

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 599 318**

51 Int. Cl.:

A61K 39/395 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **20.04.2007 PCT/US2007/009712**

87 Fecha y número de publicación internacional: **01.11.2007 WO07124090**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **20.04.2007 E 07775901 (7)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.09.2016 EP 2018183**

54 Título: **Formulaciones de pepticuerpos terapéuticos liofilizados**

30 Prioridad:

21.04.2006 US 793997 P
19.04.2007 US 788697

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
01.02.2017

73 Titular/es:

AMGEN INC. (100.0%)
One Amgen Center Drive
Thousand Oaks, CA 91320-1799 , US

72 Inventor/es:

CALLAHAN, WILLIAM, J.;
REMMELE, RICHARD L., JR.;
RATNASWAMY, GAYATHRI;
LATYPOV, RAMIL F. y
LIU, DINGJIANG

74 Agente/Representante:

MILTENYI, Peter

Observaciones:

Véase nota informativa (Remarks, Remarques o Bemerkungen) en el folleto original publicado por la Oficina Europea de Patentes

ES 2 599 318 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

Formulaciones de pepticuerpos terapéuticos liofilizados

Campo de la invención

5 De manera general, la invención se refiere a formulaciones de pepticuerpos terapéuticos liofilizados y a métodos para producir una composición liofilizada que comprende pepticuerpos terapéuticos.

Antecedentes de la invención

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

15 Una modificación útil es la combinación de un polipéptido con un dominio "Fc" de un anticuerpo. Los anticuerpos comprenden dos partes funcionalmente independientes, un dominio variable conocido como "Fab", que se une a antígeno, y un dominio constante conocido como "Fc", que está relacionado con funciones efectoras tales como activación de complemento y ataque por células fagocitarias. Un Fc tiene una semivida en suero larga, mientras que un Fab tiene una vida corta. Capon *et al.* (1989), Nature 337: 525-31. Véase también, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 5.428.130. Cuando se construye junto con un pepticuerpo o proteína terapéutica, un dominio Fc puede proporcionar una semivida más larga o incorporar funciones tales como unión a receptor de Fc, unión a proteína A, fijación de complemento y quizás incluso transferencia a través de la placenta, citado anteriormente. La tabla 1 resume el uso de fusiones de Fc con proteínas terapéuticas conocidas en la técnica.

Tabla 1 – Fusión de Fc con proteínas terapéuticas

Forma de Fc	Pareja de fusión	Implicaciones terapéuticas	Referencia
IgG1	Extremo N-terminal de CD30-L	enfermedad de Hodgkin; linfoma anaplásico; leucemia de células T	patente estadounidense n.º 5.480.981
Fc _γ 2a murino	IL-10	antiinflamatorio; rechazo de trasplante	Zheng <i>et al.</i> (1995), J. Immunol. 154: 5590-600
IgG1	Receptor de TNF	choque séptico	Fisher <i>et al.</i> (1996), N. Engl. J. Med. 334: 1697-1702; Van Zee, K. <i>et al.</i> (1996), J. Immunol. 156: 2221-30
IgG, IgA, IgM o IgE (excluyendo el primer dominio)	Receptor de TNF	inflamación, trastornos autoinmunitarios	patente estadounidense n.º 5.808.029, concedida el 15 de septiembre de 1998
IgG1	Receptor de CD4	SIDA	Capon <i>et al.</i> (1989), Nature 337: 525-31
IgG1, IgG3	Extremo N-terminal de IL-2	anticancerígeno, antiviral	Harvill <i>et al.</i> (1995), Immunotech. 1: 95-105
IgG1	Extremo C-terminal de OPG	osteoartritis; densidad ósea	documento WO 97/23614, publicado el 3 de julio de 1997
IgG1	Extremo N-terminal de leptina	antiobesidad	documento PCT/US 97/23183, presentado el 11 de diciembre de 1997
IgC _γ 1 humana	CTLA-4	trastornos autoinmunitarios	Linsley (1991), J. Exp. Med. 174:561-9

25 También se han estudiado péptidos y proteínas de fusión o conjugados con polietilenglicol ("PEG") para su uso en productos farmacéuticos, en implantes artificiales y otras aplicaciones en las que la biocompatibilidad es importante. Se han propuesto diversos derivados de PEG que tienen un resto activo para permitir que PEG se una a productos farmacéuticos e implantes y a moléculas y superficies en general. Por ejemplo, se han propuesto derivados de PEG para acoplar PEG a superficies para controlar la humectación, la acumulación de estática y la unión de otros tipos de moléculas a la superficie, incluyendo proteínas o residuos de proteínas.

30 En otros estudios, se ha mostrado que el acoplamiento de PEG ("pegilación") es deseable para superar obstáculos encontrados en el uso clínico de moléculas biológicamente activas. La publicación de PCT publicada n.º WO

92/16221 menciona, por ejemplo, que se ha encontrado que muchas proteínas posiblemente terapéuticas tienen una semivida corta en el suero sanguíneo.

La pegilación reduce la tasa de aclaramiento del torrente sanguíneo mediante el aumento del peso molecular aparente de la molécula. Hasta un determinado tamaño, la tasa de filtración glomerular de proteínas es inversamente proporcional al tamaño de la proteína. Por tanto, generalmente la capacidad de la pegilación para reducir el aclaramiento no depende de cuántos grupos PEG se unen a la proteína, sino del peso molecular global de la proteína conjugada. El aclaramiento reducido puede conducir a una eficacia aumentada con respecto al material no pegilado. Véase, por ejemplo, Conforti *et al.*, *Pharm. Research Commun.* vol. 19, pág. 287 (1987) y Katre *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* vol. 84, pág. 1487 (1987).

Además, la pegilación puede reducir la agregación de proteínas, (Suzuki *et al.*, *Biochem. Biophys. Acta* vol. 788, pág. 248 (1984)), alterar (es decir) la inmunogenicidad de proteínas (Abuchowski *et al.*, *J. Biol. Chem.* vol. 252, pág. 3-582 (1977)) y aumentar la solubilidad de proteína tal como se describe, por ejemplo, en la publicación de PCT n.º WO 92/16221.

En general, la interacción de un ligando proteico con su receptor con frecuencia tiene lugar en una superficie de contacto relativamente grande. Sin embargo, tal como se demuestra en el caso de la hormona del crecimiento humano unida a su receptor, sólo unos pocos residuos clave en la superficie de contacto contribuyen realmente a la mayor parte de la energía de unión. Clackson, T. *et al.*, *Science* 267:383-386 (1995). Esta observación y el hecho de que la mayor parte del ligando proteico restante sólo sirve para presentar los epítomos de unión en la topología correcta hacen posible encontrar ligandos activos de tamaño mucho menor. Por tanto, moléculas de longitud tan sólo de "péptidos" tal como se definen en el presente documento pueden unirse a la proteína receptora de un ligando proteico grande dado. Tales péptidos pueden imitar la bioactividad del ligando proteico grande ("agonistas peptídicos") o, mediante unión de competencia, inhibir la bioactividad del ligando proteico grande ("antagonistas peptídicos").

Han surgido bibliotecas de péptidos de presentación en fagos como un potente método en la identificación de tales agonistas y antagonistas peptídicos. Véase, por ejemplo, Scott *et al.* (1990), *Science* 249: 386; Devlin *et al.* (1990), *Science* 249: 404; patente estadounidense n.º 5.223.409, concedida el 29 de junio de 1993; patente estadounidense n.º 5.733.731, concedida el 31 de marzo de 1998; patente estadounidense n.º 5.498.530, concedida el 12 de marzo de 1996; patente estadounidense n.º 5.432.018, concedida el 11 de julio de 1995; patente estadounidense n.º 5.338.665, concedida el 16 de agosto de 1994; patente estadounidense n.º 5.922.545, concedida el 13 de julio de 1999; documento WO 96/40987, publicado el 19 de diciembre de 1996; y documento WO 98/15833, publicado el 16 de abril de 1998. En tales bibliotecas, se presentan secuencias peptídicas al azar mediante fusión con proteínas de la cubierta de fago filamentoso. Normalmente, los péptidos presentados se eluyen por afinidad frente a un dominio extracelular de un receptor inmovilizado por anticuerpo. Los fagos retenidos pueden enriquecerse mediante rondas sucesivas de purificación por afinidad y nueva propagación, y los péptidos con mejor unión se secuencian para identificar residuos clave dentro de una o más familias de péptidos estructuralmente relacionadas. Véase, por ejemplo, Cwirla *et al.* (1997), *Science* 276: 1696-9, en el que se identificaron dos familias diferenciadas. Las secuencias peptídicas también pueden sugerir qué residuos pueden sustituirse de manera segura mediante exploración con alanina o mediante mutagénesis a nivel de ADN. Pueden crearse bibliotecas de mutagénesis y examinarse para optimizar adicionalmente la secuencia de los mejores componentes de unión. Lowman (1997), *Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 26: 401-24.

Otros métodos compiten con la presentación en fagos en la investigación de péptidos. Puede fusionarse una biblioteca de péptidos con el extremo carboxilo-terminal del represor lac y expresarse en *E. coli*. Otro método basado en *E. coli* permite la presentación en la membrana exterior de la célula mediante fusión con una lipoproteína asociada a peptidoglicano (PAL). Estos y otros métodos relacionados se denominan de manera colectiva "presentación en *E. coli*". Otro enfoque biológico para examinar mezclas de péptidos solubles usa levadura para la expresión y secreción. Véase Smith *et al.* (1993), *Mol. Pharmacol.* 43: 741-8. El método de Smith *et al.* y otros métodos relacionados se denominan "exploración basada en levadura". En otro método, se detiene la traducción de ARN al azar antes de la liberación del ribosoma, dando como resultado una biblioteca de polipéptidos con su ARN asociado todavía unido. Este y otros métodos relacionados se denominan de manera colectiva "presentación en ribosoma". Otros métodos emplean la unión química de péptidos a ARN; véase, por ejemplo, Roberts & Szostak (1997), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 12297-303. Este y otros métodos relacionados se denominan de manera colectiva "exploración de ARN-péptidos". Se han desarrollado bibliotecas de péptidos derivadas químicamente en las que los péptidos se inmovilizan sobre materiales estables no biológicos, tales como barras de polietileno o resinas permeables en disolvente. Otra biblioteca de péptidos derivada químicamente usa fotolitografía para explorar péptidos inmovilizados sobre portaobjetos de vidrio. Estos y otros métodos relacionados se denominan de manera colectiva "exploración de péptidos químicos". La exploración de péptidos químicos puede ser ventajosa porque permite el uso de D-aminoácidos y otros análogos no naturales, así como elementos no peptídicos. En Wells & Lowman (1992), *Curr. Opin. Biotechnol.* 3: 355-62 se revisan métodos tanto biológicos como químicos.

En el caso de péptidos bioactivos conocidos, puede llevarse a cabo un diseño racional de ligandos peptídicos con propiedades terapéuticas favorables. En un enfoque de este tipo, se realizan cambios graduales en una secuencia peptídica y se determina el efecto de la sustitución sobre la bioactividad o una propiedad biofísica predictiva del

péptido (por ejemplo, estructura en disolución). Estas técnicas se denominan de manera colectiva “diseño racional”. En una técnica de este tipo, se realiza una serie de péptidos en la que se sustituye un único residuo cada vez por alanina. Esta técnica se denomina comúnmente “paseo con alanina” o una “exploración con alanina”. Cuando se sustituyen dos residuos (contiguos o separados), se denomina “paseo con alanina doble”. Las sustituciones de aminoácido resultantes pueden usarse solas o en combinación para dar como resultado una nueva entidad peptídica con propiedades terapéuticas favorables.

También puede usarse un análisis estructural de la interacción proteína-proteína para sugerir péptidos que imitan la actividad de unión de ligandos proteicos grandes. En un análisis de este tipo, la estructura cristalina puede sugerir la identidad y orientación relativa de residuos críticos del ligando proteico grande, a partir de lo cual puede diseñarse un péptido. Véase, por ejemplo, Takasaki *et al.* (1997), *Nature Biotech.* 15: 1266-70. Estos y otros métodos relacionados se denominan “análisis estructural de proteínas”. Estos métodos analíticos también pueden usarse para investigar la interacción entre una proteína receptora y péptidos seleccionados mediante presentación en fagos, lo cual puede sugerir una modificación adicional de los péptidos para aumentar la afinidad de unión.

Conceptualmente, pueden identificarse compuestos miméticos peptídicos de cualquier proteína usando presentación en fagos y los otros métodos mencionados anteriormente. También se han usado estos métodos para el mapeo de epítomos, para la identificación de aminoácidos críticos en interacciones proteína-proteína, y como candidatos para el descubrimiento de nuevos agentes terapéuticos. Por ejemplo, Cortese *et al.* (1996), *Curr. Opin. Biotech.* 7: 616-21. Ahora están usándose bibliotecas de péptidos muy frecuentemente en estudios inmunológicos, tales como mapeo de epítomos. Kreeger (1996), *The Scientist* 10(13): 19-20.

Resulta de particular interés el uso de bibliotecas de péptidos y otras técnicas en el descubrimiento de péptidos farmacológicamente activos. En la tabla 2 se resumen varios de tales péptidos identificados en la técnica. En las publicaciones mencionadas se describen los péptidos. Se describe la actividad farmacológica de los péptidos, y en muchos casos va seguida por un término abreviado para los mismos entre paréntesis. Algunos de estos péptidos se han modificado (por ejemplo, para formar dímeros reticulados en el extremo C-terminal). Normalmente, se examinaron bibliotecas de péptidos para determinar la unión a un receptor para una proteína farmacológicamente activa (por ejemplo, receptor de EPO). En al menos un caso (CTLA4), se examinó la biblioteca de péptidos para determinar la unión a un anticuerpo monoclonal.

Tabla 2 – Péptidos farmacológicamente activos

Forma de péptido	Pareja de unión /proteína de interés ¹	Actividad farmacológica	Referencia
unido con enlaces disulfuro intrapeptídicos	receptor de EPO	compuesto mimético de EPO	Wrighton <i>et al.</i> (1996), <i>Science</i> 273: 458-63; patente estadounidense n.º 5.773.569, concedida el 30 de junio de 1998 a Wrighton <i>et al.</i>
dímero reticulado en el extremo C-terminal	receptor de EPO	compuesto mimético de EPO	Linah <i>et al.</i> (1996), <i>Science</i> 273: 464-71; Wrighton <i>et al.</i> (1997), <i>Nature Biotechnology</i> 15: 1261-5; solicitud de patente internacional WO 96/40772, publicada el 19 de diciembre de 1996
lineal	receptor de EPO	compuesto mimético de EPO	Naranda <i>et al.</i> (1999), <i>Proc. Natl. Acad. Sci. USA</i> , 96: 7569-74; documento WO 99/47151, publicado el 23 de septiembre de 1999
lineal	c-Mpl	compuesto mimético de TPO	Cwirla <i>et al.</i> (1997) <i>Science</i> 276: 1696-9; patente estadounidense n.º 5.869.451, concedida el 9 de febrero de 1999; patente estadounidense n.º 5.932.946, concedida el 3 de agosto de 1999

¹ El péptido asociado (por ejemplo, receptor de EPO, receptor de IL-1) puede unirse a, o imitar, la proteína indicada en esta columna. Las referencias indicadas para cada una aclaran si los péptidos se unen a, o imitan, la molécula.

dímero reticulado en el extremo C-terminal	c-Mpl	compuesto mimético de TPO	Cwirla <i>et al.</i> (1997), Science 276: 1696-9
dímero unido con enlaces disulfuro		estimulación of hematopoyesis ("compuesto mimético de G-CSF")	Paukovits <i>et al.</i> (1984), Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem. 365: 303-11; Laerum <i>et al.</i> (1988), Exp. Hemat. 16: 274-80
dímero unido con alquileo		compuesto mimético de G-CSF	Bhatnagar <i>et al.</i> (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9; Cuthbertson <i>et al.</i> (1997), J. Med. Chem. 40: 2876-82; King <i>et al.</i> (1991), Exp. Hematol. 19:481; King <i>et al.</i> (1995), Blood 86 (Sup. 1): 309a
lineal	receptor de IL-1	enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias ("antagonista de IL-1" o "compuesto mimético de IL-1ra")	patente estadounidense n.º 5.608.035; patente estadounidense n.º 5.786.331; patente estadounidense n.º 5.880.096; Yanofsky <i>et al.</i> (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 7381-6; Akesson <i>et al.</i> (1996), J. Biol. Chem. 271: 30517-23; Wiekzorek <i>et al.</i> (1997), Pol. J. Pharmacol. 49: 107-17; Yanofsky (1996), PNAS, 93:7381-7386.
lineal	factor tímico sérico (FTS)	estimulación de linfocitos ("compuesto mimético de FTS")	Inagaki-Ohara <i>et al.</i> (1996), Cellular Immunol. 171: 30-40; Yoshida (1984), Int. J. Immunopharmacol, 6:141-6.
unido con enlaces disulfuro intrapeptídicos	AcM frente a CTLA4	compuesto mimético de CTLA4	Fukumoto <i>et al.</i> (1998), Nature Biotech. 16: 267-70
exocíclico	receptor de TNF- α	antagonista de TNF- α	Takasaki <i>et al.</i> (1997), Nature Biotech. 15:1266-70; documento WO 98/53842, publicado el 3 de diciembre de 1998
lineal	receptor de TNF- α	antagonista de TNF- α	Chirinos-Rojas (1998), J. Imm., 5621-5626.
unido con enlaces disulfuro intrapeptídicos	C3b	inhibición de activación del complemento; enfermedades autoinmunitarias ("antagonista de C3b")	Sahu <i>et al.</i> (1996), J. Immunol. 157: 884-91; Morikis <i>et al.</i> (1998), Protein Sci. 7: 619-27
lineal	vinculina	procesos de adhesión celular: crecimiento celular, diferenciación celular, cicatrización de heridas, metástasis tumoral ("unión a vinculina")	Adey <i>et al.</i> (1997) Biochem. J. 324: 523-8
lineal	proteína de unión a C4 (C4BP)	antitrombótico	Linse <i>et al.</i> (1997), J. Biol. Chem. 272: 14658-65
lineal	receptor de urocinasa	procesos asociados con la interacción de urocinasa con su receptor (por ejemplo, angiogénesis, invasión y metástasis de células tumorales); ("antagonista de UKR")	Goodson <i>et al.</i> (1994), Proc. Natl. Acad. Sci. 91: 7129-33; solicitud internacional WO 97/35969, publicada el 2 de octubre de 1997

lineal	Mdm2, Hdm2	inhibición de la inactivación de p53 mediada por Mdm2 o hdm2; antitumoral ("antagonista de Mdm/hdm")	Picksley <i>et al.</i> (1994), <i>Oncogene</i> 9: 2523-9; Bottger <i>et al.</i> (1997) <i>J. Mol. Biol.</i> 269: 744-56; Bottger <i>et al.</i> (1996), <i>Oncogene</i> 13: 2141-7
lineal	p21 ^{WAF1}	antitumoral imitando la actividad de p21 ^{WAF1}	Ball <i>et al.</i> (1997), <i>Curr. Biol.</i> 7:71-80
lineal	farnesil transferasa	anticancerígeno impidiendo la activación del oncogén ras	Gibbs <i>et al.</i> (1994), <i>Cell</i> 77:175-178
lineal	dominio efector de Ras	anticancerígeno inhibiendo la función biológica del oncogén ras	Moodie <i>et al.</i> (1994), <i>Trends Genet</i> 10: 44-48 Rodriguez <i>et al.</i> (1994), <i>Nature</i> 370:527-532
lineal	dominios SH2/SH3	anticancerígeno inhibiendo el crecimiento tumoral con tirosina cinasas activadas; tratamiento de estados patológicos mediados por SH3 ("antagonista de SH3")	Pawson <i>et al.</i> (1993), <i>Curr. Biol.</i> 3:434-432; Yu <i>et al.</i> (1994), <i>Cell</i> 76:933-945; Rickles <i>et al.</i> (1994), <i>EMBO J.</i> 13:5598- 5604; Sparks <i>et al.</i> (1994), <i>J. Biol. Chem.</i> 269: 23853- 6; Sparks <i>et al.</i> (1996), <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 93: 1540-4; patente estadounidense n.º 5.886.150, concedida el 23 de marzo de 1999; patente estadounidense n.º 5.888.763, concedida el 30 de marzo de 1999
lineal	p16 ^{INK4}	anticancerígeno imitando la actividad de p16; por ejemplo, inhibiendo el complejo de ciclina D-Cdk ("compuesto mimético de p16")	Fähræus <i>et al.</i> (1996), <i>Curr. Biol.</i> 6:84-91
lineal	Src, Lyn	inhibición de la activación de mastocitos, estados relacionados con IgE, hipersensibilidad de tipo I ("antagonista de mastocitos")	Stauffer <i>et al.</i> (1997), <i>Biochem.</i> 36: 9388-94
lineal	proteasa de mastocitos	tratamiento de trastornos inflamatorios mediados por la liberación de triptasa 6 ("inhibidores de proteasas de mastocitos")	solicitud internacional WO 98/33812, publicada el 6 de agosto de 1998
lineal	antígeno de núcleo de VHB (HBcAg)	tratamiento de infecciones virales por VHB ("anti-VHB")	Dyson & Muray (1995), <i>Proc. Natl. Acad. Sci.</i> 92: 2194-8
lineal	selectinas	adhesión de neutrófilos; enfermedades inflamatorias ("antagonista de selectina")	Martens <i>et al.</i> (1995), <i>J. Biol. Chem.</i> 270: 21129-36; solicitud de patente europea EP 0 714 912, publicada el 5 de junio de 1996
lineal, ciclizado	calmodulina	antagonista de calmodulina	Pierce <i>et al.</i> (1995), <i>Molec. Diversity</i> 1: 259-65; Dedman <i>et al.</i> (1993), <i>J. Biol. Chem.</i> 268: 23025-30; Adey & Kay (1996), <i>Gene</i> 169: 133-4
lineal, ciclizado	integrinas	direccionamiento a tumores; tratamiento para estados relacionados con	solicitudes internacionales WO 95/14714, publicada el 1 de junio de 1995; WO

		acontecimientos celulares mediados por integrinas, incluyendo agregación plaquetaria, trombosis, cicatrización de heridas, osteoporosis, reparación de tejidos, angiogénesis (por ejemplo, para el tratamiento de cáncer), e invasión tumoral ("unión a integrina")	97/08203, publicada el 6 de marzo de 1997; WO 98/10795, publicada el 19 de marzo de 1998; WO 99/24462, publicada el 20 de mayo de 1999; Kraft <i>et al.</i> (1999), J. Biol. Chem. 274: 1979-1985
cíclico, lineal	fibronectina y componentes de la matriz extracelular de células T y macrófagos	tratamiento de estados inflamatorios y autoinmunitarios	documento WO 98/09985, publicado el 12 de marzo de 1998
lineal	somatostatina y cortistatina	tratamiento o prevención de tumores productores de hormonas, acromegalia, gigantismo, demencia, úlcera gástrica, crecimiento tumoral, inhibición de secreción de hormonas, modulación del sueño o la actividad neuronal	solicitud de patente europea 0 911 393, publicada el 28 de abril de 1999
lineal	lipopolisacárido bacteriano	antibiótico; choque séptico; trastornos modulables por CAP37	patente estadounidense n.º 5.877.151, concedida el 2 de marzo de 1999
lineal o cíclico, incluyendo D-aminoácidos	pardaxina, melitina	antipatógeno	documento WO 97/31019, publicado el 28 de agosto de 1997
lineal, cíclico	VIP	impotencia, trastornos neurodegenerativos	documento WO 97/40070, publicado el 30 de octubre de 1997
lineal	CTL	cáncer	documento EP 0 770 624, publicado el 2 de mayo de 1997
lineal	THF-gamma2		Burnstein (1988), Biochem., 27:4066-71.
lineal	Amilina		Cooper (1987), Proc. Natl. Acad. Sci., 84:8628-32.
lineal	Adrenomedulina		Kitamura (1993), BBRC, 192:553-60.
cíclico, lineal	VEGF	antiangiogénico; cáncer, artritis reumatoide, retinopatía diabética, psoriasis ("antagonista de VEGF")	Fairbrother (1998), Biochem., 37:17754-17764.
cíclico	MMP	inflamación y trastornos autoinmunitarios; crecimiento tumoral ("inhibidor de MMP")	Koivunen (1999), Nature Biotech., 17:768-774.
	fragmento de HGH	tratamiento de la obesidad	patente estadounidense n.º 5.869.452
	Equistatina	inhibición de la agregación plaquetaria	Gan (1988), J. Biol. Chem., 263:19827-32.
lineal	autoanticuerpo frente a SLE	SLE	documento WO 96/30057, publicado el 3 de octubre de 1996
	GD1alfa	supresión de la metástasis tumoral	Ishikawa <i>et al.</i> (1998), FEBS Lett. 441 (1): 20-4
	anticuerpos antifosfolípidos, contra beta-2- glicoproteína-I (β 2GPI)	activación de células endoteliales, síndrome antifosfolípido (APS), fenómenos	Blank <i>et al.</i> (1999), Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 5164-8

ES 2 599 318 T3

		tromboembólicos, trombocitopenia, y pérdida fetal recurrente	
lineal	cadena beta de receptor de células T	diabetes	documento WO 96/11214, publicado el 18 de abril de 1996.
		antiproliferativo, antiviral	documento WO 00/01402, publicado el 13 de enero de 2000.
		antiisquémico, liberador de hormona del crecimiento	documento WO 99/62539, publicado el 9 de diciembre de 1999.
		antiangiogénico	documento WO 99/61476, publicado el 2 de diciembre de 1999.
lineal		agonista de la apoptosis; tratamiento de trastornos asociados con células T (por ejemplo, enfermedades autoinmunitarias, infección viral, leucemia de células T, linfoma de células T)	documento WO 99/38526, publicado el 5 de agosto de 1999.
lineal	clase II del MHC	tratamiento de enfermedades autoinmunitarias	patente estadounidense n.º 5.880.103, concedida el 9 de marzo de 1999.
lineal	andrógeno R, p75, MJD, DCC, huntingtina	proapoptótico, útil en el tratamiento del cáncer	documento WO 99/45944, publicado el 16 de septiembre de 1999.
lineal	factor de von Willebrand; factor VIII	inhibición de interacción con el factor VIII; anticoagulantes	documento WO 97/41220, publicado el 29 de abril de 1997.
lineal	LLP1 de lentivirus	antimicrobiano	patente estadounidense n.º 5.945.507, concedida el 31 de agosto de 1999.
lineal	péptido inductor de sueño delta	trastornos del sueño	Graf (1986), Peptides 7:1165.
lineal	proteína C reactiva (CRP)	inflamación y cáncer	Barna (1994), Cancer Immunol. Immunother. 38:38 (1994).
lineal	péptidos activadores de espermatozoides	esterilidad	Suzuki (1992), Comp. Biochem. Physiol. 1028:679.
lineal	angiotensinas	factores hematopoyéticos para estados hematocitopénicos del cáncer, SIDA, etc.	Lundergan (1999), J. Periodontal Res. 34(4):223-228.
lineal	gp41 de VIH-1	anti-SIDA	Chan (1998), Cell 93:681-684.
lineal	PKC	inhibición de la resorción ósea	Moonga (1998), Exp. Physiol. 83:717-725.
lineal	defensinas (HNP-1, 2, 3, 4)	antimicrobiano	Harvig (1994), Methods Enz. 236: 160-172.
lineal	p185 ^{HER2/neu} , C-erbB-2	compuesto mimético de AHNP; antitumoral	Park (2000), Nat. Biotechnol. 18:194-198.
lineal	gp130	antagonista de IL-6	documento WO 99/60013, publicado el 25 de noviembre de 1999.
lineal	colágeno, otras proteínas relacionadas con la artritis, de articulaciones, cartilago	enfermedades autoinmunitarias	documento WO 99/50282, publicado el 7 de octubre de 1999.
lineal	proteína de la envoltura de VIH-1	tratamiento de enfermedades degenerativas	documento WO 99/51254, publicado el 14 de octubre de 1999.

		neuroológicas	
lineal	IL-2	trastornos autoinmunitarios (por ejemplo, rechazo de injerto, artritis reumatoide)	documento WO 00/04048, publicado el 27 de enero de 2000; documento WO 00/11028, publicado el 2 de marzo de 2000.

