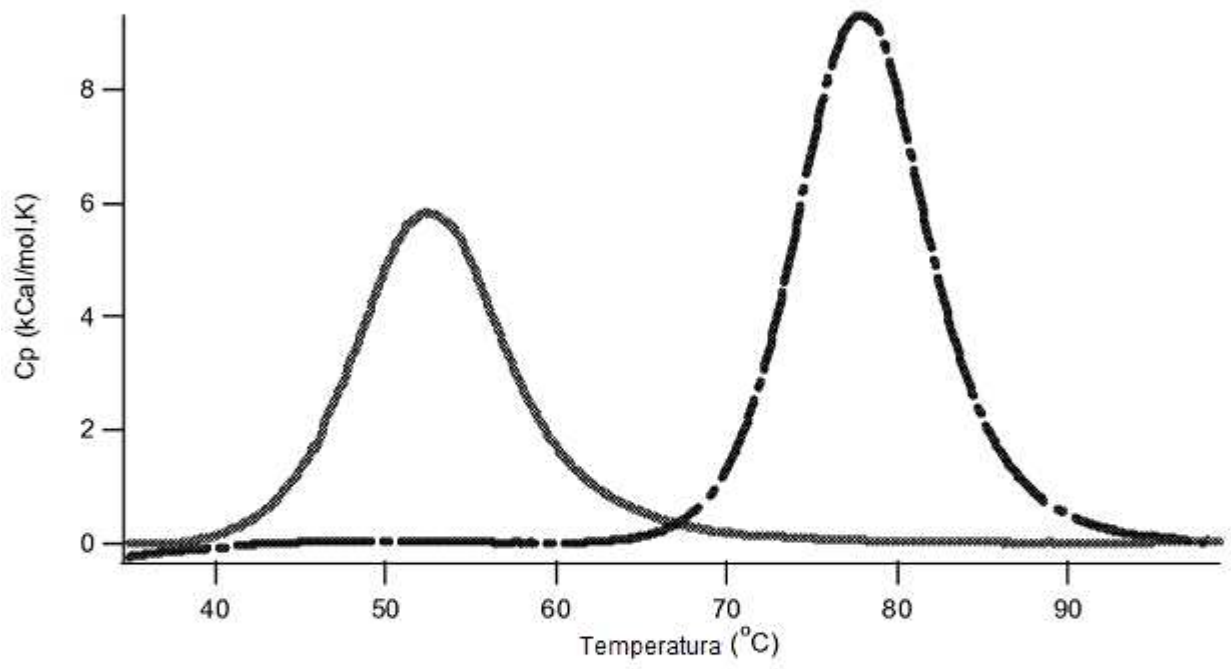


FIG. 4

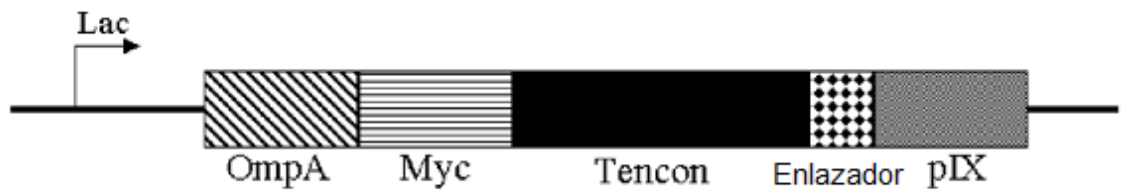


FIG. 5

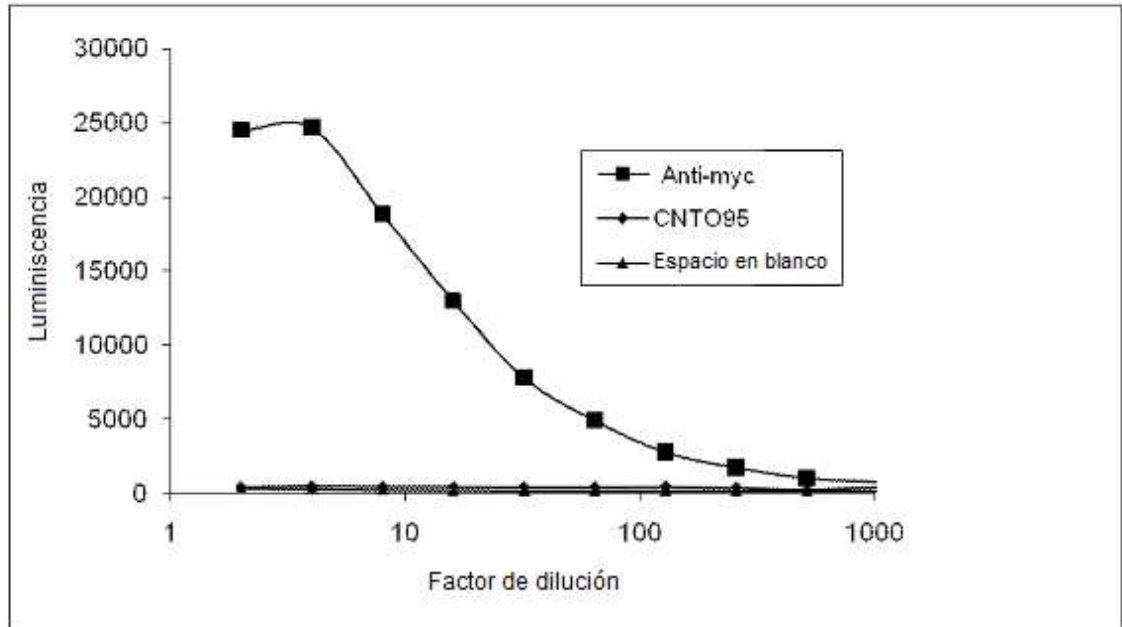


FIG. 6

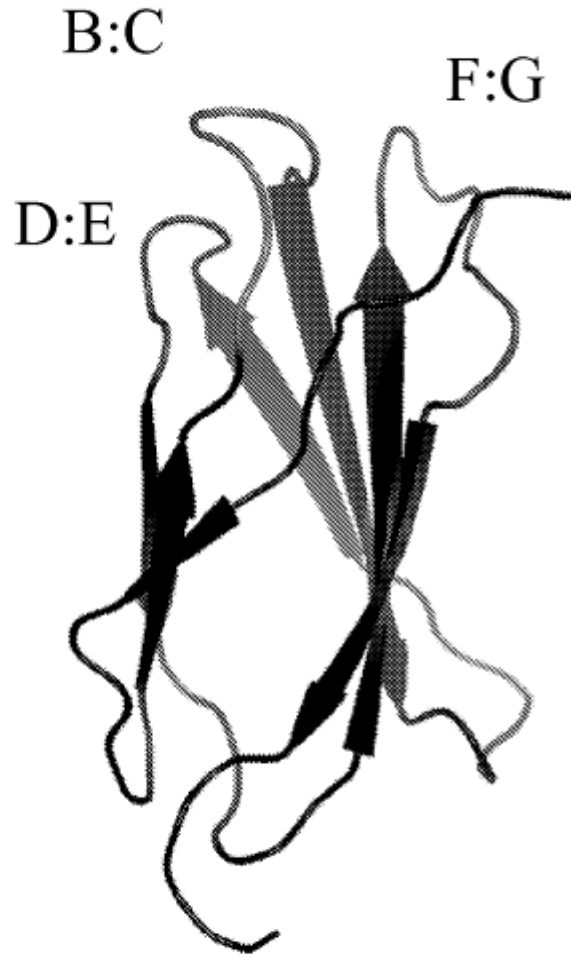


FIG. 7