Los péptidos identificados mediante el examen de bibliotecas de péptidos se han considerado "candidatos" en el desarrollo de agentes terapéuticos en vez de usarse como agentes terapéuticos en sí mismos. Como otras proteínas y péptidos, se eliminarán rápidamente *in vivo* o bien mediante filtración renal, mecanismos de aclaramiento celular en el sistema reticuloendotelial o degradación proteolítica. (Francis (1992), Focus on Growth Factors 3: 4-11). Como resultado, la técnica actualmente usa los péptidos identificados para validar dianas farmacológicas o como armazones para el diseño de compuestos orgánicos que podrían no haberse identificado de manera igual de fácil o rápida mediante examen de bibliotecas químicas. Lowman (1997), Ann. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 26: 401-24; Kay *et al.* (1998), Drug Disc. Today 3: 370-8.

Normalmente, los péptidos purificados sólo son ligeramente estables en un estado acuoso y experimentan degradación química y física dando como resultado una pérdida de actividad biológica durante el procesamiento y el almacenamiento. Adicionalmente, las composiciones de péptidos en disolución acuosa experimentan hidrólisis, tal como desamidación y escisión de enlaces peptídicos. Estos efectos representan un grave problema para péptidos terapéuticamente activos que se pretenden administrar a seres humanos dentro de un intervalo de dosificación definido basándose en la actividad biológica. El documento WO 2004/092215 describe métodos de tratamiento usando pepticuerpos específicos que pueden unirse a angiopoyetina-2 (Ang-2) humana. El documento WO 01/83525 se refiere a la fusión de dominios Fc con péptidos biológicamente activos y describe que la unión al vehículo aumenta la semivida del péptido, que de lo contrario se degradaría rápidamente *in vivo*. El documento WO 97/04801 se refiere a formulaciones de proteínas liofilizadas isotónicas. El documento WO 98/14476 se refiere a composiciones farmacéuticas que contienen un ligando de mpl. El documento WO 96/24369 se refiere a composiciones y métodos para obtener preparaciones concentradas de IL-12 y formulaciones de IL-12 adecuadas para su almacenamiento y administración. Liao Xiangmin *et al.* (2005), Pharmaceutical Research. Vol. 22, n.º 11, págs. 1978-1985, describen la influencia de la concentración del principio farmacéutico activo sobre el estado físico de manitol en sistemas congelados y acuosos.

La administración de péptidos purificados sigue siendo una estrategia de tratamiento prometedora para muchas enfermedades que afectan a la población humana. Sin embargo, no se ha abordado la capacidad del pepticuerpo terapéutico para permanecer como una composición farmacéutica estable a lo largo del tiempo en una variedad de condiciones de almacenamiento y después ser eficaz para pacientes *in vivo*. Por tanto, sigue existiendo una necesidad en la técnica de proporcionar pepticuerpos terapéuticos en formulaciones estables que son útiles como agentes terapéuticos para el tratamiento de enfermedades y trastornos.

30 Sumario de la invención

La presente invención proporciona formulaciones útiles para la liofilización de pepticuerpos terapéuticos, dando como resultado un producto de pepticuerpo terapéutico altamente estable. El producto de pepticuerpo terapéutico estable es útil como agente terapéutico en el tratamiento de individuos que padecen trastornos o estados que pueden beneficiarse de la administración del pepticuerpo terapéutico. La presente invención se define por las reivindicaciones.

En particular, la invención proporciona una composición de pepticuerpos terapéuticos liofilizada que comprende un tampón, un agente de carga, un agente estabilizante, y un tensioactivo; en la que el tampón está compuesto por un agente tamponante del pH, en la que:

a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

b) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v; o

c) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y

dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o

d) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

5 dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

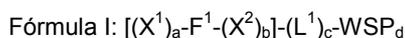
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

e) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v;

10 y en la que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula I,



en la que:

F¹ es un dominio Fc;

X¹ se selecciona de

15 P¹-(L²)_e-

P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e-

P³-(L⁴)_g-P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e- y

P⁴-(L⁵)_h-P³-(L⁴)_g-P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e-

X² se selecciona de:

20 -(L²)_e-P¹,

-(L²)_e-P¹-(L³)_f-P²,

-(L²)_e-P¹-(L³)_f-P²-(L⁴)_g-P³, y

-(L²)_e-P¹-(L³)_f-P²-(L⁴)_g-P³-(L⁵)_h-P⁴

en la que P¹, P², P³ y P⁴ son cada uno independientemente secuencias de péptidos farmacológicamente activos;

25 L¹, L², L³, L⁴ y L⁵ son cada uno independientemente grupos de unión;

a, b, c, e, f, g y h son cada uno independientemente 0 ó 1, con la condición de que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1 o mayor de 1; y

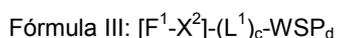
WSP es un polímero soluble en agua, cuya unión se realiza en cualquier resto reactivo en F¹.

En otra realización, el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula II

30
$$\text{Fórmula II: } [X^1-F^1]-(L^1)_c\text{-WSP}_d$$

en la que el dominio Fc se une en el extremo C-terminal de X¹, y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L¹.

En todavía otra realización, el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula III



35 en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de X², y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L¹.

En aún otra realización, el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula IV

Fórmula IV: $[F^1-(L^1)_e-P^1]-(L^1)_c-WSP_d$

en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-(L^1)_c-P^1$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

En otra realización, el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula V

5 Fórmula V: $[F^1-(L^1)_e-P^1-(L^2)_f-P^2]-(L^1)_c-WSP_d$

en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-L^1-P^1-L^2-P^2$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

En otra realización, el pepticuerpo terapéutico es un multímero o dímero. En otra realización, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que P^1 , P^2 , P^3 y/o P^4 se seleccionan independientemente de un péptido expuesto en una cualquiera de las tablas 4 a 38. En una realización relacionada, P^1 , P^2 , P^3 y/o P^4 tienen la misma secuencia de aminoácidos. En otra realización, el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1. En otra realización, WSP es PEG. En todavía otra realización, el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1 y WSP es PEG. En otra realización, el PEG tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2 kDa y 100 kDa, o entre 6 kDa y 25 kDa. En otra realización, la composición comprende al menos el 50%, el 75%, el 85%, el 90% o el 95% de pepticuerpo terapéutico pegilado.

A menos que se especifique en las reivindicaciones, en una composición mencionada anteriormente el agente tamponante del pH puede seleccionarse del grupo que consiste en glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato y aspartato. En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que el agente de carga se selecciona del grupo que consiste en manitol, glicina, sacarosa, dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol.

A menos que se especifique en las reivindicaciones, en una composición mencionada anteriormente el agente estabilizante puede seleccionarse del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCl de arginina, compuestos polihidroxilados, incluyendo polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietil-almidón, ciclodextrinas, N-metil-pirolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio.

A menos que se especifique en las reivindicaciones, en una composición mencionada anteriormente el tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio, dioctilsulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico, colato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoestearato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja, DOPC, DMPG, DMPC, y DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de entre aproximadamente 0,25 mg/ml y 250 mg/ml.

En otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en la que el pH es de 5,0; en la que el agente de carga es manitol al 4% p/v; en la que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en la que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v. En otra realización, se proporciona la composición mencionada anteriormente en la que P^1 comprende una secuencia expuesta en la tabla 6. En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 0,5 mg/ml. En otra realización, el pepticuerpo terapéutico es uno cualquiera de SEQ ID NO: 993, SEQ ID NO: 994, SEQ ID NO: 995, SEQ ID NO: 996, SEQ ID NO: 997, SEQ ID NO: 998, SEQ ID NO: 999, SEQ ID NO: 1000, SEQ ID NO: 1001, SEQ ID NO: 1002, SEQ ID NO: 1003, SEQ ID NO: 1004, SEQ ID NO: 1005, SEQ ID NO: 1006, SEQ ID NO: 1007, SEQ ID NO: 1008, SEQ ID NO: 1009, SEQ ID NO: 1010, SEQ ID NO: 1011, SEQ ID NO: 1012, SEQ ID NO: 1013, SEQ ID NO: 1014, SEQ ID NO: 1015, SEQ ID NO: 1016, o SEQ ID NO: 1017.

En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en la que el pH es de 7,0; en la que el agente de carga es manitol al 4% p/v; en la que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en la que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v. En otra realización, se proporciona la composición mencionada anteriormente en la que P^1 comprende una secuencia expuesta en la tabla 32. En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 30 mg/ml.

En el presente documento se da a conocer además una composición mencionada anteriormente, en la que el agente tamponante del pH es histidina 20 mM y en la que el pH es de 5,0; en la que el agente de carga es 3,3% p/v manitol; en la que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en la que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v. En otra realización de la composición de la invención, P^1 comprende una secuencia expuesta en la tabla 4. En aún otra

realización de la composición de la invención, la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 100 mg/ml.

En todavía otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en la que el pH es de 5,0; en la que el agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y en la que el agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v. En otra realización, se proporciona la composición mencionada anteriormente en la que P¹ comprende una secuencia expuesta en la tabla 31. En aún otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 30 mg/ml.

En otra realización de la invención, se proporciona una composición mencionada anteriormente en la que la composición se selecciona del grupo que consiste en: a) histidina 10 mM, pH 4,7, manitol al 4% y sacarosa al 2%, con y sin polisorbato 20 al 0,004%; y b) histidina 10 mM, pH 5, manitol al 4% y sacarosa al 2%, con y sin polisorbato 20 al 0,004%. En otra realización, se proporciona la composición mencionada anteriormente en la que P¹ comprende una secuencia expuesta en las tablas 21-24. En todavía otra realización, se proporciona la composición mencionada anteriormente en la que la concentración de pepticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en 1, 30, 85 y 100 mg/ml.

La presente invención también contempla métodos de producción de pepticuerpos terapéuticos liofilizados de la presente invención. En particular, la invención proporciona un método para producir un pepticuerpo terapéutico liofilizado que comprende las etapas de: a) preparar una disolución de un tampón, un agente de carga, un agente estabilizante, y opcionalmente un tensioactivo; en el que el tampón está compuesto por un agente tamponante del pH en el que

a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

b) dicho agente tamponante del pH agente es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v; o

c) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y

dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o

d) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

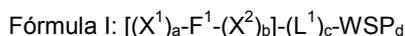
e) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v; y

b) liofilizar el pepticuerpo terapéutico;

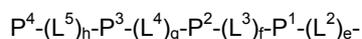
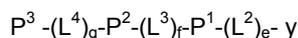
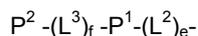
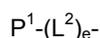
en el que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula I,



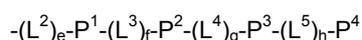
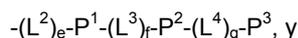
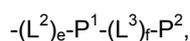
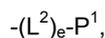
en la que:

F¹ es un dominio Fc;

X¹ se selecciona de



5 X^2 se selecciona de:



10 en la que P^1 , P^2 , P^3 y P^4 son cada uno independientemente secuencias de péptidos farmacológicamente activos;

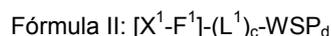
L^1 , L^2 , L^3 , L^4 y L^5 son cada uno independientemente grupos de unión;

a, b, c, e, f, g y h son cada uno independientemente 0 ó 1, con la condición de que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1 o mayor de 1; y

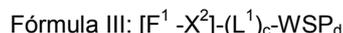
WSP es un polímero soluble en agua, cuya unión se realiza en cualquier resto reactivo en F^1 .

15 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula II



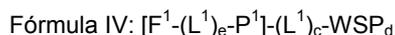
en la que el dominio Fc se une en el extremo C-terminal de X^1 , y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

20 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula III



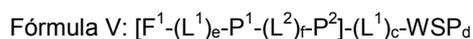
en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de X^2 , y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

25 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula IV



en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-(L^1)_e-P^1$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

30 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el pepticuerpo terapéutico comprende una estructura expuesta en la fórmula V



en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-L^1-P^1-L^2-P^2$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

35 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el pepticuerpo terapéutico es un multímero o dímero. En otra realización, el P^1 , P^2 , P^3 y/o P^4 se seleccionan independientemente de un péptido expuesto en una cualquiera de las tablas 4 a 38. En otra realización, el P^1 , P^2 , P^3 y/o P^4 tienen la misma secuencia de aminoácidos. En otra realización, el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1. En otra realización, WSP es PEG. En otra realización, el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1 y WSP es PEG. En otra realización, PEG tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2 kDa y 100 kDa o entre aproximadamente 6 kDa y 25 kDa. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la composición comprende al menos el 50%, el 75%, el 85%, el 90% o el 95% de pepticuerpo terapéutico pegilado.

40 En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la composición comprende al menos el 50%, el 75%, el 85%, el 90% o el 95% de pepticuerpo terapéutico pegilado.

A menos que se especifique en las reivindicaciones, en el método mencionado anteriormente el agente tamponante del pH puede seleccionarse del grupo que consiste en glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato y

aspartato. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el agente de carga se selecciona del grupo que consiste en manitol, glicina, sacarosa, dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa, lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que el agente estabilizante se selecciona del grupo que consiste en sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCl de arginina, compuestos polihidroxilados, incluyendo polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietil-almidón, ciclodextrinas, N-metil-pirolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio.

A menos que se especifique en las reivindicaciones, en el método mencionado anteriormente el tensioactivo puede seleccionarse del grupo que consiste en laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio, dioctilsulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico, cloato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio, sal de sodio de ácido glicodesoxicólico, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, bromuro de hexadeciltrimetilamonio, CHAPS, CHAPSO, SB3-10, SB3-12, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoesterato de glicerol, polisorbato 20, 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja, DOPC, DMPG, DMPC, y DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. En otra realización del método de la invención, la concentración de pepticuerpo terapéutico es de entre aproximadamente 0,25 mg/ml y 250 mg/ml.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en el que el pH es de 5,0; en el que el agente de carga es manitol al 4% p/v; en el que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en el que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que P¹ comprende una secuencia expuesta en la tabla 6. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 0,5 mg/ml.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en el que el pH es de 7,0; en el que el agente de carga es manitol al 4% p/v; en el que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en el que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que P¹ comprende una secuencia expuesta en la tabla 32. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 30 mg/ml.

En el presente documento se da a conocer además un método mencionado anteriormente en el que el agente tamponante del pH es histidina 20 mM y en el que el pH es de 5,0; en el que el agente de carga es manitol al 3,3% p/v; en el que el agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y en el que el tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v. En otra realización del método de la invención, P¹ comprende una secuencia expuesta en la tabla 4. En otra realización del método de la invención, la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 100 mg/ml.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que el agente tamponante del pH es histidina 10 mM y en el que el pH es de 5,0; en el que el agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y en el que el agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que P¹ comprende una secuencia expuesta en la tabla 31. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la concentración de pepticuerpo terapéutico es de 30 mg/ml.

En otra realización de la invención, se proporciona un método mencionado anteriormente en el que la composición se selecciona del grupo que consiste en: a) histidina 10 mM, pH 4,7, manitol al 4% y sacarosa al 2%, con y sin polisorbato 20 al 0,004%; y b) histidina 10 mM, pH 5, manitol al 4% y sacarosa al 2%, con y sin polisorbato 20 al 0,004%. En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que P¹ comprende una secuencia expuesta en las tablas 21-24. En todavía otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que la concentración de pepticuerpo terapéutico se selecciona del grupo que consiste en 1, 30, 85 y 100 mg/ml.

En otra realización, se proporciona un método mencionado anteriormente que comprende además, antes de la liofilización, las etapas de: b) ajustar el pH de la disolución a un pH de entre aproximadamente 4,0 y aproximadamente 8,0; c) preparar una disolución que contiene el pepticuerpo terapéutico; d) someter a intercambio de tampón la disolución de la etapa (c) en la disolución de la etapa (b); e) añadir una cantidad apropiada de un tensioactivo; y f) liofilizar la mezcla de la etapa (e).

En otra realización, se proporciona el método mencionado anteriormente en el que se proporciona un método para preparar una composición de pepticuerpos terapéuticos reconstituida que comprende las etapas de: a) liofilizar una composición de pepticuerpos terapéuticos mencionada anteriormente; y b) reconstituir la composición de pepticuerpos terapéuticos liofilizada.

En otra realización, se proporciona un kit para preparar una composición farmacéutica acuosa que comprende un primer recipiente que tiene una composición de pepticuerpos terapéuticos liofilizada mencionada anteriormente, y un segundo recipiente que tiene un disolvente fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada.

Descripción detallada de la invención

Definición de términos

El término “que comprende”, con respecto a un péptido compuesto, significa que un compuesto puede incluir aminoácidos adicionales en cualquiera o ambos de los extremos amino o carboxilo-terminales de la secuencia dada. Evidentemente, los aminoácidos adicionales no deben interferir significativamente con la actividad del compuesto. Con respecto a una composición de la presente invención, el término “que comprende” significa que una composición puede incluir componentes adicionales. Estos componentes adicionales no deben interferir significativamente con la actividad de la composición.

El término “pepticuerpo” se refiere a una molécula que comprende péptido(s) fusionado(s) o bien directamente o bien indirectamente con otras moléculas tales como un dominio Fc de un anticuerpo, en la que el resto peptídico se une específicamente a una diana deseada. El/los péptido(s) puede(n) o bien fusionarse con una región Fc o bien insertarse en un bucle de Fc, una molécula modificada de Fc. Los bucles de Fc se describen en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2006/0140934. La invención incluye tales moléculas que comprenden un dominio Fc modificadas para comprender un péptido como secuencia interna (preferiblemente en una región de bucle) del dominio Fc. Las moléculas peptídicas internas de Fc pueden incluir más de una secuencia peptídica en tándem en una región interna particular, y pueden incluir péptidos adicionales en otras regiones internas. Aunque se muestran a modo de ejemplo las regiones de bucle supuestas, también se considera que inserciones en cualquier otro dominio no terminal de Fc son parte de esta invención. El término “pepticuerpo” no incluye proteínas de fusión con Fc (por ejemplo, proteínas de longitud completa fusionadas con un dominio Fc).

El término “vehículo” se refiere a una molécula que previene la degradación y/o aumenta la semivida, reduce la toxicidad, reduce la inmunogenicidad, o aumenta la actividad biológica de una proteína terapéutica. Los vehículos a modo de ejemplo incluyen un dominio Fc tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.428.130 de Capon *et al.*, concedida el 27 de junio de 1995.

El término “Fc nativo” se refiere a una molécula o secuencia que comprende la secuencia de un fragmento no de unión a antígeno resultante de la digestión de anticuerpo completo, ya sea en forma monomérica o multimérica. Normalmente, un Fc nativo comprende dominios CH2 y CH3. La fuente de inmunoglobulina original del Fc nativo es en un aspecto de origen humano y puede ser cualquiera de las inmunoglobulinas. Un Fc nativo es un polipéptido monomérico que puede unirse para dar formas diméricas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro), asociación no covalente o una combinación de ambas. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativo oscila entre uno y cuatro dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido mediante enlaces disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG. Ellison *et al.* (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9. El término “Fc nativo” tal como se usa en el presente documento es genérico para las formas monoméricas, diméricas y multiméricas.

El término “variante de Fc” se refiere a una molécula o secuencia que se modifica a partir de un Fc nativo, pero todavía comprende un sitio de unión para el receptor salvaje, FcRn. Las solicitudes internacionales WO 97/34631 (publicada el 25 de septiembre de 1997) y WO 96/32478 describen variantes de Fc a modo de ejemplo, así como la interacción con el receptor salvaje. En un aspecto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que está humanizada a partir de un Fc nativo no humano. En otro aspecto, un Fc nativo comprende sitios que pueden eliminarse porque proporcionan características estructurales o actividad biológica que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención. Por tanto, el término “variante de Fc” comprende una molécula o secuencia que carece de uno o más sitios o residuos del Fc nativo que realizan, o están implicados en, (1) formación de enlaces disulfuro, (2) incompatibilidad con una célula huésped seleccionada, (3) heterogeneidad N-terminal tras la expresión en una célula huésped seleccionada, (4) glicosilación, (5) interacción con complemento, (6) unión a un receptor de Fc distinto de un receptor salvaje, o (7) citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos (ADCC). A continuación en el presente documento se describen variantes de Fc con más detalle.

El término “dominio Fc” abarca moléculas y secuencias de Fc nativo y variante de Fc tal como se definió anteriormente. Como con las variantes de Fc y Fc nativos, el término “dominio Fc” incluye moléculas en forma monomérica o multimérica, ya estén digeridas a partir de anticuerpo completo o producidas por otros medios. En una realización, por ejemplo, la región de Fc puede ser:

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIE
KTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
K (SEQ ID NO:1).

En la técnica se conocen secuencias de Fc adicionales y se contemplan para su uso en la invención. Por ejemplo, Fc IgG1 (n.º de registro de GenBank P01857), Fc IgG2 (n.º de registro de GenBank P01859), Fc IgG3 (n.º de registro de GenBank P01860), Fc IgG4 (n.º de registro de GenBank P01861), Fc IgA1 (n.º de registro de GenBank P01876), Fc IgA2 (n.º de registro de GenBank P01877), Fc IgD (n.º de registro de GenBank P01880), Fc IgM (n.º de registro de GenBank P01871), y Fc IgE (n.º de registro de GenBank P01854) son algunas secuencias de Fc adicionales contempladas para su uso en el presente documento.

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

El término “multímero” tal como se aplica a dominios Fc o moléculas que comprenden dominios Fc se refiere a moléculas que tienen dos o más cadenas de polipéptidos asociadas de manera covalente, no covalente o mediante interacciones tanto covalentes como no covalentes. Las moléculas de IgG forman normalmente dímeros; IgM, pentámeros; IgD, dímeros; y IgA, monómeros, dímeros, trímeros o tetrámeros. Pueden formarse multímeros aprovechando la secuencia y la actividad resultante de la fuente de Ig nativa del Fc o derivatizando (tal como se define a continuación) un Fc nativo de este tipo.

Los términos “derivatizar”, “derivado” o “derivatizado” significan procedimientos y compuestos resultantes en los que, por ejemplo y sin limitación, (1) el compuesto tiene una parte cíclica; por ejemplo, reticulación entre residuos de cisteinilo dentro del compuesto; (2) el compuesto está reticulado o tiene un sitio de reticulación; por ejemplo, el compuesto tiene un residuo de cisteinilo y por tanto forma dímeros reticulados en cultivo o *in vivo*; (3) uno o más enlaces de peptidilo se sustituyen por un enlace distinto de peptidilo; (4) el extremo N-terminal se sustituye por NRR_1 , NRC(O)R_1 , -NRC(O)OR_1 , $\text{-NRS(O)}_2\text{R}_1$, -NHC(O)NHR , un grupo succinimida, o benciloxicarbonil-NH-sustituido o no sustituido, en los que R y R_1 y los sustituyentes de anillo son tal como se definen a continuación en el presente documento; (5) el extremo C-terminal se sustituye por -C(O)R_2 o $\text{-NR}_3\text{R}_4$ en los que R_2 , R_3 y R_4 son tal como se definen a continuación en el presente documento; y (6) compuestos en los que restos de aminoácido individuales se modifican mediante tratamiento con agentes que pueden reaccionar con residuos terminales o cadenas laterales seleccionadas. A continuación en el presente documento se describen con más detalle los derivados.

Tal como se usa en el presente documento el término “péptido” se refiere a moléculas de 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 37, 38, 39, 40, 41, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, 57, 58, 59, 60, 61, 62, 63, 64, 65, 66, 67, 68, 69, 70, 71, 72, 73, 74, 75, 76, 77, 78, 79, 80, 81, 82, 83, 84, 85, 86, 87, 88, 89, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99, 100 o más aminoácidos unidos mediante enlaces peptídicos. Los péptidos contienen normalmente conformaciones aleatorias y/o flexibles, tales como enrollamientos aleatorios; y normalmente carecen de conformaciones estables, tales como las observadas en proteínas/polipéptidos más grande, normalmente mediante estructuras secundarias y terciarias. En realizaciones particulares, en el presente documento se contemplan numerosos intervalos de tamaño de péptidos, tales como desde aproximadamente: 3-90, 3-80, 3-70, 3-60, 3-50; 5-90, 5-80, 5-70, 5-60, 5-50, 5-40, 5-30; 10-90, 10-80, 10-70, 10-60, 10-50, 10-40, 10-30; 10-20 aminoácidos de longitud, y similares. En realizaciones adicionales, los péptidos usados en el presente documento no tienen más de 100, 90, 80, 70, 60, 50, 40, 30 ó 20 aminoácidos de longitud. Pueden generarse péptidos a modo de ejemplo mediante cualquiera de los métodos expuestos en el presente documento, tal como portarse en un biblioteca de péptidos (por ejemplo, una biblioteca de presentación en fagos), generarse mediante síntesis química, derivarse mediante digestión de proteínas, o generarse usando técnicas de ADN recombinante. Los péptidos incluyen la forma D y L, ya sea purificadas o en una mezcla de las dos formas.

Adicionalmente, también se contemplan sales fisiológicamente aceptables de los compuestos de esta invención. Por “sales fisiológicamente aceptables” quiere decirse cualquier sal que se sabe o se descubre posteriormente que es farmacéuticamente aceptable. Algunos ejemplos específicos son: acetato; trifluoroacetato; hidroháluros, tales como clorhidrato y bromhidrato; sulfato; citrato; tartrato; glicolato; y oxalato.

El término “aleatorizado” tal como se usa para hacer referencia a secuencias peptídicas se refiere a secuencias totalmente aleatorias (por ejemplo, seleccionadas mediante métodos de presentación en fagos) y secuencias en las que uno o más residuos de una molécula que se produce de manera natural se sustituye por un residuo de aminoácido que no aparece en esa posición en la molécula que se produce de manera natural. Los métodos a modo de ejemplo para identificar secuencias peptídicas incluyen presentación en fagos, presentación en *E. coli*, presentación en ribosoma, exploración basada en levadura, exploración de ARN-péptido, exploración química, diseño racional, análisis estructural de proteínas, y similares.

El término “farmacológicamente activo” significa que se determina que una sustancia descrita de ese modo tiene actividad que afecta a un parámetro médico (por ejemplo, pero sin limitarse a, tensión arterial, recuento de células sanguíneas, nivel de colesterol) o estado patológico (por ejemplo, pero sin limitarse a, cáncer, trastornos autoinmunitarios). Por tanto, los péptidos farmacológicamente activos comprenden péptidos agonistas o miméticos y antagonistas tal como se define a continuación.

Los términos “péptido mimético” y “péptido agonista” se refieren a un péptido que tiene actividad biológica

comparable a una proteína (por ejemplo, pero sin limitarse a, EPO, TPO, G-CSF y otras proteínas descritas en el presente documento) que interacciona con una proteína de interés. Estos términos incluyen además péptidos que imitan indirectamente la actividad de una proteína de interés, tal como potenciando los efectos del ligando natural de la proteína de interés; véanse, por ejemplo, los péptidos miméticos de G-CSF indicados en las tablas 2 y 7. Como ejemplo, el término “péptido mimético de EPO” comprende cualquier péptido que puede identificarse o derivarse tal como se describe en Wrighton *et al.* (1996), *Science* 273: 458-63, Naranda *et al.* (1999), *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 7569-74, o cualquier otra referencia en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre compuestos miméticos de EPO. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los realmente dados a conocer en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

Como otro ejemplo, el término “péptido mimético de TPO” o “TMP” se refiere a péptidos que pueden identificarse o derivarse tal como se describe en Cwirla *et al.* (1997), *Science* 276: 1696-9, patentes estadounidenses n.^{os} 5.869.451 y 5.932.946 y cualquier otra referencia en la tabla 2 identificada como que tiene contenido sobre compuestos miméticos de TPO, así como la solicitud internacional WO 00/24770 publicada el 4 de mayo de 2000. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

Como otro ejemplo, el término “péptido mimético de G-CSF” se refiere a cualquier péptido que puede identificarse o describirse en Paukovits *et al.* (1984), *Hoppe-Seylers Z. Physiol. Chem.* 365: 303-11 o cualquiera de las referencias en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre compuestos miméticos de G-CSF. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término “péptido mimético de CTLA4” se refiere a cualquier péptido que puede identificarse o derivarse tal como se describe en Fukumoto *et al.* (1998), *Nature Biotech.* 16: 267-70. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en la misma siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término “péptido antagonista” o “péptido inhibidor” se refiere a un péptido que bloquea o interfiere de alguna manera con la actividad biológica de la proteína asociada de interés, o tiene actividad biológica comparable a un antagonista o inhibidor conocido de la proteína asociada de interés. Por tanto, el término “péptido antagonista de TNF” comprende péptidos que pueden identificarse o derivarse tal como se describe en Takasaki *et al.* (1997), *Nature Biotech.* 15: 1266-70 o cualquiera de las referencias en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre antagonistas de TNF. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

Los términos “antagonista de IL-1” y “péptido mimético de IL-1ra” se refieren a péptidos que inhiben o regulan por disminución la activación del receptor de IL-1 mediante IL-1. La activación del receptor de IL-1 resulta de la formación de un complejo entre IL-1, receptor de IL-1 y proteína accesoria del receptor de IL-1. El antagonista de IL-1 o péptidos miméticos de IL-1ra se unen a IL-1, receptor de IL-1 o proteína accesoria del receptor de IL-1 y obstruyen la formación de complejo entre dos cualesquiera o tres componentes del complejo. Pueden identificarse o derivarse antagonista de IL-1 o péptidos miméticos de IL-1ra a modo de ejemplo tal como se describe en las patentes estadounidenses n.^{os} 5.608.035, 5.786.331, 5.880.096; o cualquiera de las referencias en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre compuestos miméticos de IL-1ra o antagonistas de IL-1. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término “péptido antagonista de VEGF” se refiere a péptidos que pueden identificarse o derivarse tal como se describe en Fairbrother (1998), *Biochem.* 37: 17754-64, y en cualquiera de las referencias en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre antagonistas de VEGF. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término “péptido inhibidor de MMP” se refiere a péptidos que pueden identificarse o derivarse tal como se describe en Koivunen (1999), *Nature Biotech.* 17: 768-74 y en cualquiera de las referencias en la tabla 2 que se identifica que tiene contenido sobre inhibidores de MMP. Los expertos habituales en la técnica aprecian que cada una de estas referencias permite seleccionar péptidos diferentes de los dados a conocer realmente en las mismas siguiendo los procedimientos dados a conocer con diferentes bibliotecas de péptidos.

El término “péptido inhibidor de miostatina” se refiere a péptidos que pueden identificarse mediante su capacidad para reducir o bloquear la actividad de miostatina o señalización tal como se demuestra en ensayos *in vitro* tales como, por ejemplo, el ensayo de actividad de miostatina basado en células pMARE C2C12 o mediante pruebas con

animales *in vivo* tal como se describe en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US20040181033A1 y la publicación de solicitud PCT n.º W02004/058988. En las tablas 21-24 se exponen péptidos inhibidores de miostatina a modo de ejemplo.

5 El término “antagonista de integrina/adhesión” se refiere a péptidos que inhiben o regulan por disminución la actividad de integrinas, selectinas, moléculas de adhesión celular, receptores de integrina, receptores de selectina, o receptores de moléculas de adhesión celular. Los antagonistas de integrina/adhesión a modo de ejemplo comprenden laminina, equistatina, los péptidos descritos en las tablas 25-28.

10 El término “inhibidor de la resorción ósea” se refiere a moléculas tal como se determinan mediante los ensayos de los ejemplos 4 y 11 del documento WO 97/23614. Los inhibidores de la resorción ósea a modo de ejemplo incluyen anticuerpo frente a OPG y OPG-L, que se describen en los documentos WO 97/23614 y W098/46751, respectivamente.

El término “inhibidor del factor de crecimiento nervioso” o “agonista del factor de crecimiento nervioso” se refiere a un péptido que se une a, e inhibe, la actividad o señalización de factor de crecimiento nervioso (NGF). En la tabla 29 se exponen péptidos a modo de ejemplo de este tipo.

15 El término “dominio de modulación de TALL-1” se refiere a cualquier secuencia de aminoácidos que se une a TALL-1 y comprende secuencias que se producen de manera natural o secuencias aleatorizadas. Pueden identificarse o derivarse dominios de modulación de TALL-1 a modo de ejemplo mediante presentación en fagos u otros métodos mencionados en el presente documento. En las tablas 30 y 31 se exponen péptidos a modo de ejemplo de este tipo.

20 El término “antagonista de TALL-1” se refiere a una molécula que se une a TALL-1 y aumenta o disminuye uno o más parámetros de ensayo de manera opuesta al efecto de TALL-1 nativo de longitud completa sobre esos parámetros. Tal actividad puede determinarse, por ejemplo, mediante ensayos tales como los descritos en la subsección titulada “Actividad biológica de AGP-3” en la sección de materiales y métodos de la solicitud de patente titulada “TNF-RELATED PROTEINS”, WO 00/47740, publicada el 17 de agosto de 2000.

25 El término “péptido antagonista de Ang 2” se refiere a péptidos que pueden identificarse o derivarse como que tienen características antagonistas de Ang-2. En las tablas 32-38 se exponen péptidos a modo de ejemplo de este tipo.

El término “WSP” se refiere a un polímero soluble en agua que impide que un péptido, proteína u otro compuesto al que está unido precipite en un entorno acuoso, tal como, a modo de ejemplo, un entorno fisiológico. A continuación se presenta una descripción más detallada de diversas realizaciones de WSP contempladas por la invención.

Liofilización y administración

30 Los pepticuerpos terapéuticos son útiles en formulaciones farmacéuticas con el fin de tratar enfermedades en seres humanos tal como se describe en el presente documento. En una realización, las composiciones de pepticuerpos terapéuticos están liofilizadas. La liofilización se lleva a cabo usando técnicas comunes en la técnica y deben optimizarse para la composición que está desarrollándose [Tang *et al.*, Pharm Res. 21:191-200, (2004) y Chang *et al.*, Pharm Res. 13:243-9 (1996)].

35 Un ciclo de liofilización está compuesto, en un aspecto, por tres etapas: congelación, secado primario y secado secundario [A.P. Mackenzie, Phil Trans R Soc London, Ser B, Biol 278:167 (1977)]. En la etapa de congelación, se enfría la disolución para iniciar la formación de hielo. Además, esta etapa induce la cristalización del agente de carga. El hielo se sublima en la etapa de secado primario, que se realiza reduciendo la presión de la cámara por debajo de la presión de vapor del hielo, usando un vacío e introduciendo calor para fomentar la sublimación. Finalmente, se elimina el agua adsorbida o unida en la etapa de secado secundario a una presión de cámara reducida y a una temperatura de almacenamiento elevada. El procedimiento produce un material conocido como torta liofilizada. Posteriormente, puede reconstituirse la torta o bien con agua estéril o bien con diluyente para inyección adecuado.

40 El ciclo de liofilización no sólo determina el estado físico final de los excipientes sino que también afecta a otros parámetros tales como el tiempo de reconstitución, aspecto, estabilidad y contenido en humedad final. La estructura de la composición en el estado congelado pasa por varias transiciones (por ejemplo, transiciones vítreas, humectaciones y cristalizaciones) que se producen a temperaturas específicas y pueden usarse para entender y optimizar el procedimiento de liofilización. La temperatura de transición vítrea (Tg y/o Tg') puede proporcionar información sobre el estado físico de un soluto y puede determinarse mediante calorimetría diferencial de barrido (DSC). Tg y Tg' son un parámetro importante que debe tenerse en cuenta cuando se diseña el ciclo de liofilización. Por ejemplo, Tg' es importante para el secado primario. Además, en el estado secado, la temperatura de transición vítrea proporciona información sobre la temperatura de almacenamiento del producto final.

Excipientes en general

55 Los excipientes son aditivos que se incluyen en una formulación o bien porque confieren o bien porque potencian la estabilidad, administración y facilidad de fabricación de un producto terminado. Independientemente del motivo para

su inclusión, los excipientes son un componente integral de un producto terminado y por tanto se necesita que sean seguros y se toleren bien por los pacientes. Para fármacos de proteínas, la elección de excipientes es particularmente importante porque pueden afectar tanto a la eficacia como a la inmunogenicidad del fármaco. Por tanto, se necesita desarrollar formulaciones de proteínas con una selección apropiada de excipientes que proporcionan estabilidad, seguridad y comerciabilidad adecuadas.

Una formulación liofilizada está compuesta habitualmente por un tampón, un agente de carga y un estabilizador. La utilidad de un tensioactivo puede evaluarse y seleccionarse en casos en los que la agregación durante la etapa de liofilización o durante la reconstitución llega a ser un problema. Se incluye un agente tamponante apropiado para mantener la formulación dentro de zonas estables de pH durante la liofilización. En la tabla A se proporciona una comparación de los componentes excipientes en formulaciones de proteínas líquidas y liofilizadas.

Tabla A: Componentes excipientes de formulaciones de proteínas liofilizadas

Componente excipiente	Función en la formulación liofilizada
Tampón	<ul style="list-style-type: none"> ○ Mantener el pH de la formulación durante la liofilización y tras la reconstitución
Agente de tonicidad / estabilizador	<ul style="list-style-type: none"> ○ Los estabilizadores incluyen crioprotectores y lioprotectores ○ Los ejemplos incluyen polioles, azúcares y polímeros ○ Los crioprotectores protegen a las proteínas frente a estreses de congelación ○ Los lioprotectores estabilizan las proteínas en el estado seco por congelación
Agente de carga	<ul style="list-style-type: none"> ○ Usado para potenciar la elegancia del producto y para prevenir reventones ○ Proporciona resistencia estructural a la torta de liofilización ○ Los ejemplos incluyen manitol y glicina
Tensioactivo	<ul style="list-style-type: none"> ○ Empleado si la agregación durante el procedimiento de liofilización es un problema ○ Puede servir para reducir los tiempos de reconstitución ○ Los ejemplos incluyen polisorbato 20 y 80
Antioxidante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Habitualmente no se emplea, las reacciones moleculares en la torta de liofilización se retardan en gran medida
Iones de metales/agente quelante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Puede incluirse si se incluye un ion de metal específico sólo como cofactor o cuando se requiere el metal para la actividad proteasa ○ Generalmente no se necesitan agentes quelantes en formulaciones de liofilización
Conservante	<ul style="list-style-type: none"> ○ Únicamente para formulaciones de múltiples dosis ○ Proporciona protección frente al crecimiento microbiano en la formulación ○ Se incluye habitualmente en el diluyente de reconstitución (por ejemplo, bWFI)

El principal desafío en el desarrollo de formulaciones para proteínas terapéuticas es estabilizar el producto frente a los estreses de fabricación, envío y almacenamiento. El papel de los excipientes de formulación es proporcionar estabilización frente a estos estreses. También pueden emplearse excipientes para reducir la viscosidad de formulaciones de proteínas con alta concentración con el fin de permitir su administración y potenciar la conveniencia para los pacientes. En general, pueden clasificarse excipientes basándose en los mecanismos mediante los cuales estabilizan proteínas frente a diversos estreses químicos y físicos. Algunos excipientes se usan para aliviar los efectos de un estrés específico o para regular una propensión particular de una proteína específica. Otros excipientes tienen efectos más generales sobre las estabilidades físicas y covalentes de proteínas. Los excipientes descritos en el presente documento se organizan o bien por su tipo químico o bien por su papel funcional en las formulaciones. Se proporcionan breves descripciones de los modos de estabilización cuando se comenta cada tipo de excipiente.

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o intervalo de excipiente puede incluirse en cualquier formulación particular para obtener una formulación biofarmacéutica de la invención que fomente la retención de la estabilidad del producto biofarmacéutico. Por ejemplo, la cantidad y el tipo de una sal que va a incluirse en una formulación biofarmacéutica de la invención puede seleccionarse basándose en la osmolalidad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la disolución final así como las cantidades y osmolalidad de los otros componentes que van a incluirse en la formulación. De manera similar, mostrando a modo de ejemplo con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de un excipiente de este tipo dependerá de su osmolalidad.

A modo de ejemplo, la inclusión de sorbitol a aproximadamente el 5% puede lograr isotonicidad mientras que se necesita aproximadamente el 9% de un excipiente de sacarosa para lograr isotonicidad. La selección de la cantidad

o el intervalo de concentraciones de uno o más excipientes que pueden incluirse dentro de una formulación biofarmacéutica de la invención se han mostrado a modo de ejemplo anteriormente mediante referencia a sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en el presente documento y mostradas adicionalmente a modo de ejemplo mediante referencia a excipientes específicos pueden aplicarse igualmente a todos los tipos y combinaciones de excipientes incluyendo, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizadores, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones de metales, agentes quelantes y/o conservantes.

Además, cuando se notifica un excipiente particular en una formulación, por ejemplo, mediante el porcentaje (%) p/v, los expertos en la técnica reconocerán que también se contempla la concentración molar equivalente de ese excipiente.

Evidentemente, un experto habitual en la técnica reconocerá que las concentraciones de los excipientes mencionados anteriormente comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente de carga puede reducirse cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de proteína/péptido o cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto habitual en la técnica reconocerá que, con el fin de mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay ningún agente de carga, la concentración de un agente estabilizante se ajustará en consecuencia (es decir, se usará una cantidad "tonificante" de estabilizador). En la técnica se conocen otros excipientes y pueden encontrarse en Powell *et al.*, Compendium of Excipients for Parenteral Formulations (1998), PDA J. Pharm. Sci. Technology, 52:238-311.

Tampones

Habitualmente se observa que la estabilidad de un fármaco de proteína es máxima en un intervalo de pH estrecho. Se necesita identificar este intervalo de pH de estabilidad óptima de manera temprana durante estudios previos a la formulación. Se ha demostrado que diversos enfoques, tales como estudios de estabilidad acelerada y estudios de barrido calorimétrico, son útiles en esta tarea (Remmele R.L. Jr., *et al.*, Biochemistry, 38(16):52417-7 (1999)). Una vez finalizada una formulación, el producto terminado debe fabricarse y mantenerse dentro de unas especificaciones predefinidas a lo largo de toda su vida útil de almacenamiento. Por tanto, casi siempre se emplean agentes tamponantes para controlar el pH en la formulación.

Se han empleado ácidos orgánicos, fosfatos y Tris de manera rutinaria como tampones en formulaciones de proteínas (tabla B). La capacidad tamponante de la especie tamponante es máxima a un pH igual al pKa y disminuye a medida que el pH aumenta o disminuye alejándose de este valor. El noventa por ciento de la capacidad tamponante existe dentro del intervalo de una unidad de pH con respecto a su pKa. La capacidad tamponante también aumenta proporcionalmente al aumentar la concentración de tampón.

Se necesita tener en cuenta diversos factores cuando se elige un tampón. Antes que nada, se necesita definir la especie tamponante y su concentración basándose en su pKa y el pH de formulación deseado. Resulta igual de importante garantizar que el tampón es compatible con el fármaco de proteína, otros excipientes de formulación, y no cataliza ninguna reacción de degradación. Recientemente, se ha mostrado que tampones de carboxilato polianiónicos tales como citrato y succinato forman aductos covalentes con los residuos de cadena lateral de proteínas. Un tercer aspecto importante que debe tenerse en cuenta es la sensación de escozor e irritación que puede inducir el tampón. Por ejemplo, se sabe que el citrato provoca escozor tras la inyección (Laursen T, *et al.*, Basic Clin Pharmacol Toxicol., 98(2): 218-21 (2006)). La posibilidad de escozor e irritación es mayor para fármacos que se administran por las vías s.c. o i.m., en las que la disolución de fármaco permanece en el sitio durante un periodo de tiempo relativamente más largo que cuando se administran por la vía i.v. en la que la formulación se diluye rápidamente en la sangre tras la administración. Para formulaciones que se administran mediante infusión i.v. directa, se necesita monitorizar la cantidad total de tampón (y cualquier otro componente de formulación). Debe tenerse cuidado particular con respecto a los iones potasio administrados en forma de tampón de fosfato de potasio, que pueden inducir efectos cardiovasculares en un paciente (Hollander-Rodriguez JC, *et al.*, Am. Fam. Physician., 73(2): 283-90 (2006)).

Los tampones para formulaciones liofilizadas necesitan consideración adicional. Algunos tampones tales como fosfato de sodio pueden separarse por cristalización de la fase amorfa de proteína durante la congelación, dando como resultado desplazamientos del pH bastante grandes. Otros tampones comunes tales como acetato e imidazol deben evitarse ya que pueden sublimarse o evaporarse durante el procedimiento de liofilización, desplazando así el pH de la formulación durante la liofilización o tras la reconstitución.

Tabla B: Agentes tamponantes usados comúnmente y sus valores de pKa

Tampón	pKa	Producto terminado de ejemplo
Acetato	4,8	Neupogen, Neulasta
Succinato	pKa ₁ = 4,8, pKa ₂ = 5,5	Actimmune
Citrato	pKa ₁ = 3,1, pKa ₂ = 4,8, PKa ₃ = 6,4	Humira
Histidina (imidazol)	6,0	Xolair

fosfato	$pK_{a1} = 2,15$, $pK_{a2} = 7,2$, $PK_{a3} = 12,3$	Enbrel (formulación líquida)
Tris	8,1	Leukine

El sistema de tampón presente en las composiciones se selecciona para ser fisiológicamente compatible y para mantener un pH deseado en la disolución reconstituida así como en la disolución antes de la liofilización. Tal como se describe en el presente documento, el pH de la disolución antes de la liofilización puede ser de entre pH 2,0 y pH 12,0. Por ejemplo, el pH de la disolución antes de la liofilización puede ser de 2,0, 2,3, 2,5, 2,7, 3,0, 3,3, 3,5, 3,7, 4,0, 4,3, 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7, 9,0, 9,3, 9,5, 9,7, 10,0, 10,3, 10,5, 10,7, 11,0, 11,3, 11,5, 11,7 ó 12,0. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el pH de la disolución reconstituida puede ser de entre 4,5 y 9,0. Por ejemplo, el pH en la disolución reconstituida puede ser de 4,5, 4,7, 5,0, 5,3, 5,5, 5,7, 6,0, 6,3, 6,5, 6,7, 7,0, 7,3, 7,5, 7,7, 8,0, 8,3, 8,5, 8,7 ó 9,0.

Tal como se describe en el presente documento, el agente tamponante del pH usado en la formulación puede ser un aminoácido o una mezcla de aminoácidos. En un aspecto, el agente tamponante del pH es histidina o una mezcla de aminoácidos uno de los cuales es histidina.

El compuesto tamponante del pH puede estar presente en cualquier cantidad adecuada para mantener el pH de la formulación a un nivel predeterminado. Tal como se describe en el presente documento, cuando el agente tamponante del pH es un aminoácido, la concentración del aminoácido puede ser de entre 0,1 mM y 1000 mM (1 M). Por ejemplo, la concentración del agente tamponante del pH puede ser de al menos 0,1, 0,5, 0,7, 0,8, 0,9, 1,0, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 200, 500, 700 ó 900 mM, o puede ser de entre 1, 1,2, 1,5, 1,7, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 ó 90 mM y 100 mM. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la concentración del agente tamponante del pH puede ser de entre 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 30 ó 40 mM y 50 mM. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la concentración del agente tamponante del pH puede ser de 10 mM.

Otros agentes tamponantes del pH a modo de ejemplo usados para tamponar la formulación tal como se expone en el presente documento incluyen, pero no se limitan a, glicina, histidina, glutamato, succinato, fosfato, acetato y aspartato.

Estabilizadores y agentes de carga

Normalmente se usan agentes de carga en formulaciones liofilizadas para potenciar la elegancia del producto y prevenir reventones. Las condiciones en la formulación se diseñan generalmente de modo que el agente de carga se separa por cristalización de la fase amorfa congelada (o bien durante la congelación o bien el templado por encima de la T_g) dando a la torta estructura y volumen. Manitol y glicina son ejemplos de agentes de carga comúnmente usados.

Los estabilizadores incluyen una clase de compuestos que pueden servir como crioprotectores, lioprotectores y agentes de formación vítrea. Los crioprotectores actúan para estabilizar proteínas durante la congelación o en el estado congelado a bajas temperaturas (P. Cameron, ed., Good Pharmaceutical Freeze-Drying Practice, Interpharm Press, Inc., Buffalo Grove, IL, (1997)). Los lioprotectores estabilizan proteínas en la forma de dosificación sólida secada por congelación mediante la conservación de las propiedades conformacionales similares a las nativas de la proteína durante etapas de deshidratación del secado por congelación. Las propiedades de estado vítreo se han clasificado como "fuertes" o "frágiles" dependiendo de sus propiedades de relajación en función de la temperatura. Resulta importante que los crioprotectores, lioprotectores y agentes de formación vítrea permanezcan en la misma fase que la proteína con el fin de conferir estabilidad. Los azúcares, polímeros y polioles se encuentran dentro de esta categoría y algunas veces pueden desempeñar los tres papeles.

Los polioles abarcan una clase de excipientes que incluye azúcares (por ejemplo, manitol, sacarosa, sorbitol) y otros alcoholes polihidroxilados (por ejemplo, glicerol y propilenglicol). El polímero polietilenglicol (PEG) se incluye en esta categoría. Los polioles se usan comúnmente como agentes de isotonicidad y/o excipientes estabilizantes en formulaciones de proteínas parenterales tanto líquidas como liofilizadas. Con respecto a la serie de Hofmeister, los polioles son cosmótopos y se excluyen preferiblemente de la superficie de la proteína. Los polioles pueden proteger las proteínas frente a rutas de degradación tanto físicas como químicas. Los codisolventes preferiblemente excluidos aumentan la tensión superficial efectiva del disolvente en la superficie de contacto de la proteína mediante lo cual las conformaciones de proteínas energéticamente más favorables son aquellas con las menores áreas superficiales.

El manitol es un agente de carga popular en formulaciones liofilizadas porque se separa por cristalización de la fase de proteína amorfa durante el secado por congelación proporcionando estabilidad estructural a la torta (por ejemplo Leukine®, Enbrel®-Lyo, Betaseron®). Se usa generalmente en combinación con un crio y/o lioprotector tal como sacarosa. Debido a la propensión de manitol a cristalizar en condiciones congeladas, el sorbitol y la sacarosa son los agentes de tonicidad/estabilizadores preferidos en formulaciones líquidas para proteger el producto frente a estreses de congelación-descongelación encontrados durante el transporte o cuando se congelan a granel antes de la fabricación. El sorbitol y la sacarosa son mucho más resistentes a la cristalización y por tanto es menos probable que experimenten separación de fases con respecto a la proteína. Resulta interesante observar que, aunque se ha

usado manitol en cantidades tonificantes en varias formulaciones líquidas comercializadas tales como Actimmune®, Forteo® y Rebif®, las etiquetas de producto de estos fármacos presentan una advertencia de “no congelar”. Debe evitarse el uso de azúcares reductores (que contienen grupos cetona o aldehído libre) tales como glucosa y lactosa porque pueden reaccionar y glicar residuos de lisina y arginina en la superficie de proteínas mediante reacción de Maillard de aldehídos y aminos primarias (Chevalier F, *et al.*, *Nahrung*, 46(2): 58-63 (2002); Humeny A, *et al.*, *J Agric Food Chem.* 50(7): 2153-60 (2002)). La sacarosa puede hidrolizarse para dar fructosa y glucosa en condiciones ácidas (Kautz C. F. y Robinson A. L., *JACS*, 50(4) 1022-30 (1928)), y por consiguiente puede provocar glicación.

El polímero polietilenglicol (PEG) puede estabilizar proteínas mediante dos mecanismos diferentes dependientes de la temperatura. A temperaturas inferiores, se excluye preferiblemente de la superficie de la proteína, pero se ha mostrado que interactúa con la forma no plegada de la proteína a una temperatura superior dada su naturaleza anfipática (Lee L.L. y Lee J.C., *Biochemistry*, 26(24): 7813-9 (1987)). Por tanto a temperaturas inferiores puede proteger proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial, pero a temperaturas superiores posiblemente reduciendo el número de colisiones productivas entre moléculas no plegadas. PEG también es un crioprotector y se ha empleado en Recombinate®, una formulación liofilizada de factor antihemofílico recombinante, que usa PEG 3350 a una concentración de 1,5 mg/ml. Los PEG líquidos de bajo peso molecular (PEG 300 - 600) pueden contaminarse con peróxidos y provocar la oxidación de proteínas. Si se usan, el contenido en peróxido en el material de partida debe minimizarse y controlarse a lo largo de su vida útil de almacenamiento. Lo mismo es cierto para los polisorbatos.

Se añade un estabilizador (o una combinación de estabilizadores) a la formulación de liofilización para prevenir o reducir la degradación química y la agregación inducida por liofilización o inducida por almacenamiento. Una disolución nublada o turbia tras la reconstitución indica que la proteína ha precipitado. El término “estabilizador” significa un excipiente que puede prevenir la agregación u otra degradación física, así como degradación química (por ejemplo, autólisis, desamidación, oxidación, etc.) en un estado acuoso y sólido. Los estabilizadores que se emplean convencionalmente en composiciones farmacéuticas incluyen, pero no se limitan a, sacarosa, trehalosa, manosa, maltosa, lactosa, glucosa, rafinosa, celobiosa, gentiobiosa, isomaltosa, arabinosa, glucosamina, fructosa, manitol, sorbitol, glicina, HCl de arginina, compuestos polihidroxilados, incluyendo polisacáridos tales como dextrano, almidón, hidroxietil-almidón, ciclodextrinas, N-metil-pirolideno, celulosa y ácido hialurónico, cloruro de sodio, [Carpenter *et al.*, *Develop. Biol. Standard* 74:225, (1991)]. Tal como se describe en el presente documento, el estabilizador puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 40% p/v. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el estabilizador puede incorporarse en una concentración de al menos el 0,5, el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9, el 10, el 11, el 12, el 13, el 14, el 15, el 16, el 17, el 18, el 19, el 20, el 30 o el 40% p/v, o puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 1, el 2, el 3, el 4, el 5, el 6, el 7, el 8, el 9% a aproximadamente el 10% p/v. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el estabilizador puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 2% a aproximadamente el 4% p/v. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el estabilizador puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 2% p/v.

Si se desea, las composiciones liofilizadas también incluyen cantidades apropiadas de agentes de carga y de regulación de la osmolaridad adecuados para formar una “torta” liofilizada. Los agentes de carga pueden ser o bien cristalinos (por ejemplo, manitol, glicina) o bien amorfos (por ejemplo, sacarosa, polímeros tales como dextrano, polivinilpirrolidona, carboximetilcelulosa). Otros agentes de carga a modo de ejemplo incluyen lactosa, sorbitol, trehalosa o xilitol. En la presente invención, el agente de carga es manitol. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el agente de carga puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 10% p/v, o puede incorporarse en una concentración de al menos el 0,2, el 0,5, el 0,7, el 1,0, el 1,5, el 2,0, el 2,5, el 3,0, el 3,5, el 4,0, el 4,5, el 5,0, el 5,5, el 6,0, el 6,5, el 7,0, el 7,5, el 8,0, el 8,5, el 9,0 o el 9,5% p/v. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, el agente de carga puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 1, el 1,5, el 2,0, el 2,5, el 3,0, el 3,5, el 4,0, el 4,5% al 5,0% p/v, para producir una torta elegante y mecánica y farmacéuticamente estable. Tal como se describe adicionalmente en el presente documento, la concentración de manitol puede ser del 4% p/v.

Tensioactivos

Las moléculas de proteínas tienen una alta propensión a interactuar con superficies haciéndolas propensas a adsorción y desnaturalización en superficies de contacto de aire-líquido, vial-líquido y líquido-líquido (aceite de silicona). Se ha observado que esta ruta de degradación es inversamente dependiente de la concentración de proteína y da como resultado o bien la formación de agregados de proteínas solubles e insolubles o bien la pérdida de proteína de la disolución mediante adsorción en las superficies. Además de la adsorción en la superficie del recipiente, la degradación inducida por la superficie se agrava con la agitación física, tal como se experimentará durante el envío y la manipulación del producto.

Los tensioactivos se usan comúnmente en formulaciones de proteínas para prevenir la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos son moléculas anfipáticas con la capacidad de superar por competencia a las proteínas por las posiciones en las superficies de contacto. Las partes hidrófobas de las moléculas de tensioactivo ocupan posiciones en las superficies de contacto (por ejemplo, aire/líquido), mientras que las partes hidrófilas de las moléculas permanecen orientadas hacia el volumen de disolvente. A concentraciones suficientes (normalmente

alrededor de la concentración micelar crítica del detergente), una capa de superficie de moléculas de tensioactivo sirve para prevenir que las moléculas de proteína se adsorban en la superficie de contacto. De ese modo, se minimiza la degradación inducida por la superficie. Los tensioactivos más comúnmente usados son ésteres de ácidos grasos de polietoxilatos de sorbitano, es decir polisorbato 20 y polisorbato 80 (por ejemplo, Avonex®, Neupogen®, Neulasta®). Los dos sólo se diferencian en la longitud de la cadena alifática que confiere carácter hidrófobo a las moléculas, C-12 y C-18, respectivamente. Por consiguiente, el polisorbato 80 es más activo en superficie y tiene una menor concentración micelar crítica que polisorbato 20. El tensioactivo poloxámero 188 también se ha usado en diversos productos líquidos comercializados tales como Gonal-F®, Norditropin® y Ovidrel®.

Los detergentes también pueden afectar a la estabilidad conformacional termodinámica de proteínas. Una vez más, los efectos de un excipiente dado serán específicos para la proteína. Por ejemplo, se ha mostrado que los polisorbatos reducen la estabilidad de algunas proteínas y aumentan la estabilidad de otras. La desestabilización de proteínas por detergente puede razonarse en cuanto a las colas hidrófobas de las moléculas de detergente que pueden participar en la unión específica con estados de proteínas parcial o totalmente plegados. Estos tipos de interacciones pueden provocar un desplazamiento en el equilibrio conformacional hacia los estados de proteínas más expandidos (es decir aumentando la exposición de partes hidrófobas de la molécula de proteína como complemento al polisorbato de unión). Alternativamente, si el estado nativo de la proteína muestra algunas superficies hidrófobas, la unión de detergente al estado nativo puede estabilizar esa conformación.

Otro aspecto de los polisorbatos es que son inherentemente propensos a degradación oxidativa. Con frecuencia, como materias primas, contienen cantidades suficientes de peróxidos para provocar la oxidación de cadenas laterales de residuos de proteínas, especialmente metionina. La posibilidad de daño oxidativo que surge de la adición de estabilizador enfatiza el punto de que deben usarse las concentraciones eficaces más bajas de excipientes en formulaciones. Para tensioactivos, la concentración eficaz para una proteína dada dependerá del mecanismo de estabilización. Se ha postulado que si el mecanismo de estabilización de tensioactivo está relacionado con prevenir la desnaturalización en superficie, la concentración eficaz será aproximadamente la concentración micelar crítica del detergente. A la inversa, si el mecanismo de estabilización está asociado con interacciones proteína-detergente específicas, la concentración de tensioactivo eficaz estará relacionada con la concentración de proteína y la estequiometría de la interacción (Randolph T.W., *et al.*, Pharm Biotechnol., 13:159-75 (2002)).

También pueden añadirse tensioactivos en cantidades apropiadas para prevenir el fenómeno de agregación relacionado con la superficie durante la congelación y el secado [Chang, B, J. Pharm. Sci. 85:1325, (1996)]. Los tensioactivos a modo de ejemplo incluyen tensioactivos aniónicos, catiónicos, no iónicos, zwitteriónicos y anfóteros, incluyendo tensioactivos derivados de aminoácidos que se producen de manera natural. Los tensioactivos aniónicos incluyen, pero no se limitan a, laurilsulfato de sodio, dioctilsulfosuccinato de sodio y dioctilsulfonato de sodio, ácido quenodesoxicólico, sal de sodio de N-lauroilsarcosina, dodecilsulfato de litio, sal de sodio de ácido 1-octanosulfónico, quelato de sodio hidratado, desoxicolato de sodio, y sal de sodio de ácido glicodesoxicólico. Los tensioactivos catiónicos incluyen, pero no se limitan a, cloruro de benzalconio o cloruro de bencetonio, cloruro de cetilpiridinio monohidratado, y bromuro de hexadeciltrimetilamonio. Los tensioactivos zwitteriónicos incluyen, pero no se limitan a, CHAPS, CHAPSO, SB3-10 y SB3-12. Los tensioactivos no iónicos incluyen, pero no se limitan a, digitonina, Triton X-100, Triton X-114, TWEEN-20 y TWEEN-80. Los tensioactivos también incluyen lauromacrogol 400, estearato de polioxilo 40, aceite de ricino hidrogenado con polioxietileno 10, 40, 50 y 60, monoesterato de glicerol, polisorbato 40, 60, 65 y 80, lecitina de soja y otros fosfolípidos tales como DOPC, DMPG, DMPC y DOPG; éster de ácido graso de sacarosa, metilcelulosa y carboximetilcelulosa. Las composiciones pueden comprender estos tensioactivos o bien individualmente o bien como una mezcla en diferentes razones. El tensioactivo puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0% a aproximadamente el 5% p/v, o puede incorporarse en una concentración de al menos el 0,001, el 0,002, el 0,005, el 0,007, el 0,01, el 0,05, el 0,1, el 0,2, el 0,3, el 0,4, el 0,5, el 0,6, el 0,7, el 0,8, el 0,9, el 1,0, el 1,5, el 2,0, el 2,5, el 3,0, el 3,5, el 4,0 o el 4,5% p/v. Específicamente, el tensioactivo puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0,001% a aproximadamente el 0,5% p/v, o puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0,004, el 0,005, el 0,007, el 0,01, el 0,05 o el 0,1% p/v a aproximadamente el 0,2% p/v. Más específicamente, el tensioactivo puede incorporarse en una concentración de aproximadamente el 0,01% a aproximadamente el 0,1% p/v.

Sales

Con frecuencia se añaden sales para aumentar la fuerza iónica de la formulación, lo que puede ser importante para la solubilidad, estabilidad física e isotonicidad de la proteína. Las sales pueden afectar a la estabilidad física de proteínas de una variedad de maneras. Los iones pueden estabilizar el estado nativo de proteínas mediante unión a residuos con carga en la superficie de la proteína. Alternativamente, pueden estabilizar el estado desnaturalizado mediante unión a los grupos peptídicos a lo largo de la estructura principal de la proteína (-CONH-). Las sales también pueden estabilizar la conformación nativa de la proteína blindando interacciones electrostáticas de repulsión entre residuos dentro de una molécula de proteína. Los electrolitos en formulaciones de proteínas también pueden blindar interacciones electrostáticas de atracción entre moléculas de proteínas que pueden conducir a insolubilidad y agregación de proteínas.

El efecto de la sal sobre la estabilidad y solubilidad de proteínas varía significativamente con las características de la

especie iónica. La serie de Hofmeister se originó en la década de 1880 como una manera de clasificar en orden los electrolitos basándose en su capacidad para precipitar proteínas (Cacace M.G., *et al.*, Quarterly Reviews of Biophysics., 30(3): 241-277 (1997)). En este informe, la serie de Hofmeister se usa para ilustrar una escala de efectos de estabilización de proteínas mediante cosolutos iónicos y no iónicos. En la tabla C, los cosolutos se ordenan con respecto a sus efectos generales sobre proteínas en estado de disolución, desde estabilizantes (cosmótopos) hasta desestabilizantes (caótopos). En general, las diferencias en cuanto a los efectos en los aniones son mucho mayores que las observadas para los cationes, y, para ambos tipos, los efectos son más evidentes a concentraciones superiores a las que son aceptables en formulaciones parenterales. Comúnmente se usan altas concentraciones de cosmótopos (por ejemplo, sulfato de amonio >1 molar) para precipitar proteínas de una disolución mediante un proceso denominado “precipitación por sales” en el que el cosmótopo se excluye preferiblemente de la superficie de la proteína reduciendo la solubilidad de la proteína en su conformación nativa (plegada). La eliminación o dilución de la sal devolverá la proteína a la disolución. El término “solubilización por sales” se refiere al uso de iones desestabilizantes (tales como guanidina y cloruro, por ejemplo) que aumentan la solubilidad de proteínas mediante solvatación de los enlaces peptídicos de la estructura principal de la proteína. Aumentar las concentraciones del caótopo favorecerá la conformación en estado desnaturalizado (desplegado) de la proteína a medida que aumenta la solubilidad de la cadena peptídica. La eficacia relativa de iones en cuanto a la “solubilización por sales” y la “precipitación por sales” define su posición en la serie de Hofmeister.

Con el fin de mantener la isotonicidad en una formulación parenteral, las concentraciones de sales se limitan generalmente a menos de 150 mM para combinaciones de iones monovalentes. En este intervalo de concentración, el mecanismo de estabilización por sales se debe probablemente al apantallamiento de fuerzas intramoleculares de repulsión electrostática o fuerzas intermoleculares de atracción (apantallamiento de Debye-Huckel). Resulta interesante que se ha mostrado que las sales caótopicas son más eficaces en la estabilización de la estructura de la proteína que concentraciones similares de cosmótopos mediante este mecanismo. Se cree que los aniones caótopicos se unen más fuertemente que los iones cosmótopicos. Con respecto a la degradación covalente de proteínas, se esperan efectos diferenciales de fuerza iónica sobre este mecanismo según la teoría de Debye-Huckel. Por consiguiente, los informes publicados de estabilización de proteínas mediante cloruro de sodio van acompañados por aquellos en los que el cloruro de sodio aceleró la degradación covalente. Los mecanismos mediante los cuales las sales afectan a la estabilidad de la proteína son específicos de la proteína y pueden variar significativamente en función del pH de la disolución. Un ejemplo en el que un excipiente puede ser útil para permitir la administración de un fármaco de proteína es el de algunas formulaciones de anticuerpos de alta concentración. Recientemente, se ha mostrado que las sales son eficaces en la reducción de la viscosidad de tales formulaciones (Liu J., *et al.*, J. Pharm Sci., 94(9): 1928-40 (2005); fe de erratas en: J Pharm Sci., 95(1): 234-5 (2006)).

Tabla C: La serie de Hofmeister de sales

Cosoluto			Escala de estabilización	
Anión	Catión	Otro	Estabilización (precipitación por sales)	Cosmótopo
F ⁻	(CH ₃) ₄ N ⁺	Glicerol/sorbitol		
PO ₄ ⁻	(CH ₃) ₂ NH ⁺	Sacarosa/trehalosa		
SO ₄ ⁻	NH ₄ ⁺	TMAO		
CHCOO ⁻	K ⁺			
Cl ⁻	Na ⁺			
Br ⁻	Cs ⁺			
I ⁻	Li ⁺			
	Mg ²⁺	Guanidina		
	Ca ²⁺	Arginina		
	Ba ²⁺	Urea		

Aminoácidos

Los aminoácidos han encontrado un uso versátil en formulaciones de proteínas como tampones, agentes de carga, estabilizadores y antioxidantes. Se emplean histidina y ácido glutámico para tamponar formulaciones de proteínas en el intervalo de pH de 5,5-6,5 y 4,0-5,5, respectivamente. El grupo imidazol de la histidina tiene un pKa = 6,0 y el grupo carboxilo de la cadena lateral del ácido glutámico tiene un pKa de 4,3 lo que hace que sean adecuados para tamponar en sus respectivos intervalos de pH. El acetato, el tampón más comúnmente usado en el intervalo de pH ácido de 4,0-5,5, se sublima durante la liofilización y por tanto no debe usarse en formulaciones secadas por congelación. El ácido glutámico es particularmente útil en tales casos (por ejemplo, Stemgen®). La histidina se encuentra comúnmente en formulaciones de proteínas comercializadas (por ejemplo, Xolair®, Herceptin®, Recombinate®). Proporciona una buena alternativa al citrato, un tampón que se sabe que produce escozor tras la inyección. Resulta interesante que también se ha notificado que la histidina tiene un efecto de estabilización sobre ABX-IL8 (un anticuerpo IgG2) con respecto a la agregación cuando se usa a altas concentraciones en presentaciones tanto líquidas como liofilizadas (Chen B, *et al.*, Pharm Res., 20(12): 1952-60 (2003)). También se observó que la histidina (hasta 60 mM) reducía la viscosidad de una formulación de alta concentración de este anticuerpo. Sin embargo, en el mismo estudio, los autores observaron un aumento de la agregación y alteración del color en formulaciones que contenían histidina durante estudios de congelación-descongelación del anticuerpo en

recipientes de acero inoxidable. Los autores atribuyeron esto a un efecto de iones de hierro lixiviados de la corrosión de recipientes de acero. Otro punto de advertencia con la histidina es que experimenta fotooxidación en presencia de iones de metales (Tomita M, *et al.*, *Biochemistry*, 8(12): 5149-60 (1969)). El uso de metionina como antioxidante en formulaciones parece prometedor; se ha observado que es eficaz frente a varios estreses oxidativos (Lam XM, *et al.*, *J Pharm Sci.*, 86(11): 1250- 5 (1997)).

Se ha mostrado que los aminoácidos glicina, prolina, serina y alanina estabilizan proteínas mediante el mecanismo de exclusión preferencial. La glicina también es un agente de carga comúnmente usado en formulaciones liofilizadas (por ejemplo, Neumega®, Genotropin®, Humatrope®). Se separa por cristalización de la fase amorfa congelada dando a la torta estructura y volumen. Se ha mostrado que la arginina es un agente eficaz en la inhibición de la agregación y se ha usado en formulaciones tanto líquidas como liofilizadas (por ejemplo, Activase®, Avonex®, Enbrel® líquido). Además, la eficacia potenciada del replegamiento de determinadas proteínas en presencia de arginina se ha atribuido a su supresión de la reacción de agregación de competencia durante el replegamiento.

Antioxidantes

La oxidación de residuos de proteínas surge de varias fuentes diferentes. Más allá de la adición de antioxidantes específicos, la prevención del daño oxidativo de proteínas implica el control cuidadoso de varios factores a lo largo de todo el procedimiento de fabricación y el almacenamiento del producto tal como oxígeno atmosférico, temperatura, exposición a la luz y contaminación química. Los antioxidantes farmacéuticos más comúnmente usados son agentes reductores, eliminadores de radicales libres/oxígeno, o agentes quelantes. Los antioxidantes en formulaciones de proteínas terapéuticas deben ser solubles en agua y permanecer activos a lo largo de toda la vida útil de almacenamiento del producto. Los agentes reductores y eliminadores de radicales libres/oxígeno funcionan mediante ablación de especies activas de oxígeno en disolución. Los agentes quelantes tales como EDTA pueden ser eficaces mediante unión a contaminantes de metales traza que fomentan la formación de radicales libres. Por ejemplo, se usó EDTA en la formulación líquida de factor de crecimiento de fibroblastos ácido para inhibir la oxidación catalizada por iones de metales de residuos de cisteína. Se ha usado EDTA en productos comercializados tales como Kineret® y Ontak®.

Además de la evaluación de la eficacia de diversos excipientes en la prevención de la oxidación de proteínas, los científicos de formulación deben ser conscientes de la posibilidad de que los propios antioxidantes induzcan otros cambios covalentes o físicos en la proteína. Se han notificado varios de tales casos en la bibliografía. Los agentes reductores (tales como glutatión) pueden provocar alteración de enlaces disulfuro intramoleculares, lo cual puede conducir a intercambio de enlaces disulfuro. En presencia de iones de metales de transición, se ha mostrado que ácido ascórbico y EDTA fomentan la oxidación de metionina en varias proteínas y péptidos (Akers MJ, y Defelippis MR. *Peptides and Proteins as Parenteral solutions*. En: *Pharmaceutical Formulation Development of Peptides and Proteins*. Sven Frokjaer, Lars Hovgaard, editores. *Pharmaceutical Science*. Taylor y Francis, R.U. (1999)); Fransson J.R., *J. Pharm. Sci.* 86(9): 4046-1050 (1997); Yin J, *et al.*, *Pharm Res.*, 21(12): 2377-83 (2004)). Se ha notificado que el tiosulfato de sodio reduce los niveles de oxidación de metionina inducida por luz y temperatura en rhuMab HER2; sin embargo, también se notificó la formación de un aducto de tiosulfato-proteína en este estudio (Lam XM, Yang JY, *et al.*, *J Pharm Sci.* 86(11): 1250-5 (1997)). La selección de un antioxidante apropiado se realiza según los estreses y las sensibilidades específicos de la proteína.

Iones de metales

En general, no se desean iones de metales de transición en formulaciones de proteínas porque pueden catalizar reacciones de degradación físicas y químicas en proteínas. Sin embargo, se incluyen iones de metales específicos en formulaciones cuando son cofactores para proteínas y en formulaciones de proteínas en suspensión en las que forman complejos de coordinación (por ejemplo, suspensión con zinc de insulina). Recientemente, se ha propuesto el uso de iones de magnesio (10-120 mM) para inhibir la isomerización de ácido aspártico para dar ácido isoaspártico (documento WO 2004039337).

Dos ejemplos en los que iones de metales confieren estabilidad o actividad aumentada en proteínas son desoxirribonucleasa humana (ADNasarh, Pulmozyme®), y factor VIII. En el caso de ADNasarh, iones Ca^{+2} (hasta 100 mM) aumentaron la estabilidad de la enzima mediante un sitio de unión específica (Chen B, *et al.*, *J Pharm Sci.*, 88(4): 477-82 (1999)). De hecho, la eliminación de iones de calcio de la disolución con EGTA provocó un aumento de la desamidación y la agregación. Sin embargo, este efecto sólo se observó con iones Ca^{+2} ; se observó que otros cationes divalentes (Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2}) desestabilizaban la ADNasarh. Se observaron efectos similares en el factor VIII. Los iones Ca^{+2} y Sr^{+2} estabilizaron la proteína mientras que otros como Mg^{+2} , Mn^{+2} y Zn^{+2} , Cu^{+2} y Fe^{+2} desestabilizaron la enzima (Fatouros, A., *et al.*, *Int. J. Pharm.*, 155, 121-131 (1997)). En un estudio separado con factor VIII, se observó un aumento significativo de la velocidad de agregación en presencia de iones Al^{+3} (Derrick TS, *et al.*, *J. Pharm. Sci.*, 93(10): 2549-57 (2004)). Los autores observan que otros excipientes tales como sales de tampón están con frecuencia contaminados con iones Al^{+3} e ilustran la necesidad de usar excipientes de calidad apropiada en productos formulados.

Conservantes

Los conservantes son necesarios cuando se desarrollan formulaciones parenterales de múltiples usos que implican más de una extracción del mismo recipiente. Su principal función es inhibir el crecimiento microbiano y garantizar la esterilidad del producto a lo largo de toda la vida útil de almacenamiento o periodo de uso del producto terminado. Los conservantes comúnmente usados incluyen alcohol bencílico, fenol y m-cresol. Aunque los conservantes tienen una larga historia de uso, el desarrollo de formulaciones de proteínas que incluyen conservantes puede presentar un desafío. Los conservantes casi siempre tienen un efecto desestabilizante (agregación) sobre las proteínas, y esto se ha convertido en un factor principal en la limitación de su uso en formulaciones de proteínas de múltiples dosis (Roy S, *et al.*, J Pharm Sci., 94(2): 382- 96 (2005)).

Hasta la fecha, la mayoría de los fármacos de proteínas se han formulado únicamente para un solo uso. Sin embargo, cuando son posibles formulaciones de múltiples dosis, tienen la ventaja añadida de permitir conveniencia para el paciente y aumentar la comerciabilidad. Un buen ejemplo es el de la hormona del crecimiento humana (hGH) en la que el desarrollo de formulaciones con conservantes ha conducido a la comercialización de presentaciones en pluma para inyección de múltiples usos más convenientes. Actualmente hay al menos cuatro de tales dispositivos de pluma que contienen formulaciones de hGH con conservantes disponibles en el mercado. Norditropin® (líquido, Novo Nordisk), Nutropin AQ® (líquido, Genentech) y Genotropin (liofilizado, cartucho de cámara doble, Pharmacia & Upjohn) contienen fenol mientras que Somatropo® (Eli Lilly) se formula con m-cresol.

Se necesita tener en cuenta varios aspectos durante el desarrollo de la formulación de formas de dosificación con conservantes. La concentración eficaz de conservante en el producto terminado debe optimizarse. Esto requiere someter a prueba un conservante dado en la forma de dosificación con intervalos de concentración que confieren eficacia antimicrobiana sin poner en peligro la estabilidad de la proteína. Por ejemplo, se examinaron satisfactoriamente tres conservantes en el desarrollo de una formulación líquida para receptor de interleucina 1 (tipo I), usando calorimetría diferencial de barrido (DSC). Se clasificaron los conservantes en orden basándose en su impacto sobre la estabilidad a concentraciones comúnmente usadas en productos comercializados (Remmele RL Jr., *et al.*, Pharm. Res., 15(2): 200-8 (1998)).

Tal como podía esperarse, el desarrollo de formulaciones líquidas que contienen conservantes es más difícil que el de formulaciones liofilizadas. Los productos secados por congelación pueden liofilizarse sin el conservante y reconstituirse con un diluyente que contiene conservante en el momento de uso. Esto acorta el tiempo durante el cual un conservante está en contacto con la proteína minimizando significativamente los riesgos de estabilidad asociados. Con formulaciones líquidas, la eficacia y la estabilidad del conservante tienen que mantenerse a lo largo de toda la vida útil de almacenamiento del producto (~18-24 meses). Un punto importante a observar es que tiene que demostrarse eficacia del conservante en la formulación final que contiene el fármaco activo y todos los componentes excipientes.

Algunos conservantes pueden provocar reacciones en el sitio de la inyección, lo cual es otro factor que se necesita tener en cuenta cuando se elige un conservante. En ensayos clínicos que se centran en la evaluación de conservantes y tampones en Norditropin, se observó que la percepción de dolor era inferior en formulaciones que contenían fenol y alcohol bencílico en comparación con una formulación que contenía m-cresol (Kappelgaard A.M., Horm Res. 62 Sup. 3:98-103 (2004)). Resulta interesante que, entre los conservantes comúnmente usados, el alcohol bencílico presenta propiedades anestésicas (Minogue SC, y Sun DA., Anesth Analg., 100(3): 683-6 (2005)).

Dadas las enseñanzas y directrices proporcionadas en el presente documento, los expertos en la técnica sabrán qué cantidad o intervalo de excipiente puede incluirse en cualquier formulación particular para obtener una formulación biofarmacéutica de la invención que fomenta la retención de la estabilidad del producto biofarmacéutico. Por ejemplo, la cantidad y el tipo de una sal que va a incluirse en una formulación biofarmacéutica de la invención pueden seleccionarse basándose en la osmolalidad deseada (es decir, isotónica, hipotónica o hipertónica) de la disolución final así como las cantidades y osmolalidad de otros componentes que van a incluirse en la formulación. De manera similar, mostrando a modo de ejemplo con referencia al tipo de poliol o azúcar incluido en una formulación, la cantidad de un excipiente de este tipo dependerá de su osmolalidad.

A modo de ejemplo, la inclusión de sorbitol a aproximadamente el 5% puede lograr isotonicidad mientras que se necesita aproximadamente el 9% de un excipiente de sacarosa para lograr isotonicidad. La selección de la cantidad o el intervalo de concentraciones de uno o más excipientes que pueden incluirse dentro de una formulación biofarmacéutica de la invención se ha mostrado a modo de ejemplo anteriormente mediante referencia a sales, polioles y azúcares. Sin embargo, los expertos en la técnica entenderán que las consideraciones descritas en el presente documento y mostradas adicionalmente a modo de ejemplo mediante referencia a excipientes específicos pueden aplicarse igualmente a todos los tipos y combinaciones de excipientes incluyendo, por ejemplo, sales, aminoácidos, otros agentes de tonicidad, tensioactivos, estabilizadores, agentes de carga, crioprotectores, lioprotectores, antioxidantes, iones de metales, agentes quelantes y/o conservantes.

Además, cuando se notifica un excipiente particular en una formulación, por ejemplo, mediante el porcentaje (%) p/v, los expertos en la técnica reconocerán que también se contempla la concentración molar equivalente de ese excipiente.

Evidentemente, un experto habitual en la técnica reconocerá que las concentraciones de los excipientes

mencionados anteriormente comparten una interdependencia dentro de una formulación particular. A modo de ejemplo, la concentración de un agente de carga puede reducirse cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de proteína/péptido o cuando, por ejemplo, hay una alta concentración de agente estabilizante. Además, un experto habitual en la técnica reconocerá que, con el fin de mantener la isotonicidad de una formulación particular en la que no hay ningún agente de carga, la concentración de un agente estabilizante se ajustará en consecuencia (es decir, se usará una cantidad “tonificante” de estabilizador).

Las composiciones son estables durante al menos dos años a de 2°C a 8°C en el estado liofilizado. Esta estabilidad a largo plazo es beneficiosa para prolongar la vida útil de almacenamiento del producto farmacéutico.

Métodos de preparación

La presente invención contempla además métodos para la preparación de formulaciones de proteínas terapéuticas. En particular métodos para preparar una formulación de pepticuerpos terapéuticos liofilizados que comprende la etapa de liofilizar una composición de pepticuerpos terapéuticos en un tampón que comprende un agente tamponante, un agente de carga, un agente estabilizante y un tensioactivo.

Los presentes métodos comprenden una o más de las siguientes etapas: añadir un agente estabilizante a dicha mezcla antes de la liofilización, añadir al menos un agente seleccionado de un agente de carga, un agente regulador de la osmolaridad y un tensioactivo a dicha mezcla antes de la liofilización. A menos que se especifique en las reivindicaciones, el agente de carga puede ser cualquier agente de carga descrito en el presente documento. En un aspecto, el agente de carga es manitol. En la presente invención, el agente estabilizante es sacarosa. A menos que se especifique en las reivindicaciones, el tensioactivo puede ser cualquier tensioactivo descrito en el presente documento. En una realización, el tensioactivo es polisorbato 20.

La práctica de reconstitución convencional para material liofilizado es añadir de nuevo un volumen de agua pura o agua estéril para inyección (WFI) (normalmente equivalente al volumen eliminado durante la liofilización), aunque algunas veces se usan disoluciones diluidas de agentes antibacterianos en la producción de productos farmacéuticos para administración parenteral [Chen, Drug Development and Industrial Pharmacy, 18:1311-1354 (1992)]. Por consiguiente, se proporcionan métodos para la preparación de pepticuerpos terapéuticos reconstituidos que comprenden la etapa de añadir un diluyente a una composición de pepticuerpos terapéuticos liofilizada de la invención.

La composición de pepticuerpos terapéuticos liofilizada puede reconstituirse como una disolución acuosa. Una variedad de portadores acuosos, por ejemplo, agua estéril para inyección, agua con conservantes para uso de múltiples dosis, o agua con cantidades apropiadas de tensioactivos (por ejemplo, polisorbato 20), solución salina al 0,4%, glicina al 0,3%, o suspensiones acuosas pueden contener el compuesto activo en mezcla con excipientes adecuados para la producción de suspensiones acuosas. En diversos aspectos, tales excipientes son agentes de suspensión, por ejemplo carboximetilcelulosa sódica, metilcelulosa, hidroxipropilmetilcelulosa, alginato de sodio, polivinilpirrolidona, goma tragacanto y goma arábiga; agentes de dispersión o humectación pueden ser fosfátido que se produce de manera natural, por ejemplo lecitina, o productos de condensación de un óxido de alquileo con ácidos grasos, por ejemplo estearato de polioxietileno, o productos de condensación de óxido de etileno con alcoholes alifáticos de cadena larga, por ejemplo heptadecaetilenoxicetanol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y un hexitol tal como monooleato de polioxietileno-sorbitol, o productos de condensación de óxido de etileno con ésteres parciales derivados de ácidos grasos y anhídridos de hexitol, por ejemplo monooleato de polietileno-sorbitano. Las suspensiones acuosas también pueden contener uno o más conservantes, por ejemplo p-hidroxibenzoato de etilo o n-propilo.

Para administrar composiciones a seres humanos o animales de prueba, en un aspecto, las composiciones comprenden uno o más portadores farmacéuticamente aceptables. Las frases “farmacéuticamente” o “farmacológicamente aceptable” se refieren a entidades moleculares y composiciones que son estables, inhiben la degradación de proteínas tal como productos de agregación y escisión, y además no producen alergias ni otras reacciones adversas cuando se administran usando vías bien conocidas en la técnica, tal como se describe a continuación. Los “portadores farmacéuticamente aceptables” incluyen todos y cada uno de los disolventes clínicamente útiles, medios de dispersión, recubrimientos, agentes antibacterianos y antifúngicos, agentes isotónicos y de retraso de la absorción y similares, incluyendo los agentes dados a conocer anteriormente.

Las composiciones de pepticuerpos terapéuticos pueden administrarse por vía oral, tópica, transdérmica, parenteral, mediante pulverización de inhalación, vaginal, rectal o mediante inyección intracraneal. El término parenteral tal como se usa en el presente documento incluye inyecciones subcutáneas, técnicas de infusión o inyección intravenosa, intramuscular, intracisterna. También se contempla la administración mediante inyección intravenosa, intradérmica, intramuscular, intramamaria, intraperitoneal, intratecal, retrobulbar, intrapulmonar y/o implantación quirúrgica en un sitio particular. Generalmente, las composiciones están esencialmente libres de pirógenos, así como otras impurezas que pueden ser perjudiciales para el receptor.

Pueden llevarse a cabo administraciones individuales o múltiples de las composiciones con los el patrón y niveles de dosis que selecciona el médico encargado. Para la prevención o el tratamiento de una enfermedad, la dosificación

apropiada dependerá del tipo de enfermedad que va a tratarse, tal como se definió anteriormente, la intensidad y el transcurso de la enfermedad, si el fármaco se administra para fines preventivos o terapéuticos, la terapia anterior, la historia clínica y la respuesta del paciente al fármaco, y el criterio del médico encargado.

Kits

- 5 Como aspecto adicional, la invención contempla kits que comprenden uno o más compuestos o composiciones liofilizados envasados de una manera que facilita su uso para administración a sujetos. En un aspecto, un kit de este tipo incluye un compuesto o una composición descrito en el presente documento (por ejemplo, una composición que comprende una proteína o péptido terapéutico), envasado en un recipiente tal como un frasco o envase sellado, con una etiqueta fijada al recipiente o incluida en el envase que describe el uso del compuesto o la composición al poner en práctica el método. En un aspecto, el kit contiene un primer recipiente que tiene una composición de proteínas o péptidos terapéuticos liofilizada y un segundo recipiente que tiene una disolución de reconstitución fisiológicamente aceptable para la composición liofilizada. En un aspecto, el compuesto o la composición se envasa en una forma de dosificación unitaria. El kit puede incluir además un dispositivo adecuado para administrar la composición según una vía de administración específica. Preferiblemente, el kit contiene una etiqueta que describe el uso de la composición de proteínas o péptidos terapéuticos.

Dosificaciones

- El régimen de dosificación implicado en el tratamiento de un estado descrito en el presente documento lo determinará el médico encargado, teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo la edad, estado, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la intensidad de cualquier infección, el momento de administración y otros factores clínicos. En diversos aspectos, el régimen diario está en el intervalo de 0,1-1000 µg de una preparación por kilogramo de peso corporal (calculando la masa de la proteína sola, sin modificación química) o de 0,1-150 µg/kg. En algunos aspectos, la dosis puede superar 1 mg/kg, 3 mg/kg o 10 mg/kg.

- Las preparaciones de la invención pueden administrarse mediante un bolo inicial seguido por una infusión continua para mantener niveles circulantes terapéuticos de producto terminado. Como otro ejemplo, el compuesto de la invención puede administrarse como una dosis de una vez. Los expertos habituales en la técnica optimizarán fácilmente las dosificaciones eficaces y los regímenes de administración tal como se determina mediante la buena práctica médica y el estado clínico del paciente individual. La frecuencia de dosificación dependerá de los parámetros farmacocinéticos de los agentes y la vía de administración. La formulación farmacéutica óptima la determinará un experto en la técnica dependiendo de la vía de administración y la dosificación deseada. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences, 18ª ed. (1990, Mack Publishing Co., Easton, PA 18042) páginas 1435-1712. Tales formulaciones pueden influir en el estado físico, estabilidad, velocidad de liberación *in vivo*, y velocidad de aclaramiento *in vivo* de los agentes administrados. Dependiendo de la vía de administración, puede calcularse una dosis adecuada según el peso corporal, el área superficial corporal o el tamaño de órganos. El refinamiento adicional de los cálculos necesarios para determinar la dosificación apropiada para el tratamiento que implica cada una de las formulaciones mencionadas anteriormente lo realizan de manera rutinaria los expertos habituales en la técnica sin experimentación excesiva, especialmente a la vista de la información sobre la dosificación y los ensayos dados a conocer en el presente documento, así como los datos farmacocinéticos observados en los ensayos clínicos con seres humanos comentados anteriormente. Las dosificaciones apropiadas pueden determinarse mediante el uso de ensayos establecidos para determinar dosificaciones de nivel en sangre junto con datos de respuesta a la dosis apropiados. El régimen de dosificación final lo determinará el médico encargado, teniendo en cuenta diversos factores que modifican la acción de fármacos, por ejemplo la actividad específica del fármaco, la intensidad del daño y la capacidad de respuesta del paciente, la edad, estado, peso corporal, sexo y dieta del paciente, la intensidad de cualquier infección, momento de administración y otros factores clínicos. A medida que se realicen estudios, surgirá información adicional referente a los niveles de dosificación apropiados y la duración de tratamiento para diversas enfermedades y estados.

Estructura de compuestos

- En general, en preparaciones según la invención, un péptido se une a un vehículo a través del extremo N-terminal del péptido, el extremo C-terminal del péptido, o ambos, y la estructura resultante puede modificarse adicionalmente con un WSP unido covalentemente que se une al vehículo en el producto de vehículo-péptido. Por tanto, las moléculas de pepticuerpo terapéutico de esta invención pueden describirse mediante la siguiente fórmula I:

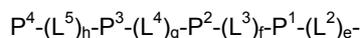
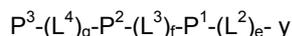
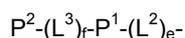


en la que:

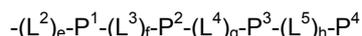
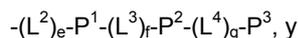
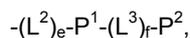
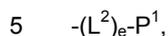
F¹ es un vehículo;

X¹ se selecciona de

- 55 P¹-(L²)_e-



X^2 se selecciona de:



en la que P^1, P^2, P^3 y P^4 son cada uno secuencias independientes de péptidos farmacológicamente activos;

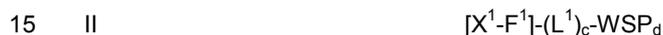
10 L^1, L^2, L^3, L^4 y L^5 son cada uno independientemente grupos de unión;

a, b, c, e, f, g y h son cada uno independientemente 0 ó 1, con la condición de que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1 o mayor de 1; y

WSP es un polímero soluble en agua, cuya unión se realiza en cualquier resto reactivo en F^1 .

Por tanto, el compuesto I comprende compuestos de las fórmulas



incluyendo multímeros de la misma, en la que F^1 es un dominio Fc y se une en el extremo C-terminal de X^1 , y uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ;



20 incluyendo multímeros de la misma, en la que F^1 es un dominio Fc y se une en el extremo N-terminal de X^2 , y uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ;



incluyendo multímeros de la misma, en la que F^1 es un dominio Fc y se une en el extremo N-terminal de $-(L^1)_c-P^1$ y uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ; y



25 incluyendo multímeros de la misma, en la que F^1 es un dominio Fc y se une en el extremo N-terminal de $-L^1-P^1-L^2-P^2$ y uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

30 En una realización, F^1 es un dominio Fc y se une o bien al extremo N-terminal o bien al extremo C-terminal de un péptido. En una realización relacionada, Fc se une para dar un formato dimérico tal como se describe en el presente documento al que se unen 2 (o más) péptidos. Los péptidos pueden ser homodiméricos (es decir, la misma secuencia de aminoácidos) o heterodinámicos (es decir, diferentes secuencias de aminoácidos que se unen a la misma diana o que se unen a dianas diferentes).

35 En otra realización, se proporcionan bucles de Fc que comprenden un(os) péptido(s). Los bucles de Fc que comprenden un(os) péptido(s) se preparan en un procedimiento en el que al menos un péptido biológicamente activo se incorpora como secuencia interna en un dominio Fc. Una secuencia interna de este tipo puede añadirse mediante inserción (es decir, entre aminoácidos en el dominio Fc anteriormente existente) o mediante sustitución de aminoácidos en el dominio Fc anteriormente existente (es decir, eliminando aminoácidos en el dominio Fc anteriormente existente y añadiendo aminoácidos peptídicos). En este último caso, no se necesita que el número de aminoácidos peptídicos añadidos corresponda con el número de aminoácidos eliminados del dominio Fc anteriormente existente. Por ejemplo, en un aspecto, se proporciona una molécula en la que se eliminan 10 aminoácidos y se añaden 15 aminoácidos. Se preparan compuestos farmacológicamente activos proporcionados mediante un procedimiento que comprende: a) seleccionar al menos un péptido que modula la actividad de una proteína de interés; y b) preparar un agente farmacológico que comprende una secuencia de aminoácidos del péptido seleccionado como secuencia interna de un dominio Fc. Este procedimiento puede emplearse para modificar un dominio Fc que ya está unido a través de un extremo N-terminal o C-terminal o cadena lateral a un péptido, por ejemplo, tal como se describe en las solicitudes de patente estadounidense n.ºs 2003/0195156, 2003/0176352, 2003/0229023 y 2003/0236193, y las publicaciones internacionales números WO 00/24770 y WO 04/026329. El procedimiento descrito en la publicación de solicitud de patente estadounidense n.º US2006/0140934 también puede

emplearse para modificar un dominio Fc que es parte de un anticuerpo. De esta manera, pueden producirse diferentes moléculas que tienen funcionalidades adicionales, tales como un dominio de unión a un epítipo diferente o un dominio de unión adicional al epítipo existente de la molécula precursora. Las moléculas que comprenden una secuencia peptídica interna también se denominan “pepticuerpos internos de Fc” o “moléculas peptídicas internas de Fc”.

Las moléculas peptídicas internas de Fc pueden incluir más de una secuencia peptídica en tándem en una región interna particular, y pueden incluir péptidos adicionales en otras regiones internas. Aunque se prefieren regiones de bucle supuestas, las inserciones en cualquier otro dominio no terminal de Fc también se consideran parte de esta invención. Esta invención también abarca variantes y derivados de los compuestos anteriores (descritos a continuación).

Los compuestos de esta invención pueden prepararse mediante métodos de síntesis convencionales, técnicas de ADN recombinante, o cualquier otro método de preparación de péptidos y proteínas de fusión.

Un uso contemplado para moléculas peptídicas internas de Fc es como agente terapéutico o profiláctico. Un péptido seleccionado puede tener actividad comparable a (o incluso mayor que) la del ligando natural al que imita el péptido. Además, determinados agentes terapéuticos basados en ligandos naturales pueden inducir anticuerpos contra el propio ligando endógeno del paciente. En cambio, la secuencia única del péptido unido a vehículo evita este inconveniente al tener poca o normalmente ninguna identidad de secuencia con el ligando natural. Además, los pepticuerpos internos de Fc pueden tener ventajas en el repliegamiento y la purificación con respecto a moléculas de Fc unidas en el extremo N-terminal o C-terminal. De manera todavía más adicional, los pepticuerpos internos de Fc pueden ser más estables tanto termodinámicamente, debido a la estabilización de dominios quiméricos, como químicamente, debido a la resistencia aumentada frente a la degradación proteolítica por amino y carboxipeptidasas. Los pepticuerpos internos de Fc también pueden mostrar propiedades farmacocinéticas mejoradas.

Péptidos. Puede usarse cualquier número de péptidos junto con la presente invención. Resultan de particular interés los péptidos que imitan la actividad de EPO, TPO, hormona del crecimiento, G-CSF, GM-CSF, IL-1ra, CTLA4, TRAIL, TNF, VEGF, MMP, miostatina, integrina, OPG, OPG-L, NGF, TALL-1, pareja(s) de unión a Ang-2, TGF- α , y TGF- β . También resultan de interés los antagonistas peptídicos, particularmente los antagonistas de la actividad de TNF, cualquiera de las interleucinas (IL-1, 2, 3,...), y proteínas implicadas en la activación del complemento (por ejemplo, C3b). También resultan de interés los péptidos de direccionamiento, incluyendo péptidos de direccionamiento al tumor, péptidos de transporte a través de la membrana y similares. Todas estas clases de péptidos pueden descubrirse mediante métodos descritos en las referencias citadas en esta memoria descriptiva y otras referencias.

La presentación en fagos, en particular, es útil en la generación de péptidos para su uso en la presente invención. Se ha mencionado que la selección por afinidad a partir de bibliotecas de péptidos aleatorios puede usarse para identificar ligandos peptídicos para cualquier sitio de cualquier producto génico. Dedman *et al.* (1993), *J. Biol. Chem.* 268: 23025-30. La presentación en fagos es particularmente adecuada para identificar péptidos que se unen a proteínas de interés tales como receptores de superficie celular o cualquier proteína que tiene epítopos lineales. Wilson *et al.* (1998), *Can. J. Microbiol.* 44: 313-29; Kay *et al.* (1998), *Drug Disc. Today* 3: 370-8. Tales proteínas se revisan de manera extensa en Herz *et al.* (1997), *J. Receptor & Signal Transduction Res.* 17(5): 671-776. Tales proteínas de interés se prefieren para su uso en esta invención.

A modo de ejemplo y sin limitación, se proporciona un grupo de péptidos que se unen a receptores de citocinas. Recientemente se han clasificado las citocinas según su código de receptor. Véase Inglot (1997), *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis* 45: 353-7. Entre estos receptores se encuentran los CKR (familia I en la tabla 3). La clasificación de receptor aparece en la tabla 3.

Tabla 3 – Receptores de citocinas clasificados mediante código de receptor

Citocinas (ligandos)		Tipo de receptor	
familia	subfamilia	familia	subfamilia
I. Citocinas hematopoyéticas	1. IL-2, IL-4, IL-7, IL-9, IL-13, IL-15 2. IL-3, IL-5, GM-CSF 3. IL-6, IL-11, IL-12, LIF, OSM, CNTF, leptina (OB) 4. G-CSF, EPO, TPO, PRL, GH 5. IL-17, HVS-IL-17	I. R de citocinas (CKR)	1. γ Cr compartido, IL-9R, IL-4R 2. GP 14 β R compartido 3. RP 130 compartido, IL-6R, R de leptina 4. R “monocatenario”, GCSF-R, TPO-R, GH-R 5. otros R ²

¹ IL-17R pertenece a la familia de CKR, pero no se asigna a las 4 subfamilias indicadas

² Otros subtipos de IFN tipo I siguen sin asignar. Las citocinas hematopoyéticas, ligandos de IL-10 e interferones no presentan proteínas cinasas intrínsecas funcionales. Las moléculas de señalización para las citocinas son JAK,

II. Ligandos de IL-10	IL-10, BCRF-1, HSV-IL-10	II. IL-10R	
III. Interferones	1. IFN- α 1, α 2, α 4, m, t, IFN- β ³ 2. IFN- γ	III. R de interferón	1. IFNAR 2. IFNGR
IV. IL-1 y ligandos de tipo IL-1	1. IL-1 α , IL-1 β , IL-1Ra 2. IL-18, IL-18BP	IV. IL-1R	1. IL-1R, IL-1RAcP 2. IL-18R, IL-18RAcP
V. Familia de TNF	1. TNF- α , TNF- β (LT), FASL, CD40L, CD30L, CD27L, OX40L, OPGL, TRAIL, APRIL, AGP-3, BLys, TL5, Ntn-2, KAY, neutrocina α	3. R de NGF/TNF ⁴	TNF-RI, AGP-3R, DR4, DR5, OX40, OPG, TACI, CD40, FAS, ODR
VI. Quimiocinas	1. Quimiocinas α : IL-8, GRO α , β , γ , IF-10, PF-4, SDF-1 2. Quimiocinas β : MIP1 α , MIP1 β , MCP- 1,2,3,4, RANTES, eotaxina 3. Quimiocinas γ : linfotactina	4. R de quimiocinas	1. CXCR 2. CCR 3. CR 4. DARC ⁵
VII. Factores de crecimiento	1.1 SCF, M-CSF, PDGF- AA, AB, BB, KDR, FLT-1, FLT-3L, VEGF, SSV- PDGF, HGF, SF 1.2 FGK α , FGF β 1.3 EGF, TGF- α , VV-F19 (de tipo EGF) 1.4 IGF-I, IGF-II, Insulina 1.5 NGF, BDNF, NT-3, NT-4 ⁶ 2. TGF- β 1, β 2, β 3	VII. RKF	1. Subfamilia de TK 1.1 IgTK III R, VEGF-RI, VEGF-RII 1.2 IgTK IV R 1.3 TK-I rico en cisteína 1.4 TK-II, IGF-RI ricos en cisteína 1.5 TK V nudo de cisteína 2. Subfamilia de serina- treonina cinasa (STKS) ⁷

Otras proteínas de interés como objetivos para la generación de péptidos en la presente invención incluyen las siguientes:

- $\alpha\beta$ 3
- 5 $\alpha\beta$ 1
- Ang-2
- B7
- B7RP1
- CRP1
- 10 Calcitonina

STAT y moléculas distintas de receptor relacionadas. Se han clonado IL-14, IL-16 e IL-18 pero según el código de receptor siguen sin asignar.

³ Los receptores de TNF usan múltiples moléculas intracelulares diferenciadas para la transducción de señales incluyendo "dominio de muerte" de FAS R y TNF- α R de 55 kDa que participa en sus efectos citotóxicos. R de NGF/TNF puede unirse tanto a NGF como a factores relacionados así como a ligandos de TNF. Los receptores de quimiocinas son siete receptores de dominio transmembrana (7TM, serpiente). Están acoplados a proteína G.

⁴ El antígeno del grupo sanguíneo Duffy (DARC) es un receptor de eritrocitos que puede unirse a diversas quimiocinas. IL-1R pertenece a la superfamilia de inmunoglobulinas pero sus características de acontecimientos de transducción de señales siguen sin estar claros.

⁵ Las citocinas neurotróficas también pueden asociarse con receptores de NGF/TNF.

⁶ STKS pueden abarcar muchos otros factores relacionados con TGF- β que permanecen no asignados. Las proteínas cinasas son una parte intrínseca del dominio intracelular de la familia de receptores cinasas. Las enzimas participan en la transmisión de señales a través de los receptores.

- CD28
 CETP
 cMet
 Factor de complemento B
- 5 C4b
 CTLA4
 Glucagón
 Receptor de glucagón
 LIPG
- 10 MPL
 Variantes de corte y empalme de moléculas preferiblemente expresadas en células tumorales; por ejemplo, CD44, CD30, variantes no glicosiladas de mucina y glicoproteínas de superficie Y de Lewis
 CD19, CD20, CD33, CD45
 Antígeno prostático específico de membrana y antígeno prostático específico de célula
- 15 Metaloproteinasas de matriz (MMP), tanto secretadas como unidas a membrana (por ejemplo, MMP-9)
 Catepsinas
 Receptor de TIE-2
 Heparanasa
 Activador del plasminógeno urocinasa (UPA), receptor de UPA
- 20 Hormona paratiroidea (PTH), proteína relacionada con la hormona paratiroidea (PTHrP), PTH-RI, PTHRII
 Her2
 Her3
 Insulina
 Miostatina
- 25 TALL-1
 Factor de crecimiento nervioso
 Integrinas y receptores
 Selectinas y receptores de las mismas
 Moléculas de adhesión celular y receptores de las mismas
- 30 Ejemplos de péptidos aparecen en las tablas 4 a 38 a continuación. Estos péptidos pueden prepararse por cualquier método dado a conocer en la técnica, muchos de los cuales se describen en el presente documento. En la mayoría de las siguientes tablas, se usan abreviaciones de aminoácidos de una única letra. La "X" en estas secuencias (y a lo largo de esta memoria descriptiva, a no ser que se especifique lo contrario en una instancia particular) significa que cualquiera de los 20 residuos de aminoácido naturales puede estar presente. Cualquiera de estos péptidos
 35 puede unirse en tándem (es decir, de manera secuencial), con o sin grupos de unión, y se proporcionan algunos ejemplos unidos en tándem en la tabla. Los grupos de unión están enumerados como "Λ" y pueden ser cualquiera de los grupos de unión descritos en el presente documento. Las repeticiones y grupos de unión en tándem se muestran separados por guiones por motivos de claridad. Cualquier péptido que contiene un residuo de cisteinilo puede reticularse con otro péptido que contiene Cys, pudiendo cualquiera de ellos o ambos unirse a un vehículo. Se
 40 proporcionan algunos ejemplos reticulados en la tabla. Cualquier péptido que tiene más de un residuo Cys puede formar un enlace disulfuro intrapeptídico también; véase, por ejemplo, péptidos miméticos de EPO en la tabla 5. Algunos ejemplos de péptidos unidos por enlaces disulfuro intrapeptídicos se especifican en la tabla. Cualquiera de estos péptidos puede derivatizarse tal como se describe en el presente documento, y se proporcionan algunos

ejemplos derivatizados en la tabla. Los péptidos derivatizados en las tablas son a modo de ejemplo más que limitativos, ya que los péptidos no derivatizados asociados pueden emplearse en esta invención también. Para los derivados en los que el extremo terminal carboxilo puede terminarse con un grupo amino, el grupo amino de terminación se muestra como $-NH_2$. Para derivados en los que los residuos de aminoácido están sustituidos por restos diferentes de residuos de aminoácido, las sustituciones se denotan por σ , que significa cualquiera de los restos descritos en Bhatnagar *et al.* (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9 y Cuthbertson *et al.* (1997), J. Med. Chem. 40: 2876-82. El sustituyente J y los sustituyentes Z ($Z_5, Z_6 \dots Z_{40}$) son tal como se definen en las patentes estadounidenses n° 5.608.035, 5.786.331, y 5.880.096. Para las secuencias miméticas de EPO (Tabla 5), los sustituyentes X_2 a X_{11} y el número entero "n" son tal como se definen en el documento WO 96/40772. También para las secuencias miméticas de EPO, los sustituyentes $X_{na}, X_{1a}, X_{2a}, X_{3a}, X_{4a}, X_{5a}$ y X_{ca} siguen las definiciones de $X_n, X_1, X_2, X_3, X_4, X_5$, y X_c , respectivamente, del documento WO 99/47151. Los sustituyentes "Ψ", "Θ" y "+" se definen en Sparks *et al.* (1996), Proc. Natl. Acad. Sci. 93: 1540-4. X_4, X_5, X_6 y X_7 son tal como se definen en la patente estadounidense n° 5,773,569, excepto que para los péptidos de unión a integrina, $X_1, X_2, X_3, X_4, X_5, X_6, X_7$ y X_8 son tal como se definen en las solicitudes internacionales WO 95/14714, publicada el 1 de junio de 1995 y WO 97/08203, publicada el 6 de marzo de 1997; y para los péptidos miméticos de VIP, $X_1, X_1', X_1'', X_2, X_3, X_4, X_5, X_6$ y Z y los números enteros m y n son tal como se definen en el documento WO 97/40070, publicada el 30 de octubre del 1997. Xaa y Yaa a continuación son tal como se definen en el documento WO 98/09985, publicado el 12 de marzo de 1998. AA₁, AA₂, AB₁, AB₂, y AC son tal como se definen en la solicitud internacional WO 98/53842, publicada el 3 de diciembre de 1998. X¹, X², X³, y X⁴ en la tabla 17 solamente son tal como se definen en la solicitud europea EP 0 911 393, publicada el 28 de abril de 1999. Los residuos que aparecen en negrita son D-aminoácidos. Todos los péptidos están unidos a través de enlaces peptídicos a no ser que se indique lo contrario. Las abreviaturas se enumeran al final de esta memoria descriptiva. En la columna de "SEQ ID NO.", "NR" significa que no se requiere una lista de secuencia para la secuencia dada.

Tabla 4 – Secuencias de péptidos antagonistas de IL-1

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
Z ₁₁ Z ₇ Z ₈ QZ ₅ YZ ₆ Z ₉ Z ₁₀	3
XXQZ ₅ YZ ₆ XX	4
Z ₇ XQZ ₅ YZ ₆ XX	5
Z ₇ Z ₈ QZ ₅ YZ ₆ Z ₉ Z ₁₀	6
Z ₁₁ Z ₇ Z ₈ QZ ₅ YZ ₆ Z ₉ Z ₁₀	7
Z ₁₂ Z ₁₃ Z ₁₄ Z ₁₅ Z ₁₆ Z ₁₇ Z ₁₈ Z ₁₉ Z ₂₀ Z ₂₁ Z ₂₂ Z ₁₁ Z ₇ Z ₈ QZ ₅ YZ ₆ Z ₉ Z ₁₀ L	8
Z ₂₃ NZ ₂₄ Z ₃₉ Z ₂₅ Z ₂₆ Z ₂₇ Z ₂₈ Z ₂₉ Z ₃₀ Z ₄₀	9
TANVSSFEWTPYYWQPYALPL	10
SWTDYGYWQPYALPISGL	11
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	12
ENTYSPNWADSMYWQPYALPL	13
SVGEDHNFWTSEYWQPYALPL	14
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	15
FEWTPGYWQPY	16
FEWTPGYWQHY	17
FEWTPGWYQJY	18
AcFEWTPGWYQJY	19
FEWTPGW _p YQJY	20
FAWTPGYWQJY	21
FEWAPGYWQJY	22
FEWVPGYWQJY	23
FEWTPGYWQJY	24
AcFEWTPGYWQJY	25

FEWTPaWYQJY	26
FEWTPSarWYQJY	27
FEWTPGYYQPY	28
FEWTPGWWQPY	29
FEWTPNYWQPY	30
FEWTPvYWQJY	31
FEWTPecGYWQJY	32
FEWTPAibYWQJY	33
FEWTSarGYWQJY	34
FEWTPGYWQPY	35
FEWTPGYWQHY	36
FEWTPGWYQJY	37
AcFEWTPGWYQJY	38
FEWTPGW-pY-QJY	39
FAWTPGYWQJY	40
FEWAPGYWQJY	41
FEWVPGYWQJY	42
FEWTPGYWQJY	43
AcFEWTPGYWQJY	44
FEWTPAWYQJY	45
FEWTPSarWYQJY	46
FEWTPGYYQPY	47
FEWTPGWWQPY	48
FEWTPNYWQPY	49
FEWTPVYWQJY	50
FEWTPecGYWQJY	51
FEWTPAibYWQJY	52
FEWTSarGYWQJY	53
FEWTPGYWQPYPALPL	54
INapEWTPGYYQJY	55
YEWTPGYYQJY	56
FEWVPGYYQJY	57
FEWTPSYQJY	58
FEWTPNYYQJY	59
TKPR	60
RKSSK	61
RKQDK	62
NRKQDK	63

RKQDKR	64
ENRKQDKRF	65
VTKFYF	66
VTKFY	67
VTDFY	68
SHLYWQPYSVQ	69
TLVYWQPYSLQT	70
RGDYWQPYSVQS	71
VHVVWQPYSVQT	72
RLVYWQPYSVQT	73
SRVWFQPYSLQS	74
NMVYWQPYSIQT	75
SVVFWQPYSVQT	76
TFVYWQPYALPL	77
TLVYWQPYSIQR	78
RLVYWQPYSVQR	79
SPVFWQPYSIQI	80
WIEWWQPYSVQS	81
SLIYWQPYSLQM	82
TRLYWQPYSVQR	83
RCDYWQPYSVQT	84
MRVFWQPYSVQN	85
KIVYWQPYSVQT	86
RHLYWQPYSVQR	87
ALVWWQPYSSEI	88
SRVWFQPYSLQS	89
WEQPYALPLE	90
QLVWWQPYSVQR	91
DLRYWQPYSVQV	92
ELVWWQPYSLQL	93
DLVWWQPYSVQW	94
NGNYWQPYSFQV	95
ELVYWQPYSIQR	96
ELMYWQPYSVQE	97
NLLYWQPYSMQD	98
GYEWYQPYSVQR	99
SRVWYQPYSVQR	100
LSEQYQPYSVQR	101

GGGWWQPYSVQR	102
VGRWYQPYSVQR	103
VHVYWQPYSVQR	104
QARWYQPYSVQR	105
VHVYWQPYSVQT	106
RSVYWQPYSVQR	107
TRVWFQPYSVQR	108
GRIWFQPYSVQR	109
GRVWFQPYSVQR	110
ARTWYQPYSVQR	111
ARVWWQPYSVQM	112
RLMFYQPYSVQR	113
ESMWYQPYSVQR	114
HFGWWQPYSVHM	115
ARFWWQPYSVQR	116
RLVYWQ PYAPIY	117
RLVYWQ PYSYQT	118
RLVYWQ PYSLPI	119
RLVYWQ PYSVQA	120
SRVWYQ PYAKGL	121
SRVWYQ PYAQGL	122
SRVWYQ PYAMPL	123
SRVWYQ PYSVQA	124
SRVWYQ PYSLGL	125
SRVWYQ PYAREL	126
SRVWYQ PYSRQP	127
SRVWYQ PYFVQP	128
EYEWYQ PYALPL	129
IPEYWQ PYALPL	130
SRIWWQ PYALPL	131
DPLFWQ PYALPL	132
SRQWVQ PYALPL	133
IRSWWQ PYALPL	134
RGYWQ PYALPL	135
RLLWVQ PYALPL	136
EYRWFQ PYALPL	137
DAYWVQ PYALPL	138
WSGYFQ PYALPL	139

NIEFWQ PYALPL	140
TRDWWQ PYALPL	141
DSSWYQ PYALPL	142
IGNWYQ PYALPL	143
NLRWDQ PYALPL	144
LPEFWQ PYALPL	145
DSYWWQ PYALPL	146
RSQYYQ PYALPL	147
ARFWLQ PYALPL	148
NSYFWQ PYALPL	149
RFMYWQPYSVQR	150
AHLFWQPYSVQR	151
WWQPYALPL	152
YYQPYALPL	153
YFQPYALGL	154
YWYQPYALPL	155
RWWQPYATPL	156
GWYQPYALGF	157
YWYQPYALGL	158
IWYQPYAMPL	159
SNMQPYQRLS	160
TFVYWQPY AVGLPAAETACN	161
TFVYWQPY SVQMTITGKVTM	162
TFVYWQPY SSHXXVPXGFPL	163
TFVYWQPY YGNPQWAIHVRH	164
TFVYWQPY VLLELPEGAVRA	165
TFVYWQPY VDYVWPIPIAQV	166
GWYQPYVDGWR	167
RWEQPYVKDGWS	168
EWYQPYALGWAR	169
GWWQPYARGL	170
LFEQPYAKALGL	171
GWEQPYARGLAG	172
AWVQPYATPLDE	173
MWYQPYSSQPAE	174
GWTQPYSQQGEV	175
DWFQPYSIQSDE	176
PWIQPYARGFG	177

RPLYWQPYSVQV	178
TLIYWQPYSVQI	179
RFDYWQPYSVQDT	180
WHQFVQPYALPL	181
EWDS VYWQPYSVQ TLLR	182
WEQN VYWQPYSVQ SFAD	183
SDV VYWQPYSVQ SLEM	184
YYDG VYWQPYSVQ VMFA	185
SDIWWQ PYALPL	186
QRIWWQ PYALPL	187
SRIWWQ PYALPL	188
RSLYWQ PYALPL	189
TIIWEQ PYALPL	190
WETWYQ PYALPL	191
SYDWEQ PYALPL	192
SRIWCQ PYALPL	193
EIMFWQ PYALPL	194
DYVWQQ PYALPL	195
MDLLVQ WYQPYALPL	196
GSKVIL WYQPYALPL	197
RQGANI WYQPYALPL	198
GGGDEP WYQPYALPL	199
SQLERT WYQPYALPL	200
ETWVRE WYQPYALPL	201
KKGSTQ WYQPYALPL	202
LQARMN WYQPYALPL	203
EPRSQK WYQPYALPL	204
VKQKWR WYQPYALPL	205
LRRHDV WYQPYALPL	206
RSTASI WYQPYALPL	207
ESKEDQ WYQPYALPL	208
EGLTMK WYQPYALPL	209
EGSREG WYQPYALPL	210
VIEWWQ PYALPL	211
VWYWEQ PYALPL	212
ASEWWQ PYALPL	213
FYEWVWQ PYALPL	214
EGWVWQ PYALPL	215

WGEWLQ PYALPL	216
DYVWEQ PYALPL	217
AHTWWQ PYALPL	218
FIEWFQ PYALPL	219
WLAWEQ PYALPL	220
VMEWWQ PYALPL	221
ERMWQ PYALPL	222
NXXWXX PYALPL	223
WGNWYQ PYALPL	224
TLYWEQ PYALPL	225
VWRWEQ PYALPL	226
LLWTQ PYALPL	227
SRIWXX PYALPL	228
SDIWYQ PYALPL	229
WGYYXX PYALPL	230
TSGWYQ PYALPL	231
VHPYXX PYALPL	232
EHSYFQ PYALPL	233
XXIWYQ PYALPL	234
AQLHSQ PYALPL	235
WANWFQ PYALPL	236
SRLYSQ PYALPL	237
GVTFSQ PYALPL	238
SIVWSQ PYALPL	239
SRDLVQ PYALPL	240
HWGH VYWQPYSVQ DDLG	241
SWHS VYWQPYSVQ SVPE	242
WRDS VYWQPYSVQ PESA	243
TWDA VYWQPYSVQ KWLD	244
TPPW VYWQPYSVQ SLDP	245
YWSS VYWQPYSVQ SVHS	246
YWY QPY ALGL	247
YWY QPY ALPL	248
EWI QPY ATGL	249
NWE QPY AKPL	250
AFY QPY ALPL	251
FLY QPY ALPL	252
VCK QPY LEWC	253

ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	254
QGWLTWQDSVDMYWQPYALPL	255
FSEAGYTPENTYWQPYALPL	256
TESPGGLDWAKIYWQPYALPL	257
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	258
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	259
SVGEDHNFWTSE YWQPYALPL	260
MNDQTSEVSTFP YWQPYALPL	261
SWSEAFEQPRNL YWQPYALPL	262
QYAEPSALNDWG YWQPYALPL	263
NGDWATADWSNY YWQPYALPL	264
THDEHI YWQPYALPL	265
MLEKTYTTWTPG YWQPYALPL	266
WSDPLTRDADL YWQPYALPL	267
SDAFTTQDSQAM YWQPYALPL	268
GDDAAWRTDSL T YWQPYALPL	269
AIIRQLYRWSEM YWQPYALPL	270
ENTYSPNWADSM YWQPYALPL	271
MNDQTSEVSTFP YWQPYALPL	272
SVGEDHNFWTSE YWQPYALPL	273
QTPFTWEESNAY YWQPYALPL	274
ENPFTWQESNAY YWQPYALPL	275
VTPFTWEDSNVF YWQPYALPL	276
QIPFTWEQSNAY YWQPYALPL	277
QAPLTWQESAAY YWQPYALPL	278
EPTFTWEESKAT YWQPYALPL	279
TTILTWEE SNAY YWQPYALPL	280
ESPLTWEESAL YWQPYALPL	281
ETPLTWEESNAY YWQPYALPL	282
EATFTWAESNAY YWQPYALPL	283
EALFTWKESTAY YWQPYALPL	284
STP-TWEESNAY YWQPYALPL	285
ETPFTWEESNAY YWQPYALPL	286
KAPFTWEESQAY YWQPYALPL	287
STSFTWEESNAY YWQPYALPL	288
DSTFTWEESNAY YWQPYALPL	289
YIPFTWEESNAY YWQPYALPL	290
QTAFTWEESNAY YWQPYALPL	291

ETLFTWEESNAT YWQPYALPL	292
VSSFTWEESNAY YWQPYALPL	293
QPYALPL	294
Py-1-NapPYQJYALPL	295
TANVSSFEWTPG YWQPYALPL	296
FEWTPGYWQPYALPL	297
FEWTPGYWQJYALPL	298
FEWTPGYYQJYALPL	299
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	300
FTWEESNAYYWQJYALPL	301
ADVL YWQPYA PVTLWV	302
GDVAE YWQPYA LPLTSL	303
SWTDYG YWQPYA LPISGL	304
FEWTPGYWQPYALPL	305
FEWTPGYWQJYALPL	306
FEWTPGWWQPYALPL	307
FEWTPGWYQJYALPL	308
FEWTPGYYQPYALPL	309
FEWTPGYYQJYALPL	310
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	311
SWTDYGYWQPYALPISGL	312
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	313
ENTYSPNWADSMYWQPYALPL	314
SVGEDHNFWTSEYWQPYALPL	315
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	316
FEWTPGYWQPYALPL	317
FEWTPGYWQPY	318
FEWTPGYWQJY	319
EWTPGYWQPY	320
FEWTPGWYQJY	321
AEWTPGYWQJY	322
FAWTPGYWQJY	323
FEATPGYWQJY	324
FEWAPGYWQJY	325
FEWTAGYWQJY	326
FEWTPAYWQJY	327
FEWTPGAWQJY	328
FEWTPGYAQJY	329

FEWTPGYWQJA	330
FEWTGGYWQJY	331
FEWTPGYWQJY	332
FEWTJGYWQJY	333
FEWTPecGYWQJY	334
FEWTPAibYWQJY	335
FEWTPSarWYQJY	336
FEWTSarGYWQJY	337
FEWTPNYWQJY	338
FEWTPVYWQJY	339
FEWTVPYWQJY	340
AcFEWTPGWYQJY	341
AcFEWTPGYWQJY	342
INap-EWTPGYYQJY	343
YEWTPGYYQJY	344
FEWVPGYYQJY	345
FEWTPGYYQJY	346
FEWTPsYYQJY	347
FEWTPnYYQJY	348
SHLY-Nap-QPYSVQM	349
TLVY-Nap-QPYSLQT	350
RGDY-Nap-QPYSVQS	351
NMVY-Nap-QPYSIQT	352
VYWQPYSVQ	353
VY-Nap-QPYSVQ	354
TFVYWQJYALPL	355
FEWTPGYYQJ-Bpa	356
XaaFEWTPGYYQJ-Bpa	357
FEWTPGY-Bpa-QJY	358
AcFEWTPGY-Bpa-QJY	359
FEWTPG-Bpa-YQJY	360
AcFEWTPG-Bpa-YQJY	361
AcFE-Bpa-TPGYYQJY	362
AcFE-Bpa-TPGYYQJY	363
Bpa-EWTPGYYQJY	364
AcBpa-EWTPGYYQJY	365
VYWQPYSVQ	366
RLVYWQPYSVQR	367

RLVY-Nap-QPYSVQR	368
RLDYWQPYSVQR	369
RLVWFQPYSVQR	370
RLVYWQPYSIQR	371
DNSSWYDSFLL	372
DNTAWYESFLA	373
DNTAWYENFLL	374
PARE DNTAWYDSFLI WC	375
TSEY DNTTWYEFLLA SQ	376
SQIP DNTAWYQSFL HG	377
SPFI DNTAWYENFLL TY	378
EQIY DNTAWYDHFL SY	379
TPFI DNTAWYENFLL TY	380
TYTY DNTAWYERFLM SY	381
TMTQ DNTAWYENFLL SY	382
TI DNTAWYANLVQ TYPQ	383
TI DNTAWYERFLA QYPD	384
HI DNTAWYENFLL TYTP	385
SQ DNTAWYENFLL SYKA	386
QI DNTAWYERFLL QYNA	387
NQ DNTAWYESFLL QYNT	388
TI DNTAWYENFLL NHNL	389
HY DNTAWYERFLQ QGWH	390
ETPFTWEESNAYYWQPYALPL	391
YIPFTWEESNAYYWQPYALPL	392
DGYDRWRQSGERYWQPYALPL	393
pY-INap-pY-QJYALPL	394
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	395
FEWTPGYWQJYALPL	396
FEWTPGYWQPYALPLSD	397
FEWTPGYQJYALPL	398
FEWTPGYWQJY	399
AcFEWTPGYWQJY	400
AcFEWTPGWYQJY	401
AcFEWTPGYQJY	402
AcFEWTPaYWQJY	403
AcFEWTPaWYQJY	404
AcFEWTPaYYQJY	405

FEWTPGYQJYALPL	406
FEWTPGYWQJYALPL	407
FEWTPGWYQJYALPL	408
TANVSSFEWTPGYWQPYALPL	409
AcFEWTPGYWQJY	410
AcFEWTPGWYQJY	411
AcFEWTPGYQJY	412
AcFEWTPAYWQJY	413
AcFEWTPAWYQJY	414
AcFEWTPAYYQJY	415

Tabla 5 - Secuencias de péptidos miméticos de EPO

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
YXCXXGPXTWXCXP	416
YXCXXGPXTWXCXP-YXCXXGPXTWXCXP	417
YXCXXGPXTWXCXP- Λ -YXCXXGPXTWXCXP	418
<p>YXCXXGPXTWXCXP-Λ-</p> <p>YXCXXGPXTWXCXP-Λ-</p>	419
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	420
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	421
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	422
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	423
GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	424
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG-	425
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG - Λ -	426
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	427
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK-	428
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK- Λ -	429
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK	

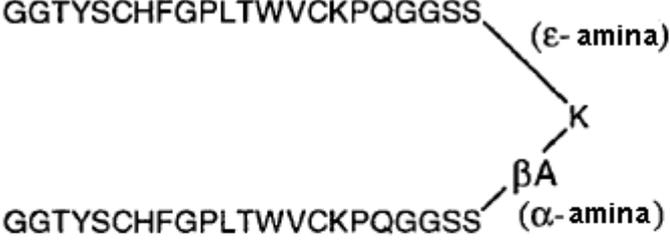
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSS  GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSS	430
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGGSSK(□Λ -biotina)	431
CX ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ C	432
GGTYSCHGPLTWVCKPQGG	433
VGNYMAHMGPITWVCRPGG	434
GPPHHVYACRMGPLTWIC	435
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	436
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	437
TIAQYICYMGPETWECRPSKA	438
YSCHFGPLTWVCK	439
YCHFGPLTWVC	440
X ₃ X ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ X ₈	441
YX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ X ₈	442
X ₁ YX ₂ X ₃ X ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ X ₈ X ₉ X ₁₀ X ₁₁	443
X ₁ YX ₂ CX ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ CX ₉ X ₁₀ X ₁₁	444
GGLYLCRFGPVTWDCGYKGG	445
GGTYSCHFGPLTWVCKPQGG	446
GGDYHCRMGPLTWVCKPLGG	447
VGNYMCHFGPITWVCRPGGG	448
GGVYACRMGPITWVCSPLGG	449
VGNYMAHMGPITWVCRPGG	450
GGTYSCHFGPLTWVCKPQ	451
GGLYACHMGPMTWVCQPLRG	452
TIAQYICYMGPETWECRPSKA	453
YSCHFGPLTWVCK	454
YCHFGPLTWVC	455
SCHFGPLTWVCK	456
(AX ₂) _n X ₃ X ₄ X ₅ GPX ₆ TWX ₇ X ₈	457
X _n CX ₁ X ₂ GWVGX ₃ CX ₄ X ₅ WX _C	458

Tabla 6 – Secuencias de péptidos miméticos de TPO

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
IEGPTLRQWLAARA	459
IEGPTLRQWLAACA	460
IEGPTLRQWLAARA	461
IEGPTLRQWLAARA- Λ -IEGPTLRQWLAARA	462
IEGPTLRQWLAACA- Λ -IEGPTLRQWLAACA	463
IEGPTLRQCLAARA- Λ -IEGPTLRQCLAARA -----	464
IEGPTLRQWLAARA- Λ -K(BrAc)- Λ -IEGPTLRQWLAARA	465
IEGPTLRQWLAARA- Λ -K(PEG)- Λ -IEGPTLRQWLAARA	466
IEGPTLRQCLAARA- Λ -IEGPTLRQWLAARA 	467
IEGPTLRQWLAARA- Λ -IEGPTLRQCLAARA 	468
IEGPTLRQWLAARA- Λ -IEGPTLRQCLAARA	
VRDQIXXXL	469
TLREWL	470
GRVRDQVAGW	471
GRVKDQIAQL	472
GVRDQVSWAL	473
ESVREQVMKY	474
SVRSQISASL	475
GVRETVYRHM	476
GVREVIVMHML	477
GRVRDQIWAAL	478
AGVRDQILIWL	479
GRVRDQIMLSL	480
GRVRDQI(X) ₃ L	481
CTLRQWLQGC	482
CTLQEFLEGC	483

CTRTEWLHGC	484
CTLREWLHGGFC	485
CTLREWVFAGLC	486
CTLRQWLILLGMC	487
CTLAEFLASGVEQC	488
CSLQEFLSHGGYVC	489
CTLREFLDPTTAVC	490
CTLKEWLVSHEVWC	491
CTLREWL(X) ₂₋₆ C	492
REGPTLRQWM	493
EGPTLRQWLA	494
ERGPFWAKAC	495
REGPRCVMWM	496
CGTEGPTLSTWLDC	497
CEQDGPTLLEWLKC	498
CELVGPSLMSWLTC	499
CLTGPFVTQWLYEC	500
CRAGPTLLEWLTLC	501
CADGPTLREWISFC	502
C(X) ₁₋₂ EGPTLREWL(X) ₁₋₂ C	503
GGCTLREWLHGGFCGG	504
GGCADGPTLREWISFCGG	505
GNADGPTLRQWLEGRRPKN	506
LAIEGPTLRQWLHGNGRDT	507
HGRVGPTLREWKTQVATKK	508
TIKGPTLRQWLKSREHTS	509
ISDGPTLKEWLSVTRGAS	510
SIEGPTLREWLTSTRTPHS	511

Tabla 7 – Secuencias de péptidos miméticos de G-CSF

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
EEDCK	512
EEDCK EEDCK	513
EEDσK	514
EEDσK EEDσK	515
pGluEDσK	516
pGluEDσK pGluEDσK	517
PicSDσK	518
PicSDσK 	519
PicSDσK	
EEDCK-Λ-EEDCK	520
EEDXK-Λ-□EEDXK	521

Tabla 8 – Secuencias de péptidos antagonistas de TNF

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
YCFTASENHCY	522
YCFTNSENHCY	523
YCFTRSENHCY	524
FCASENHCY	525
YCASENHCY	526
FCNSENHCY	527
FCNSENRCY	528
FCNSVENRCY	529
YCSQSVSNDCF	530
FCVSNDRCY	531
YCRKELGQVCY	532
YCKEPGQCY	533
YCRKEMGCY	534
FCRKEMGCY	535
YCWSQNLGY	536
YCELSQYLCY	537
YCWSQNYCY	538
YCWSQYLCY	539
DFLPHYKNTSLGHRP	540
AA ₁ -AB ₁ \ AC / AA ₂ -AB ₂	NR

Tabla 9 – Secuencias de péptidos de unión a integrina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RX ₁ ETX ₂ WX ₃	541
RX ₁ ETX ₂ WX ₃	542

RGDGX	543
CRGDGXC	544
CX ₁ X ₂ RLDX ₃ X ₄ C	545
CARRLDAPC	546
CPSRLDSPC	547
X ₁ X ₂ X ₃ RGDX ₄ X ₅ X ₆	548
CX ₂ CRGDCX ₅ C	549
CDCRGDCFC	550
CDCRGDCLC	551
CLCRGDCIC	552
X ₁ X ₂ DDX ₄ X ₅ X ₇ X ₈	553
X ₁ X ₂ X ₃ DDX ₄ X ₅ X ₆ X ₇ X ₈	554
CWDDGWLC	555
CWDDLWWLC	556
CWDDGLMC	557
CWDDGWMC	558
CSWDDGWLC	559
CPDDLWWLC	560
NGR	NR
GSL	NR
RGD	NR
CGRECPRLCQSSC	561
CNGRCVSGCAGRC	562
CLSGSLSC	563
RGD	NR
NGR	NR
GSL	NR
NGRAHA	564
CNGRC	565
CDCRGDCFC	566
CGSLVRC	567
DLXXL	568

RTDLDSLRTYTL	569
RTDLDSLRTY	570
RTDLDSLRT	571
RTDLDSLRL	572
GDLDLLKLRLTL	573
GDLHSLRQLLSR	574
RDDLHMLRLQLW	575
SSDLHALKKRYG	576
RGDLKQLSELTW	577
RGDLAALSAPPV	578

Tabla 10 – Secuencias de péptidos antagonistas de selectina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
DITWDQLWDLMK	579
DITWDELWKIMN	580
DYTWFEWDMMQ	581
QITWAQLWNMMK	582
DMTWHDLWTLMS	583
DYSWHDLWEMMS	584
EITWDQLWEVMN	585
HVSWEQLWDIMN	586
HITWDQLWRIMT	587
RNMSWLELWEHMK	588
AEWTWDQLWHVMNPAESQ	589
HRAEWLALWEQMSP	590
KKEDWLALWRIMSV	591
ITWDQLWDLMK	592
DITWDQLWDLMK	593
DITWDQLWDLMK	594
DITWDQLWDLMK	595
CQRYTDLVAIQNKNE	596
AENWADNEPNNKRNNED	597
RKNNKTWTWVGTKKALTNE	598
KKALTNEAENWAD	599
CQXRYTDLVAIQNKXE	600
RKXNXXWTWVGTXKXLTEE	601
AENWADGEPNNKXNXED	602
CXXXYTXLVAIQNKXE	603
RKXXXXWXWVGTXKXLTXE	604
AXNWXXXEPNNXXXED	605
XKXKTXEAXNWXX	606

Tabla 11 – Secuencias de péptidos antipatógenos

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSSGGQQ	607
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAVGSALSSSSGGQE	608
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	609
GFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	610
KGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	611
KKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	612
KKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAV	613
GFFALIPKIIS	614
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	615
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	616
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKRKRQQ	617
GIGAVLKVLTTGLPALISWIKR	618
AVLKVLTTGLPALISWIKR	619
KLLLLKLLLLK	620
KLLKLLKLLK	621
KLLKLLKLLK	622
KLLKLLKLLK	623
KLLKLLKLLK	624
KLLKLLKLLK	625
KLLLK	626
KLLKLLK	627
KLLKLLKLLK	628
KLLKLLKLLK	629
KLLKLLKLLK	630
KAAAKAAAKAAK	631
KVVVKVVVKVVK	632
KVVVKVVVKVVK	633
KVVVKVVVKVVK	634
KVVVKVVVKVVK	635
KLILKL	636

KVLHLL	637
LKLRL	638
KPLHLL	639
KLILKLV	640
KVFHLLH	641
HKFRILK	642
KPFHILH	643
KIKIKIKIK	644
KIKIKIKIK	645
KIKIKIKIK	646
KIKIKIKIK	647
KIKIKIKIK	648
RIIRIRIRI	649
RIIRIRIRI	650
RIIRIRIRI	651
RIVIRIRIR	652
RIIVRIRIR	653
RIGIRLRVRI	654
KIVIRIRIR	655
RIAVKWRLRFIK	656
KIGWKLVRVRI	657
KKIGWLIIRVRR	658
RIVIRIRIRIR	659
RIIVRIRIRIRV	660
RIGIRLRVRIIRV	661
KIVIRIRARLIRIR	662
RIIVKIRLRIKKIRL	663
KIGIKARVRIIRVKII	664
RIIVHIRLRIIHHIRL	665
HIGIKAHVRIIRVHII	666
RIYVKIHLRYIKKIRL	667
KIGHKARVHIIRYKII	668
RIYVKPHPRYIKKIRL	669

KPGHKARPHIIRYKII	670
KIVIRIRIRLIRIRIRKIV	671
RIIVKIRLRIKKIRLIKK	672
KIGWKLVRRIIRVKIGRLR	673
KIVIRIRIRLIRIRIRKIVKVKRIR	674
RFAVKIRLRIKKIRLIKKIRKRVIK	675
KAGWKLVRRIIRVKIGRLRKIGWKKRVIK	676
RIYVKPHPRYIKKIRL	677
KPGHKARPHIIRYKII	678
KIVIRIRIRLIRIRIRKIV	679
RIIVKIRLRIKKIRLIKK	680

RIYVSKISIIYIKKIRL	681
KIVIFTRIRLTSIRIRSIV	682
KPIHKARPTIIRYKMI	683
CKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC <i>cíelica</i>	684
CKKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC	685
CKKKGFFALIPKIISSPLFKTLLSAVC	686
CRIVIRIRIRLIRIRC <i>cíelica</i>	687
CKPGHKARPHIIRYKIIIC <i>cíelica</i>	688
CRFAVKIRLRIKKIRLIKKIRKRVIKC <i>cíelica</i>	689
KLLKLLL KLLKC	690
KLLKLLLKLLK	691
KLLKLLKLLKC	692
KLLKLLLKLLK	693

KKYL	722
KKYDA	723
AVKKYL	724
NSILN	725
KKYV	726
SILauN	727
NSYLN	728
NSIYN	729
KKYLNle	730
KKYLPPNSILN	731
KKYL	732
KKYDA	733
AVKKYL	734
NSILN	735
KKYV	736
SILauN	737
LauKKYL	738
CapKKYL	739
KYL	740
KYL	741
KKYNle	742
VKKYL	743
LNSILN	744
YLNSILN	745
KKYLNle	746
KKYLN	747
KKYLNS	748
KKYLNSI	749
KKYLNSIL	750

KKKYLD	751
CKKYLC ciclica	752
CKKYLK S-CH ₂ -CO	753
KKYA	754
WWTDTGLW	755
WWTDDGLW	756
WWDTRGLWVWTI	757
FWGNDGIWLESG	758
DWDQFGLWRGAA	759
RWDDNGLWVVVL	760
SGMWSHYGIWMG	761
GGRWDQAGLWVA	762
KLWSEQGIWMGE	763
CWSMHGLWLC	764
GCWDNTGIWVPC	765
DWDTRGLWVY	766
SLWDENGAWI	767
KWDDRGLWMH	768
QAWNERGLWT	769
QWDTRGLWVA	770
WNVHGIWQE	771
SWDTRGLWVE	772
DWDTRGLWVA	773
SWGRDGLWIE	774
EWTDNGLWAL	775
SWDEKGLWSA	776
SWDSSGLWMD	777

Tabla 13 – Secuencias de péptidos antagonistas de Mdm/hdm

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

Tabla 14 – Secuencias de péptidos antagonistas de calmodulina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SCVKWKGKKEFCGS	795
SCWKYWGKECGS	796
SCYEWGKLRWCGS	797
SCLRWGKWSNCGS	798
SCWRWGKYQICGS	799
SCVSWGALKLCGS	800
SCIRWGQNTFCGS	801
SCWQWGNLKICGS	802
SCVRWGQLSICGS	803
LKKFNARRKLKGAILTTMLAK	804
RRWKKNFIAVSAANRFKK	805
RKWQKTGHAVRAIGRLSS	806
INLKALAALAKKIL	807
KIWSILAPLGTTLVKLVA	808
LKKLLKLLKLLKL	809
LKWKKLLKLLKLLKLL	810
AEWPSLTEIKTLSHFSV	811
AEWPSPTRVISTTYFGS	812
AELAHWPPVKTVLRSFT	813
AEGSWLQLLNLMKQMNN	814
AEWPSLTEIK	815

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

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SGSGVLKRPLPILPVTR	816
RWLSSRPLPPLPLPRT	817
GSGSYDTLALPSLPLHPMSS	818
GSGSYDTRALPSLPLHPMSS	819
GSGSSGVTMYPKLPPHWSMA	820
GSGSSGVRMYPKLPPHWSMA	821
GSGSSSMRMVPTIPGSAKHG	822
RNR	NR
QT	NR
RQK	NR
NRQ	NR
RQK	NR
RNRQKT	823
RNRQ	824
RNRQK	825
NRQKT	826
RQKT	827

Tabla 16 – Secuencias de péptidos antagonistas de SH3

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
RPLPPLP	828
RELPPLP	829
SPLPPLP	830
GPLPPLP	831
RPLPIPP	832
RPLPIPP	833
RRLPPTP	834
RQLPPTP	835
RPLPSRP	836
RPLPTRP	837
SRLPPLP	838
RALPSPP	839
RRLPRTP	840

RPVPPIT	841
ILAPPVP	842
RPLPMLP	843
RPLPILP	844
RPLPSLP	845
RPLPSLP	846
RPLPMIP	847
RPLPLIP	848
RPLPPTP	849
RSLPPLP	850
RPQPPPP	851
RQLPIPP	852
XXXRPLPPLXP	853
XXXRPLPIPXX	854
XXXRPLPPLPXX	855
RXXRPLPPLXP	856
RXXRPLPPLPP	857
PPPYPPPIPXX	858
PPPYPPPVXX	859
LXXRPLXPXP	860
YXXRPLPXL	861
PPXOXPPPYP	862
+PPYPXKXWL	863
RPXPYPYR+SXP	864
PPVPPRPXXTL	865
YYPYLPYK	866
+OXPLPXL	867

Tabla 17 – Secuencias de péptidos miméticos de somatostatina o cortistatina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
X^1-X^2 -Asn-Phe-Phe-Trp-Lys-Thr-Phe- X^3 -Ser- X^4	868
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	869
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	870
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	871
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	872
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	873
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	874
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	875
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	876
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys Lys	877
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	878
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	879
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Ser Ser Cys	880
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	881
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	882
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	883
Asp Arg Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	884
Met Pro Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	885
Cys Arg Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	886
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	887
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	888
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys Lys	889
Asp Arg Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	890
Met Pro Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	891
Cys Lys Asn Phe Phe Trp Lys Thr Phe Thr Ser Cys	892

Tabla 18 – Secuencias de péptidos antagonistas de UKR

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
AEPMPHSLNFSQYLWYT	893
AEHTYSSLWDTYSPLAF	894
AELDLWMRHYPLSFSNR	895
AESSLWTRYAWPSMPST	896
AEWHPGLSFGSYLWSKT	897
AEPALLNWSFFFNPGLH	898
AEWSFYNLHLPEPQTIF	899
AEPLDLWSLYSLPPLAM	900
AEPTLWQLYQFPLRLSG	901
AEISFSELMWLRSTPAF	902
AELSEADLWTTWFGMGS	903
AESSLWRIFSPSALMMS	904
AESLPTLTSILWGKESV	905
AETLFMDLWHDKHILLT	906
AEILNFPLWHEPLWSTE	907
AESQTGTLNTLFWNTR	908
AEPVYQYELDSYLRSY	909
AELDLSTFYDIQYLLRT	910
AEFFKLGPNGYVYLHSA	911
FKLXXXGYVYL	912
AESTYHHLSLGYMYTLN	913
YHXLXXGYMYT	914

Tabla 19 – Secuencias de péptidos inhibidores de macrófagos y/o células T

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

Asn-Glu-Arg	NR
Asp-Glu-Arg	NR
Cys-Glu-Arg	NR
Gln-Glu-Arg	NR
Glu-Glu-Arg	NR
Gly-Glu-Arg	NR
His-Glu-Arg	NR
Ile-Glu-Arg	NR
Leu-Glu-Arg	NR
Lys-Glu-Arg	NR
Met-Glu-Arg	NR
Phe-Glu-Arg	NR
Pro-Glu-Arg	NR
Ser-Glu-Arg	NR
Thr-Glu-Arg	NR
Trp-Glu-Arg	NR
Tyr-Glu-Arg	NR
Val-Glu-Arg	NR
Arg-Ala	NR
Arg-Asp	NR
Arg-Cys	NR
Arg-Gln	NR
Arg-Glu	NR
Arg-Gly	NR
Arg-His	NR
Arg-Ile	NR
Arg-Leu	NR
Arg-Lys	NR
Arg-Met	NR
Arg-Phe	NR

Arg-Pro	NR
Arg-Ser	NR
Arg-Thr	NR
Arg-Trp	NR
Arg-Tyr	NR
Arg-Val	NR
Arg-Glu-Ala	NR
Arg-Glu-Asn	NR
Arg-Glu-Asp	NR
Arg-Glu-Cys	NR
Arg-Glu-Gln	NR
Arg-Glu-Glu	NR
Arg-Glu-Gly	NR
Arg-Glu-His	NR
Arg-Glu-Ile	NR
Arg-Glu-Leu	NR
Arg-Glu-Lys	NR
Arg-Glu-Met	NR
Arg-Glu-Phe	NR
Arg-Glu-Pro	NR
Arg-Glu-Ser	NR
Arg-Glu-Thr	NR
Arg-Glu-Trp	NR
Arg-Glu-Tyr	NR
Arg-Glu-Val	NR
Ala-Arg-Glu	NR
Arg-Arg-Glu	NR
Asn-Arg-Glu	NR
Asp-Arg-Glu	NR
Cys-Arg-Glu	NR
Gln-Arg-Glu	NR
Glu-Arg-Glu	NR
Gly-Arg-Glu	NR

His-Arg-Glu	NR
Ile-Arg-Glu	NR
Leu-Arg-Glu	NR
Lys-Arg-Glu	NR
Met-Arg-Glu	NR
Phe-Arg-Glu	NR
Pro-Arg-Glu	NR
Ser-Arg-Glu	NR
Thr-Arg-Glu	NR
Trp-Arg-Glu	NR
Tyr-Arg-Glu	NR
Val-Arg-Glu	NR
Glu-Arg-Ala,	NR
Glu-Arg-Arg	NR
Glu-Arg-Asn	NR
Glu-Arg-Asp	NR
Glu-Arg-Cys	NR
Glu-Arg-Gln	NR
Glu-Arg-Gly	NR
Glu-Arg-His	NR
Glu-Arg-Ile	NR
Glu-Arg-Leu	NR
Glu-Arg-Lys	NR
Glu-Arg-Met	NR
Glu-Arg-Phe	NR
Glu-Arg-Pro	NR
Glu-Arg-Ser	NR
Glu-Arg-Thr	NR
Glu-Arg-Trp	NR
Glu-Arg-Tyr	NR
Glu-Arg-Val	NR

Tabla 20 – Péptidos farmacológicamente activos a modo de ejemplo adicionales

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:	Actividad
VEPNCDIHVMWEWECFERL	915	antagonista de VEGF
GERWCFDGPLTWVCGEES	916	antagonista de VEGF
RGWVEICVADDNGMCVTEAQ	917	antagonista de VEGF
GWDECDVARMWEWECFAGV	918	antagonista de VEGF
GERWCFDGPRAWVCGWEI	919	antagonista de VEGF
EELWCFDGPRAWVCGYVK	920	antagonista de VEGF
RGWVEICAADDYGRCLTEAQ	921	antagonista de VEGF
RGWVEICESDVWGRCL	922	antagonista de VEGF
RGWVEICESDVWGRCL	923	antagonista de VEGF
GGNECDIARMWEWECFERL	924	antagonista de VEGF
RGWVEICAADDYGRCL	925	antagonista de VEGF
CTTHWGF TLC	926	inhibidor de MMP
CLRSGXGC	927	inhibidor de MMP
CXXHWGFXXC	928	inhibidor de MMP

CXPXC	929	inhibidor de MMP
CRRHWGFEFC	930	inhibidor de MMP
STTHWGFTLS	931	inhibidor de MMP
CSLHWGFWWC	932	compuesto mimético de CTLA4
GFVCSGIFAVGVGRC	933	compuesto mimético de CTLA4
APGVRLGCAVLGRYC	934	compuesto mimético de CTLA4
LLGRMK	935	Antiviral (VHB)
ICVVQDWGHRCTAGHMANLTSHASAI	936	antagonista de C3b
ICVVQDWGHRCT	937	antagonista de C3b
CVVQDWGHHAC	938	antagonista de C3b
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	939	unión a vinculina
STGGFDDVYDWARRVSSALTTTLVATR	940	unión a vinculina
SRGVNFSEWLYDMSAAMKEASNVFPSRRSR	941	unión a vinculina
SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	942	unión a vinculina
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	943	unión a vinculina
SSTGWVDLLGALQRAADATRSTSIPPSLQNSR	944	unión a vinculina
DVYTKKELIECARRVSEK	945	unión a vinculina
EKGSYYPGSGIAQFHIDYNNVS	946	unión a C4BP
SGIAQFHIDYNNVSSAEGWHVN	947	unión a C4BP
LVTVEKGSYYPGSGIAQFHIDYNNVSSAEGWHVN	948	unión a C4BP
SGIAQFHIDYNNVS	949	unión a C4BP
LLGRMK	950	anti-VHB
ALLGRMKG	951	anti-VHB
LDPAFR	952	anti-VHB
CXXRGDC	953	Inhibición de la agregación plaquetaria

RPLPPLP	954	antagonista de Src
PPVPPR	955	antagonista de Src
XFDXWXXLXX	956	Anti-cáncer (especialmente para sarcomas)
KACRRLFGPVDSEQLSRDCD	957	compuesto mimético de p16
RERWNFDVFTETPLEGDFAW	958	compuesto mimético de p16
KRRQTSMTDFYHSKRRLIFS	959	compuesto mimético de p16
TSMTDFYHSKRRLIFSKRKP	960	compuesto mimético de p16
RRLIF	961	compuesto mimético de p16
KRRQTSATDFYHSKRRLIFSRQIKIWFQNRRMKWKK	962	compuesto mimético de p16
KRRLIFSKRQIKIWFQNRRMKWKK	963	compuesto mimético de p16

Asn Gln Gly Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys Phe Gln	964	compuesto mimético CAP37/unión a LPS
Arg His Phe Cys Gly Gly Ala Leu Ile His Ala Arg Phe Val Met Thr Ala Ala Ser Cys	965	compuesto mimético CAP37/unión a LPS
Gly Thr Arg Cys Gln Val Ala Gly Trp Gly Ser Gln Arg Ser Gly Gly Arg Leu Ser Arg Phe Pro Arg Phe Val Asn Val	966	compuesto mimético CAP37/unión a LPS
WHWRHRIPLQLAAGR	967	compuesto mimético de hidrato de carbono (GD1 alfa)
LKTPRV	968	unión a Ac frente a β 2GPI
NLTKTPRV	969	unión a Ac frente a β 2GPI
NLTKTPRVGGC	970	unión a Ac frente a β 2GPI
KDKATF	971	unión a Ac frente a β 2GPI
KDKATFGCHD	972	unión a Ac frente a β 2GPI
KDKATFGCHDGC	973	unión a Ac frente a β 2GPI
TLRVYK	974	unión a Ac frente a β 2GPI
ATLRVYKGG	975	unión a Ac frente a β 2GPI
CATLRVYKGG	976	unión a Ac frente a β 2GPI
INLKALAALAKKIL	977	Transporte a través de membrana
GWT	NR	Transporte a través de membrana
GWTLNSAGYLLG	978	Transporte a través de membrana
GWTLNSAGYLLGKINLKALAALAKKIL	979	Transporte a través de membrana

CVHAYRS	980	Antiproliferativo, antiviral
CVHAYRA	981	Antiproliferativo, antiviral
CVHAPRS	982	Antiproliferativo, antiviral
CVHAPRA	983	Antiproliferativo, antiviral
CVHSYRS	984	Antiproliferativo, antiviral
CVHSYRA	985	Antiproliferativo, antiviral
CVHSPRS	986	Antiproliferativo, antiviral
CVHSPRA	987	Antiproliferativo, antiviral
CVHTYRS	988	Antiproliferativo, antiviral
CVHTYRA	989	Antiproliferativo, antiviral
CVHTPRS	990	Antiproliferativo, antiviral
CVHTPRA	991	Antiproliferativo, antiviral
HWAWFK	992	antisquémico, liberador de hormona del crecimiento

TABLA 21 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MIOSTATINA

NOMBRE DE PEPTICUERPO	SEQ ID	SECUENCIA PEPTÍDICA
Miostatina -TN8-Con1	1036	KDKCKMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-Con2	1037	KDLCAMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-Con3	1038	KDLCKMWKWMCKPP
Miostatina -TN8-Con4	1039	KDLCKMWHWMCKPK
Miostatina -TN8-Con5	1040	WYPCYEFHFWCYDL
Miostatina -TN8-Con6	1041	WYPCYEGHFWCYDL
Miostatina -TN8-Con7	1042	IFGCKWWDVQCYQF
Miostatina -TN8-Con8	1043	IFGCKWWDVDCYQF
Miostatina -TN8-Con9	1044	ADWCVSPNWFCMVM
Miostatina -TN8-Con10	1045	HKFCPWWALFCWDF
Miostatina -TN8-1	1046	KDLCKMWHWMCKPP
Miostatina -TN8-2	1047	IDKCAIWGWMCPPL
Miostatina -TN8-3	1048	WYPCGEFGMWCLNV
Miostatina -TN8-4	1049	WFTCLWNCNE
Miostatina -TN8-5	1050	HTPCPWFAPLCVEW
Miostatina -TN8-6	1051	KEWCWRWKWMCKPE
Miostatina -TN8-7	1052	FETCPSWAYFCLDI
Miostatina -TN8-8	1053	AYKCEANDWGCWWL
Miostatina -TN8-9	1054	NSWCEDQWHRCWWL
Miostatina -TN8-10	1055	WSACYAGHFWCYDL
Miostatina -TN8-11	1056	ANWCVSPNWFCMVM
Miostatina -TN8-12	1057	WTECYQQEFWCWNL

Miostatina-TN8-13	1058	ENTCERWKWMCPPK
Miostatina-TN8-14	1059	WLPCHQEGFWCMNF
Miostatina-TN8-15	1060	STMCSQWHWMCNPF
Miostatina-TN8-16	1061	IFGCHWWDVDCYQF
Miostatina-TN8-17	1062	IYGCKWWDIQCYDI
Miostatina-TN8-18	1063	PDWCIDPDWWCKFW
Miostatina-TN8-19	1064	QGHCTRWPWMCPPY
Miostatina-TN8-20	1065	WQECYREGFWCLQT
Miostatina-TN8-21	1066	WFDCYGPFGKCWSP
Miostatina-TN8-22	1067	GVRCPKGLHWCLYP
Miostatina-TN8-23	1068	HWACGYWPWSCKWV
Miostatina-TN8-24	1069	GPACHSPWWCVFG
Miostatina-TN8-25	1070	TTWCISPMWFCSQQ
Miostatina-TN8-26	1071	HKFCPPWAIFCWDF
Miostatina-TN8-27	1072	PDWCVSPRWYCNMW
Miostatina-TN8-28	1073	VWKCHWFGMDCEPT
Miostatina-TN8-29	1074	KKHCQIWTWMCAPK
Miostatina-TN8-30	1075	WFQCGSTLFWCYNL
Miostatina-TN8-31	1076	WSPCYDHYFYCYTI
Miostatina-TN8-32	1077	SWMCGFFKEVCMWV
Miostatina-TN8-33	1078	EMLCMIHPVFCNPH
Miostatina-TN8-34	1079	LKTCNLWPWMCPL
Miostatina-TN8-35	1080	VVGCKWYEAWCYNK
Miostatina-TN8-36	1081	PIHCTQWAWMCPT
Miostatina-TN8-37	1082	DSNCPWYFLSCVIF
Miostatina-TN8-38	1083	HIWCNLAMMKCVEM
Miostatina-TN8-39	1084	NLQCIYFLGKCIYF
Miostatina-TN8-40	1085	AWRCMWFSDVCTPG
Miostatina-TN8-41	1086	WFRCLDADWCTSV
Miostatina-TN8-42	1087	EKICQMWSWMCAPP
Miostatina-TN8-43	1088	WFYCHLNKSECTEP
Miostatina-TN8-44	1089	FWRCAIGIDKCKRV

ES 2 599 318 T3

Miostatina-TN8-45	1090	NLGCKWYEVWCFTY
Miostatina-TN8-46	1091	IDLCNMWDGMCYPP
Miostatina-TN8-47	1092	EMPCNIWGWMCPPV
Miostatina-TN12-1	1093	WFRCVLTGIVDWSECFGL
Miostatina-TN12-2	1094	GFSCTFGLDEFYVDCSPF
Miostatina-TN12-3	1095	LPWCHDQVNADWGFCLW

Miostatina-TN12-4	1096	YPTCSEKFWIYGQTCVLW
Miostatina-TN12-5	1097	LGPCPIHHGPWPQYCVYW
Miostatina-TN12-6	1098	PFPCEHQISWLGHCLSF
Miostatina-TN12-7	1099	HWGCEDLMWSWHPLCRRP
Miostatina-TN12-8	1100	LPLCADMMPTIGFCVAY
Miostatina-TN12-9	1101	SHWCETTFWMNYAKCVHA
Miostatina-TN12-10	1102	LPKCTHVPFDQGGFCLWY
Miostatina-TN12-11	1103	FSSCWSPVSRQDMFCVYF
Miostatina-TN12-13	1104	SHKCEYSGWLQPLCYRP
Miostatina-TN12-14	1105	PWWCQDNVYVQHMLHCDSP
Miostatina-TN12-15	1106	WFRCLMNSFDAFQCVSY
Miostatina-TN12-16	1107	PDACRDQPWYMFMGMLG
Miostatina-TN12-17	1108	FLACFVEFELCFDS
Miostatina-TN12-18	1109	SAYCIITESDPYVLCVPL
Miostatina-TN12-19	1110	PSICESYSTMWLPMCQHN
Miostatina-TN12-20	1111	WLDCHDDSWAWTKMCRSH
Miostatina-TN12-21	1112	YLNVCMMNTSPFVECVFN
Miostatina-TN12-22	1113	YPWCDGFMIIQQGITCMFY
Miostatina-TN12-23	1114	FDYCTWLNGFKDWKCWSR
Miostatina-TN12-24	1115	LPLCNLKEISHVQACVLF
Miostatina-TN12-25	1116	SPECAFARWLIEGQCQRD
Miostatina-TN12-26	1117	YPQCFNLHLEWTECDWF
Miostatina-TN12-27	1118	RWRCEIYDSEFLPKCFFF
Miostatina-TN12-28	1119	LVGCDNVWHRCKLF
Miostatina-TN12-29	1120	AGWCHVWGEMFGMGCSAL
Miostatina-TN12-30	1121	HHECEWMARWMSLDCVGL
Miostatina-TN12-31	1122	FPMCGIAGMKDFDFCVWY
Miostatina-TN12-32	1123	RDDCTFWPEWLWKLCEP
Miostatina-TN12-33	1124	YNFCSYLFGVSKEACQLP
Miostatina-TN12-34	1125	AHWCEQGPWRYGNICMAY
Miostatina-TN12-35	1126	NLVCGKISAWGDEACARA

Miostatina-TN12-36	1127	HNVCTIMGPSMKWFCWND
Miostatina-TN12-37	1128	NDLCAMWGWRNTIWCQNS
Miostatina-TN12-38	1129	PPFCQNDNDMLQSLCKLL
Miostatina-TN12-39	1130	WYDCNVPNELLSGLCRLF
Miostatina-TN12-40	1131	YGDCDQNHWMWPFTCLSL
Miostatina-TN12-41	1132	GWMCHFDLHDWGATCQPD
Miostatina-TN12-42	1133	YFHCMFEGGHEFEVHCESF

Miostatina-TN12-43	1134	AYWCWHGQCVRF
Miostatina-Lineal -1	1135	SEHWTFTDWDGNEWVVRPF
Miostatina-Lineal -2	1136	MEMLDSLFELLKDMVPISKA
Miostatina-Lineal -3	1137	SPPEEALMEWLGWQYGKFT
Miostatina-Lineal -4	1138	SPENLLNDLYILMTKQEWYG
Miostatina-Lineal -5	1139	FHWEEGIPFHVVTPYSYDRM
Miostatina-Lineal -6	1140	KRLLEQFMNDLAELVSGHS
Miostatina-Lineal -7	1141	DTRDALFQEFYEFVRSRLVI
Miostatina-Lineal -8	1142	RMSAAPRPLTYRDIMDQYWH
Miostatina-Lineal -9	1143	NDKAHFFEMFMFDVHNFVES
Miostatina-Lineal -10	1144	QTQAQKIDGLWELLQSIRNQ
Miostatina-Lineal -11	1145	MLSEFEFLGNLVHRQEA
Miostatina-Lineal -12	1146	YTPKMGSEWTSFWHNRIHYL
Miostatina-Lineal -13	1147	LNDTLLRELKMVLNLSLSDMK
Miostatina-Lineal -14	1148	FDVERDLMRWLEGFMQSAAT
Miostatina-Lineal -15	1149	HHGWNYLKRGSAQWFEAWV
Miostatina-Lineal -16	1150	VESLHQLQMWLDQKLASGPH
Miostatina-Lineal -17	1151	RATLLKDFWQLVEGYGDN
Miostatina-Lineal -18	1152	EELLREFYRFVSAFDY
Miostatina-Lineal -19	1153	GLLDEFSHFIAEQFYQMPGG
Miostatina-Lineal -20	1154	YREMSMLEGLLDVLERLQHY
Miostatina-Lineal -21	1155	HNSSQMLLSELIMLVGSMQ
Miostatina-Lineal -22	1156	WREHFLNSDYIRDKLIADG
Miostatina-Lineal -23	1157	QFPFYVFDDLPAQLEYWIA
Miostatina-Lineal -24	1158	EFFHWLHNRSEVNHWLDMN
Miostatina-Lineal -25	1159	EALFQNFVRDVLTLSEREY
Miostatina-Lineal -26	1160	QYWEQQWMTYFRENGLHVQY
Miostatina-Lineal -27	1161	NQRMMLEDLWRIMTPMFGRS
Miostatina-Lineal -29	1162	FLDELKAELSRHYALDDLDE
Miostatina-Lineal -30	1163	GKLIEGLLNELMQLETMPD
Miostatina-Lineal -31	1164	ILLLDEYKKDWKSWF
Miostatina-2xTN8-19 kc	1165	QGHCTRWPWMCPPYGSGSATGGSGSTASSGSGSATG QGHCTRWPWMCPPY
Miostatina-2xTN8-con6	1166	WYPCYEGHFWCYDLGSGSTASSGSGSATGWYPCYEG HFWCYDL
Miostatina-2xTN8-5 kc	1167	HPCPWFAPLCVEWGSGSATGGSGSTASSGSGSATGH TPCPWFAPLCVEW

Miostatina-2xTN8-18 kc	1168	PDWCIDPDWWCKFWGSGSATGGSGSTASSGSGSATG PDWCIDPDWWCKFW
Miostatina-2xTN8-11 kc	1169	ANWCVSPNWFCMVMGSGSATGGSGSTASSGSGSAT GANWCVSPNWFCMVM
Miostatina-2xTN8-25 kc	1170	PDWCIDPDWWCKFWGSGSATGGSGSTASSGSGSATG PDWCIDPDWWCKFW
Miostatina-2xTN8-23 kc	1171	HWACGYWPWSCKWVGSGSATGGSGSTASSGSGSAT GHWACGYWPWSCKWV
Miostatina-TN8-29-19 kc	1172	KKHCQIWTWMCAPKSGSATGGSGSTASSGSGSATG QGHCTRWPWMCPY
Miostatina-TN8-19-29 kc	1173	QGHCTRWPWMCPYSGSATGGSGSTASSGSGSATG KKHCQIWTWMCAPK
Miostatina-TN8-29-19 kn	1174	KKHCQIWTWMCAPKSGSATGGSGSTASSGSGSATG QGHCTRWPWMCPY
Miostatina-TN8-29-19-8g	1175	KKHCQIWTWMCAPKGGGGGGGGQGHCTRWPWMCP PY
Miostatina-TN8-19-29-6gc	1176	QGHCTRWPWMCPYGGGGGGKKHCQIWTWMCAPK

TABLA 22 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MIOSTATINA

Pepticuerpo madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
mTN8-19-1	1177	VALHGQCTRWPWMCPPQREG
mTN8-19-2	1178	YPEQGLCTRWPWMCPPQTLA
mTN8-19-3	1179	GLNQGHCTRWPWMCPPQDSN
mTN8-19-4	1180	MITQGQCTRWPWMCPPQPSG
mTN8-19-5	1181	AGAQEHCCTRWPWMCAPNDWI
mTN8-19-6	1182	GVNQGQCTRWRWMCPPNGWE
mTN8-19-7	1183	LADHGQCIRWPWMCPPEGWE
mTN8-19-8	1184	ILEQAQCTRWPWMCPPQRGG
mTN8-19-9	1185	TQTHAQCTRWPWMCPPQWEG
mTN8-19-10	1186	VVTQGHCTLWPWMCPPQRWR

mTN8-19-11	1187	IYPHDQCTRWPWMCPPQYP
mTN8-19-12	1188	SYWQQCTRWPWMCPPQWRG
mTN8-19-13	1189	MWQQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-14	1190	EFTQWHCTRWPWMCPPQRSQ
mTN8-19-15	1191	LDDQWQCTRWPWMCPPQGFS
mTN8-19-16	1192	YQTQGLCTRWPWMCPPQSQR
mTN8-19-17	1193	ESNQGQCTRWPWMCPPQGGW
mTN8-19-18	1194	WTDGRPCTRWPWMCPPQANG
mTN8-19-19	1195	VGTQQCTRWPWMCPPYETG
mTN8-19-20	1196	PYEQGKCTRWPWMCPPYEVE
mTN8-19-21	1197	SEYQGLCTRWPWMCPPQGWK
mTN8-19-22	1198	TFSQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-23	1199	PGAHDHCTRWPWMCPPQSRY
mTN8-19-24	1200	VAEEWHCRRWPWMCPPQDWR
mTN8-19-25	1201	VGTQGHCTRWPWMCPPQPAG
mTN8-19-26	1202	EEDQAHCRRWPWMCPPQGWV
mTN8-19-27	1203	ADTQGHCTRWPWMCPPQHWF
mTN8-19-28	1204	SGPQGHCTRWPWMCAPQGWV
mTN8-19-29	1205	TLVQGHCTRWPWMCPPQRWV
mTN8-19-30	1206	GMAHGKCTRWAWMCPPQSWK
mTN8-19-31	1207	ELYHGQCTRWPWMCPPQSWA
mTN8-19-32	1208	VADHGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-33	1209	PESQGHCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19-34	1210	IPAHHCTRWPWMCPPQRWR
mTN8-19-35	1211	FTVHGHCTRWPWMCPPYGWV
mTN8-19-36	1212	PDFPGHCTRWRWMCPPQGWE
mTN8-19-37	1213	QLWQGPCTQWPWMCPPKGRY
mTN8-19-38	1214	HANDGHCTRWQWMCPPQWGG
mTN8-19-39	1215	ETDHGLCTRWPWMCPPYGAR
mTN8-19-40	1216	GTWQGLCTRWPWMCPPQGWQ
mTN8-19 con1	1217	VATQQCTRWPWMCPPQGWG
mTN8-19 con2	1218	VATQQCTRWPWMCPPQRWG
mTN8 con6-1	1219	QREWYPCYGGHLWCYDLHKA
mTN8 con6-2	1220	ISAWYSCYAGHFWCWDLKQK
mTN8 con6-3	1221	WTGWYQCYGGHLWCYDLRRK

mTN8 con6-4	1222	KTFWYPCYDGHFWCYNLKSS
mTN8 con6-5	1223	ESRWYPCYEGHLWCFDLTET

TABLA 23 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MIOSTATINA

Pepticuerpo madurado por afinidad	SEQ ID NO:	Secuencia peptídica
L2	1224	MEMLDSLFELLKDMVPISKA
mL2-Con1	1225	RMEMLESLELLKEIVPMSKAG
mL2-Con2	1226	RMEMLESLELLKEIVPMSKAR
mL2-1	1227	RMEMLESLELLKDIVPMSKPS
mL2-2	1228	GMEMLESLELLQEIVPMSKAP
mL2-3	1229	RMEMLESLELLKDIVPISNPP
mL2-4	1230	RIEMLESLELLQEIVPISKAE
mL2-5	1231	RMEMLQSLELLKDIVPMSNAR
mL2-6	1232	RMEMLESLELLKEIVPTSNGT
mL2-7	1233	RMEMLESLELLKEIVPMSKAG
mL2-8	1234	RMEMLGSLELLKEIVPMSKAR
mL2-9	1235	QMELLDSELLKEIVPKSQPA
mL2-10	1236	RMEMLDSLELLKEIVPMSNAR
mL2-11	1237	RMEMLESLELLHEIVPMSQAG
mL2-12	1238	QMEMLESLLQLLKEIVPMSKAS
mL2-13	1239	RMEMLDSLELLKDMVPMTTGA
mL2-14	1240	RIEMLESLELLKDMVPMANAS
mL2-15	1241	RMEMLESLLQLLNEIVPMSRAR
mL2-16	1242	RMEMLESLELLKELVPMSKGV
mL2-17	1243	RIEMLESLELLKDIVPIQKAR
mL2-18	1244	RMELLESLELLKDMVPMSDSS
mL2-19	1245	RMEMLESLEVLQEIVPRAKGA
mL2-20	1246	RMEMLDSLLQLLNEIVPMSHAR
mL2-21	1247	RMEMLESLELLKDIVPMSNAG

mL2-22	1248	RMEMLQSLFELLKGMVPISKAG
mL2-23	1249	RMEMLESLELLKEIVPNSTAA
mL2-24	1250	RMEMLQSLLELLKEIVPISKAG
mL2-25	1251	RIEMLDSLELLNELVPMSKAR
L-15	1252	HHGWNLYLRKGSAPQWFEAWV
mL15-con1	1253	QVESLQQLMWLDQKLASGPQG
mL15-1	1254	RMELLESFELLKEMVPRSKAV
mL15-2	1255	QAVSLQHLLMWLDQKLASGPQH
mL15-3	1256	DEDSLQQLMWLDQKLASGPQL
mL15-4	1257	PVASLQQLIWLDQKLAQGPHA
mL15-5	1258	EVDELQQLNWLHDHKLASGPLQ
mL15-6	1259	DVESLEQLLMWLDHQLASGPHG
mL15-7	1260	QVDSLQQVLLWLEHKLALGPQV
mL15-8	1261	GDESLQHLLMWLEQKLALGPHG
mL15-9	1262	QIEMLESLLDLLRDMVPMSNAF
mL15-10	1263	EVDSLQQLMWLDQKLASGPQA
mL15-11	1264	EDESLQQLLIYLDKMLSSGPQV
mL15-12	1265	AMDQLHQLLIWLDHKLASGPQA
mL15-13	1266	RIEMLESLELLDEIALIPKAW
mL15-14	1267	EVVSLQHLLMWLEHKLASGPDG
mL15-15	1268	GGESLQQLMWLDQQLASGPQR
mL15-16	1269	GVESLQQLLIFLDHMLVSGPHD
mL15-17	1270	NVESLEHLMWLERLLASGPYA
mL15-18	1271	QVDSLQQLIWLDHQLASGPKR
mL15-19	1272	EVESLQQLMWLEHKLAQGPQG
mL15-20	1273	EVDSLQQLMWLDQKLASGPHA
mL15-21	1274	EVDSLQQLMWLDQQLASGPQK
mL15-22	1275	GVEQLPQLLMWLEQKLASGPQR
mL15-23	1276	GEDSLQQLMWLDQQLAAGPQV
mL15-24	1277	ADDSLQQLMWLDRKLASGPHV
mL15-25	1278	PVDSLQQLIWLDQKLASGPQG
L-17	1279	RATLLKDFWQLVEGYGDN
mL17-con1	1280	DWRATLLKEFWQLVEGLGDNLV
mL17-con2	1281	QSRATLLKEFWQLVEGLGDKQA
mL17-1	1282	DGRATLLTEFWQLVQGLGQKEA

mL17-2	1283	LARATLLKEFWQLVEGLGEKVV
mL17-3	1284	GSRDTLLKEFWQLVVGLGDMQT
mL17-4	1285	DARATLLKEFWQLVDAYGDRMV
mL17-5	1286	NDRAQLLRDFWQLVDGLGVKSW
mL17-6	1287	GVRETLLYELWYLLKGLGANQG
mL17-7	1288	QARATLLKEFCQLVGCQGDKLS
mL17-8	1289	QERATLLKEFWQLVAGLGQNMNR
mL17-9	1290	SGRATLLKEFWQLVQGLGEYRW
mL17-10	1291	TMRATLLKEFWLFDVGQREMOW
mL17-11	1292	GERATLLNDFWQLVDGQGDNTG
mL17-12	1293	DERETLLKEFWQLVHGWGDNVA
mL17-13	1294	GGRATLLKELWQLLEGQGANLV
mL17-14	1295	TARATLLNELVQLVKGYGDKLV
mL17-15	1295	GMRATLLQEFWQLVGGQGDNWM
mL17-16	1297	STRATLLNDLWQLMKGWAEDRG
mL17-17	1298	SERATLLKELWQLVGGWGDNFG
mL17-18	1299	VGRATLLKEFWQLVEGLVGQSR
mL17-19	1300	EIRATLLKEFWQLVDEWREQPN
mL17-20	1301	QLRATLLKEFLQLVHGLGETDS
mL17-21	1302	TQRATLLKEFWQLIEGLGGKHV
mL17-22	1303	HYRATLLKEFWQLVDGLREQGV
mL17-23	1304	QSRVTLLREFWQLVESYRPIVN
mL17-24	1305	LSRATLLNEFWQFVDGQRDKRM
mL17-25	1306	WDRATLLNDFWHLMEELSQKPG
mL17-26	1307	QERATLLKEFWRMVEGLGKNRG
mL17-27	1308	NERATLLREFWQLVGGYGVNQR
L-20	1309	YREMSMLEGLLDVLERLQHY
mL20-1	1310	HQRDMSMLWELLDVLDGLRQYS
mL20-2	1311	TQRDMSMLDGLLEVLDQLRQQR
mL20-3	1312	TSRDMSLLWELLEELDRLGHQR
mL20-4	1313	MQHDMSMLYGLVELLES LGHQI
mL20-5	1314	WNRDMRMLES LFEVLDGLRQQV
mL20-6	1315	GYRDMSMLEGLLAVLDRLGPQL
mL20 conl	1316	TQRDMSMLEGLLEVLDRLGQQR

mL20 con2	1317	WYRDMSMLEGLLEVLDRLGQQR
L-21	1318	HNSSQMLLSELIMLVGSMMQ
mL21-1	1319	TQNSRQMLLSDFMMLVGSMIQQ
mL21-2	1320	MQTSRHILLSEFMMLVGSIMHG
mL21-3	1321	HDNSRQMLLSDLLHLVGTMIQQ
mL21-4	1322	MENSRQNLLRELIMLVGNMSHQ
mL21-5	1323	QDTSRHMLLREFMMLVGEMIQQ
mL21 con1	1324	DQNSRQMLLSDLMILVGSMIQQ
L-24	1325	EFFHWLHNHRSEVNHWLDMN
mL24-1	1326	NVFFQWVQKHGRVVYQWLDINV
mL24-2	1327	FDFLQWLQNHRSEVEHWLVMDV

TABLA 24 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE MIOSTATINA

Nombre de pepticuerpo	Péptido
2x mTN8-Con6-(N)-1K	M-GAQ-WYPCYEGHFWCYDL- GSGSATGGSGSTASSGSGSATG-WYPCYEGHFWCYDL- LE-5G-FC (SEQ ID NO: 1328)
2x mTN8-Con6-(C)-1K	FC-5G-AQ-WYPCYEGHFWCYDL- GSGSATGGSGSTASSGSGSATG- WYPCYEGHFWCYDL- LE (SEQ ID NO: 1329)
2x mTN8-Con7-(N)-1K	M-GAQ-IFGCKWWDVQCYQF- GSGSATGGSGSTASSGSGSATG-IFGCKWWDVQCYQF- LE-5G-FC (SEQ ID NO: 1330)
2x mTN8-Con7-(C)-1K	FC-5G-AQ-IFGCKWWDVQCYQF- GSGSATGGSGSTASSGSGSATG-IFGCKWWDVQCYQF- LE (SEQ ID NO: 1331)

<p>2x mTN8-Con8-(N)-1K</p>	<p>M-GAQ-IFGCKWWDVDCYQF-GSGSATGGSGSTASSGSGSATG-IFGCKWWDVDCYQF-LE-5G-FC (SEQ ID NO: 1332)</p>
<p>2x mTN8-Con8-(C)-1K</p>	<p>FC-5G-AQ-IFGCKWWDVDCYQF-GSGSATGGSGSTASSGSGSATG-IFGCKWWDVDCYQF-LE (SEQ ID NO: 1333)</p>
<p>2X mTN8-19-7</p>	<p>FC-5G-AQ-LADHGQCIRWPWMCPEGWELEGSATGGSGSTASSGSGSATGLADHGQCIRWPWMCPEGWE-LE (SEQ ID NO: 1334)</p>
<p>2X mTN8-19-7 ST-GG del2x LE</p>	<p>FC-5G-AQ-LADHGQCIRWPWMCPEGWEGSATGGSGGGASSSGSATGLADHGQCIRWPWMCPEGWE (SEQ ID NO: 1335)</p>
<p>2X mTN8-19-21</p>	<p>FC-5G-AQ-SEYQGLCTRWPWMCPPQGWKLEGSATGGSGSTASSGSGSATGSEYQGLCTRWPWMCPPQGWK-LE (SEQ ID NO: 1336)</p>
<p>2X mTN8-19-21 ST-GG del2x LE</p>	<p>FC-5G-AQ-SEYQGLCTRWPWMCPPQGWKSGSATGGSGGGASSSGSATGSEYQGLCTRWPWMCPPQGWK (SEQ ID NO: 1337)</p>

<p>2X mTN8-19-22</p>	<p>FC-5G-AQ- TFSQGHCTRWPWMCPPQGWGLESGSATGGSGSTASSG SGSATGTFSQGHCTRWPWMCPPQGWG -L E (SEQ ID NO: 1338)</p>
<p>2X mTN8-19-32</p>	<p>FC-5G-AQ- VADHGHCTRWPWMCPPQGWGLESGSATGGSGSTASS SGSATGVADHGHCTRWPWMCPPQGWG-LE (SEQ ID NO: 1339)</p>
<p>2X mTN8-19-32 ST—GG del2x LE</p>	<p>FC-5G-AQ- VADHGHCTRWPWMCPPQGWGGSGSATGGSGGGASSGS GSATGVADHGHCTRWPWVCPQGWG (SEQ ID NO: 1340)</p>
<p>2X mTN8-19-33</p>	<p>FC-5G-AQ- PESQGHCTRWPWMCPPQGWGLESGSATGGSGSTASSG SGSATGPESQGHCTRWPWMCPPQGWGLE (SEQ ID NO: 1341)</p>
<p>2X mTN8-19-33 ST—GG del2x LE</p>	<p>FC-5G-AQ- PESQGHCTRWPWMCPPQGWGGSGSATGGSGGGASSGS GSATGPESQGHCTRWPWMCP PQGWG (SEQ ID NO: 1342)</p>

Tabla 25 – Secuencias de péptidos antagonistas de integrina

Secuencia/estructura	SEQ. ID NO:
CLCRGDCIC	1344
CWDDGWLC	1345
CWDDLWWLC	1346
CWDDGLMC	1347
CWDDGWMC	1348
CSWDDGWLC	1349
CPDDLWWLC	1350
NGR	1351
GSL	1352
RGD	1353
CGRECPRLCQSSC	1354
CNGRCVSGCAGRC	1355
CLSGSLSC	1356
GSL	1357
NGRAHA	1358
CNGRC	1359
CDCRGDCFC	1360
CGSLVRC	1361
DLXXL	1362
RTDLDSLRTYTL	1363
RTDLDSLRTY	1364
RTDLDSLRT	1365
RTDLDSLRL	1366
GDLDLLKLRLTL	1367
GDLHSLRQLLSR	1368
RDDLHMLRLQLW	1369
SSDLHALKKRYG	1370
RGDLKQLSELTW	1371
CXXRGDC	1372
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	1373
STGGFDDVYDWARRVSSALTTTLVATR	1374
SRGVNFSEWLYDMSAAMKEASNVFPSRRSR	1375

SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	1376
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	1377
SSTGWVDLLGALQRAADATRIPSLSQNSR	1378
DVYTKKELIECARRVSEK	1379
RGDGX	1380
CRGDGXC	1381
CARRLDAPC	1382
CPSRLDSPC	1383
CDCRGDCFC	1384
CDCRGDCLC	1385
RGDLAALSAPPV	1386

Tabla 26 – Secuencias de péptidos antagonistas de selectina

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

Tabla 27 – Péptidos de unión a vinculina

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
SSQNWDMEAGVEDLTAAMLGLLSTIHSSSR	1410
SSPSLYTQFLVNYESAATRIQDLLIASRPSR	1411
SSTGWVDLLGALQRAADATRTSIPPSLQNSR	1412
DVYTKKELIECARRVSEK	1413
STGGFDDVYDWARGVSSALTTTLVATR	1414
STGGFDDVYDWARRVSSALTTTLVATR	1415
SRGVNFSEWLYDMSAAMKEASNVPFRRSR	1416

Tabla 28 – Secuencias de péptidos relacionados con laminina

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

5 Tabla 29 – Péptidos moduladores de NGF

SEQ ID NO:	Secuencia de parte de péptido del producto de fusión Fc-Péptido
1427	TGYTEYTEEWPMGFGYQWSF
1428	TDWLSDFPFYEQYFGLMPPG

1429	FMRFPNPWKLV EPPQGWYYG
1430	VVKAPHFEFLAPPHFHEFPF
1431	FSYIWIDETPSNIDRYMLWL
1432	VNFPKVPEDVEPWPWSLKLY
1433	TWHPKTYEEFALPFFVPEAP
1434	WHFGTPYIQQPGVYWLQAP
1435	VWNYGPFMNFDPSTYFLHE
1436	WRIHSKPLDYSHVWFFPADF
1437	FWDGNQPPDILVDWPWNPPV
1438	FYSLEWLKDHSEFFQTVTEW
1439	QFMELLKFFNSPGDSSHFL
1440	TNVDWISNNWEHMKSFFTED
1441	PNEKPYQM QS WFPDPWPVY
1442	WSHTEWVPQVWWKPPNHFYV
1443	WGEWINDAQVHMHEGFISES
1444	VPWEHDHDLWEIISQDWHIA
1445	VLHLQDPRGWSNFPPGVLEL
1446	IHGCWFTEEGCVWQ
1447	YMQCQFARDGCPQW
1448	KLQCQYSESGCPTI
1449	FLQCEISGGACPAP
1450	KLQCEFSTSGCPDL
1451	KLQCEFSTQGCPDL
1452	KLQCEFSTSGCPWL
1453	IQGCWFTEEGCPWQ
1454	SFDCDNPWGHVLQSCFGF
1455	SFDCDNPWGHKLQSCFGF

Tabla 30 – PÉPTIDOS MODULADORES DE TALL

Secuencia/estructura	SEQ ID NO:
LPGCKWDLLIKQWVCDPL- Λ -V ¹	1456
V ¹ - Λ -LPGCKWDLLIKQWVCDPL	1457
LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ -V ¹	1458
V ¹ - Λ -LPGCKWDLLIKQWVCDPL - Λ - LPGCKWDLLIKQWVCDPL	1459
SADCYFDILTKSDVCTSS- Λ -V ¹	1460
V ¹ - Λ -SADCYFDILTKSDVCTSS	1461
SADCYFDILTKSDVTSS- Λ - SADCYFDILTKSDVTSS - Λ -V ¹	1462
V ¹ - Λ -SADCYFDILTKSDVTSS - Λ - SADCYFDILTKSDVTSS	1463
FHDCKWDLLTKQWVCHGL- Λ -V ¹	1464
V ¹ - Λ -FHDCKWDLLTKQWVCHGL	1465
FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ -V ¹	1466
V ¹ - Λ -FHDCKWDLLTKQWVCHGL - Λ - FHDCKWDLLTKQWVCHGL	1467

Tabla 31 – Pepticuerpos inhibidores de TALL-1

Pepticuerpo	SEQ ID NO de pepticuerpo	Secuencia peptídica
TALL-1-8-1-a	1468	MPGTCFPPFW ECTHAGGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
TALL-1-8-2-a	1469	MWGACWPPFW ECFKEGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGK
TALL-1-8-4-a	1470	MVPFCDLLTK HCFEAGGGGG VDKTHTCPPC PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPQVY TLPPSRDEL KNQVSLTCLV KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ GNVFSCSVMH EALHNHYTQK

		SLSLSPGK
TALL-1-12-4-a	1471	MGSRCKYKWD VLTKQCFHHG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-3-a	1472	MLPGCKWDLI IKQWVCDPLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-5-a	1473	MSADCYFDIL TKSDVCTSSG GGGG VDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-8-a	1474	MSDDCMYDQL TRMFICSNLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-9-a	1475	MDLNCKYDEL TYKEWCQFNG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSGDSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNN YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-10-a	1476	MFHDCKYDLL TRQMVCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR

		DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-11-a	1477	MRNHCFWDHL LKQDICPSPG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-12-14-a	1478	MANQCWWSL TKKNVCEFFG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1-consenso	1479	MFHDCKWDL TKQWVCHGLG GGGGVDKTHT CPPCPAPELL GGPSVFLFPP KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH NAKTKPREEQ YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTP PVLDS DGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNH YTQKSLSLSP GK
TALL-1 12-3 dímero en tandem	1480	MLPGCKWDL IKQWVCDPLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMLPGCKWDL LIKQWVCDPL GGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP KPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QNSTYRVVSV VLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDS DGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSP GK
TALL-1 dímero en tandem consenso	1481	MFHDCKWDL TKQWVCHGLG SGSATGGSGS TASSGSGSAT HMFHDCKWDL LTKQWVCHGL GGGGVDKTH TCPPCPAPEL LGGPSVFLFP KPKDTLMIS RTPEVTCVVV DVSHEDPEVK FNWYVDGVEV HNAKTKPREE QNSTYRVVSV VLTVLHQDWL NGKEYKCKVSN KALPAPIEKT ISKAKGQPRE EPQVYTLPPS RDELTKNQVS LTCLVKGFYP SDIAVEWESN GQPENNYKTT PPVLDS DGSF FLYSKLTVDK SRWQQGNVFS CSVMHEALHN HYTQKSLSLSP GK

TABLA 32 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ANG-2

PÉPTIDO	SEQ ID NO.	SECUENCIA PEPTÍDICA
Con4-44	1482	PIRQEEDWDPWTCEHMWEV
Con4-40	1483	TNIQEECEWDPWTCDHMPGK
Con4-4	1484	WYEQDACEWDPWTCEHMAEV
Con4-31	1485	NRLQEVCEWDPWTCEHMENV
Con4-C5	1486	AATQECEWDPWTCEHMPRS
Con4-42	1487	LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD
Con4-35	1488	VPRQKDCEWDPWTCEHMYVG
Con4-43	1489	SISHEECEWDPWTCEHMQVG
Con4-49	1490	WAAQECEWDPWTCEHMGRM
Con4-27	1491	TWPQDKCEWDPWTCEHMGST
Con4-48	1492	GHSQECCGWDPWTCEHMGTS
Con4-46	1493	QHWQECEWDPWTCDHMPSK
Con4-41	1494	NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR
Con4-36	1495	KSGQVECNWDPWTCEHMPRN
Con4-34	1496	VKTQEHCDWDPWTCEHMREW
Con4-28	1497	AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM
Con4-39	1498	PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM
Con4-25	1499	RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK
Con4-50	1500	HGQNMECEWDPWTCEHMFRY
Con4-38	1501	PRLQECCVWDPWTCEHMPLR
Con4-29	1502	RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ
Con4-47	1503	QTSQEDCVWDPWTCDHMVSS
Con4-20	1504	QVIGRPCEWDPWTCEHLEGL
Con4-45	1505	WAQQEECAWDPWTCDHMOVGL
Con4-37	1506	LPGQEDCEWDPWTCEHMVRS
Con4-33	1507	PMNQVECDWDPWTCEHMPRS
AC2-Con4	1508	FGWSHGCEWDPWTCEHMGST
Con4-32	1509	KSTQDDCDWDPWTCEHMGVP
Con4-17	1510	GPRISTCQWDPWTCEHMDQL
Con4-8	1511	STIGDMCEWDPWTCAHMQVD
AC4-Con4	1512	VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW

Con4-1	1513	VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG
Con4-C1	1514	TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG
Con4-21	1515	TKGKSVQWDPWTCSHMQSG
Con4-C2	1516	TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG
Con4-18	1517	WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP
Con4-19	1518	VVQVGMCQWDPWTCKHMLRQ
Con4-16	1519	AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV
Con4-11	1520	QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR
Con4-C4	1521	TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG
Con4-23	1522	TSQRVGCEWDPWTCQHLYT
Con4-15	1523	QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS
Con4-9	1524	GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG
TN8-Con4*	1525	QEECEWDPWTCEHM

TABLA 33 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ANG-2

Péptido	SEQ ID NO.	Secuencia Peptídica
L1-1	1526	QNYKPLDELDAATLYEHFIFHYT
L1-2	1527	LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS
L1-3	1528	TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ
L1-4	1529	VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA
L1-5	1530	VKYKPLDELDEILYEQQTFQER
L1-7	1531	TNFMPPDDLEQRLYEQFILQQG
L1-9	1532	SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA
L1-10	1533	QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA
L1-11	1534	QNFKPMDELEDTLKQFLFQHS
L1-12	1535	YKFTPLDDLEQTLYEQWTLQHV
L1-13	1536	QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR
L1-14	1537	SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ
L1-15	1538	QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG
L1-16	1539	QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR
L1-17	1540	VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ
L1-18	1541	QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS
L1-19	1542	QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH
L1-20	1543	EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG
L1-21	1544	HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL
L1-22	1545	YKFNPMDELEQTLYEFLFQHA
AC6-L1	1546	TNYKPLDELDAATLYEHWILQHS
L1-C1	1547	QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR
L1-C2	1548	TKFQPLDELDTLYEQWTLQQR
L1-C3	1549	TNFQPLDELDTLYEQWTLQQR
L1	1550	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ

TABLA 34 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ANG-2

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

TABLA 35 – PÉPTIDOS INHIBIDORES DE ANG-2

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

5

Tabla 36 – Péptidos de unión a Ang-2

Péptido	Seq Id No.	Secuencia
TN8-8	1568	KRPCEEMWGGCNYD
TN8-14	1569	HQICKWDPWTCKHW
TN8-Con1	1570	KRPCEEIFGGCTYQ
TN8-Con4	1571	QEECEWDPWTCEHM
TN12-9	1572	FDYCEGVEDPFTFGCDNH
L1	1573	KFNPLDELEETLYEQFTFQQ
C17	1574	QYGCDGFLYGCMIN

Tabla 37 – Péptidos de unión a Ang-2

Pepticuerpo	Secuencia de pepticuerpo
L1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1575)
L1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1576)
L1 (N) 1K WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGSGSATGGSGSTASSGSGSAT HLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1577)
2xL1 (N)	MGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1578)
2xL1 (N) WT	MKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQFTFQQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1579)
Con4 (N)	MGAQQEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1580)
Con4 (N) 1K-WT	MQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1581)

2xCon4 (N) 1K	MGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATH QEECEWDPWTCEHMLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1582)
L1 (C)	M-Fc-GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:1583)
L1 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLY EQFTFQQLE (SEQ ID NO:1584)
2xL1 (C)	M-Fc- GGGGGAQKFNPLDELEETLYEQFTFQQGGGGGGGGKFNPLD ELEETLYEQFTFQQLE (SEQ ID NO:1585)
Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1586)
Con4 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPWTCE HMLE (SEQ ID NO:1587)
2xCon4 (C) 1K	M-Fc- GGGGGAQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGS ATHQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1588)
Con4-L1 (N)	MGAQEECEWDPWTCEHMGGGGGGGKFNPLDELEETLYEQ FTFQQSGSATGGSGSTASSGSGSATHLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1589)
Con4-L1 (C)	M-Fc- GGGGGAQSGSATGGSGSTASSGSGSATHKFNPLDELEETLY EQFTFQQGGGGGQEECEWDPWTCEHMLE (SEQ ID NO:1590)
TN-12-9 (N)	MGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNHLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:1591)
C17 (N)	MGAQ-QYGCDGFLYGCMINLE-GGGGG-Fc (SEQ ID NO:1592)
TN8-8 (N)	MGAQ-KRPCEEMWGGCNYDLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1593)
TN8-14 (N)	MGAQ-HQICKWDPWTCKHWLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1594)
Con1 (N)	MGAQ-KRPCEEIFGGCTYQLEGGGGG-Fc (SEQ ID NO:1595)

Tabla 38 – Péptidos de unión a Ang-2

Pbs madurado por afinidad con derivado Con4	Secuencia de pepticuerpo (Seq Id No:)
Con4-44 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PIRQEEDWDPWTCEHMWEV-LE (SEQ ID NO: 1596)
Con4-40 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TNIQEECEWDPWTCDHMPGK-LE (SEQ ID NO: 1597)
Con4-4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WYEQDACEWDPWTCEHMAEV-LE (SEQ ID NO: 1598)
Con4-31 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-NRLQEVCEWDPWTCEHMENV-LE (SEQ ID NO: 1599)
Con4-C5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 1600)
Con4-42 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LRHQEGCEWDPWTCEHMFWD-LE (SEQ ID NO: 1602)
Con4-35 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VPRQKDCWDPWTCEHMYVG-LE (SEQ ID NO: 1602)
Con4-43 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-SISHEECEWDPWTCEHMQVG-LE (SEQ ID NO: 1603)
Con4-49 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WAAQEECEWDPWTCEHMGRM-LE (SEQ ID NO: 1604)
Con4-27 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 1605)
Con4-48 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GHSQEECGWDPWTCEHMGTS-LE (SEQ ID NO: 1606)
Con4-46 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QHWQEECEWDPWTCDHMPSK-LE (SEQ ID NO: 1607)
Con4-41 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-NVRQEKCEWDPWTCEHMPVR-LE (SEQ ID NO: 1608)
Con4-36 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KSGQVECNWDPWTCEHMPRN-LE (SEQ ID NO: 1609)
Con4-34 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VKTQEHCWDPWTCEHMREW-LE (SEQ ID NO: 1610)
Con4-28 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AWGQEGCDWDPWTCEHMLPM-LE

	(SEQ ID NO: 1611)
Con4-39 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PVNQEDCEWDPWTCEHMPPM-LE (SEQ ID NO: 1612)
Con4-25 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RAPQEDCEWDPWTCAHMDIK-LE (SEQ ID NO: 1613)
Con4-50 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-HGQNMECEWDPWTCEHMFY-LE (SEQ ID NO: 1614)
Con4-38 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PRLQECCVWDPWTCEHMPLR-LE (SEQ ID NO: 1615)
Con4-29 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RTTQEKCEWDPWTCEHMESQ-LE (SEQ ID NO: 1616)
Con4-47 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QTSQEDCVWDPWTCDHMOVSS-LE (SEQ ID NO: 1617)
Con4-20 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QVIGRPEWDPWTCEHLEGL-LE (SEQ ID NO: 1618)
Con4-45 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WAQQECAWDPWTCDHMOVGL-LE (SEQ ID NO: 1619)
Con4-37 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LPGQEDCEWDPWTCEHMOVRS-LE (SEQ ID NO: 1620)
Con4-33 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PMNQVECDWDPWTCEHMPRS-LE (SEQ ID NO: 1621)
AC2-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCEHMGST-LE (SEQ ID NO: 1622)
Con4-32 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KSTQDDCDWDPWTCEHMOVGP-LE (SEQ ID NO: 1623)
Con4-17 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GPRISTCQWDPWTCEHMDQL-LE (SEQ ID NO: 1624)
Con4-8 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-STIGDMCEWDPWTCAHMQVD-LE (SEQ ID NO: 1625)
AC4-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1626)
Con4-1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VLGGQGCQWDPWTCSHLEDG-LE (SEQ ID NO: 1627)
Con4-C1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCEWDPWTCAHMQGG-LE (SEQ ID NO: 1628)
Con4-21 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TKGKSVQWDPWTCSHMQSG-LE (SEQ ID NO: 1629)
Con4-C2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCAHMQGG-LE

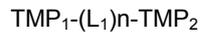
	(SEQ ID NO: 1630)
Con4-18 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WVNEVVCEWDPWTCNHWDTP-LE (SEQ ID NO: 1631)
Con4-19 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VVQVGMQWDPWTCKHMRLQ-LE (SEQ ID NO: 1632)
Con4-16 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AVGSQTCEWDPWTCAHLVEV-LE (SEQ ID NO: 1633)
Con4-11 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QGMKMFCEWDPWTCAHIVYR-LE (SEQ ID NO: 1634)
Con4-C4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TTIGSMCQWDPWTCEHMQGG-LE (SEQ ID NO: 1635)
Con4-23 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TSQRVGCWDPWTCQHLYT-LE (SEQ ID NO: 1636)
Con4-15 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QWSWPPCEWDPWTCQTVWPS-LE (SEQ ID NO: 1637)
Con4-9 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GTSPSFCQWDPWTCSHMVQG-LE (SEQ ID NO: 1638)
Con4-10 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TQGLHQCEWDPWTCKVLWPS-LE (SEQ ID NO: 1639)
Con4-22 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-VWRSQVCQWDPWTCNLGGDW-LE (SEQ ID NO: 1640)
Con4-3 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECQWDPWTCQFFYGA-LE (SEQ ID NO: 1641)
Con4-5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-ATFARQCQWDPWTCALGGNW-LE (SEQ ID NO: 1642)
Con4-30 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GPAQEECEWDPWTCEPLPLM-LE (SEQ ID NO: 1643)
Con4-26 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-RPEDMCSQWDPWTWHLQGYC-LE (SEQ ID NO: 1644)
Con4-7 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LWQLAVCQWDPQTCDHMGAL-LE (SEQ ID NO: 1645)
Con4-12 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TQLVSLCEWDPWTCRLLDGW-LE (SEQ ID NO: 1646)
Con4-13 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-MGGAGRCEWDPWTCQLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1647)
Con4-14 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-MFLPNECQWDPWTCSNLPEA-LE (SEQ ID NO: 1648)
Con4-2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FGWSHGCEWDPWTCRLLQGW-LE

	(SEQ ID NO: 1649)
Con4-6 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-WPQTEGCQWDPWTCRLLHGW-LE (SEQ ID NO: 1650)
Con4-24 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-PDTRQGCQWDPWTCRLYGMW-LE (SEQ ID NO: 1651)
AC1-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-TWPQDKCEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1652)
AC3-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-DKILEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1653)
AC5-Con4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AATQEECEWDPWTCRLLQGW-LE (SEQ ID NO: 1654)
Pbs madurado por afinidad con derivado L1	Secuencia de pepticuerpo (Seq Id No:)
L1-7 (N)	MGAQ-TNFMPPMDDLEQRLYEQFILQQG-LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1655)
AC6-L1 (N)	MGAQ-TNYKPLDELDTLYEHWILQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1656)
L1-15 (N)	MGAQ-QKYQPLDELDKTLYDQFMLQQG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1657)
L1-2 (N)	MGAQ-LNFTPLDELEQTLYEQWTLQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1658)
L1-10 (N)	MGAQ-QKFQPLDELEQTLYEQFMLQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1659)
L1-13 (N)	MGAQ-QEYEPLDELDETLYNQWMFHQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1660)
L1-5 (N)	MGAQ-VKYKPLDELDEILYEQQTFQER LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1661)
L1-C2 (N)	MGAQ-TKFQPLDELDTLYEQLWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1662)
L1-C3 (N)	MGAQ-TNFQPLDELDTLYEQLWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1663)
L1-11 (N)	MGAQ-QNFKPMDELEDTLKQFLFQHS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1664)
L1-17 (N)	MGAQ-VKYKPLDELDEWLYHQFTLHHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1665)
L1-12 (N)	MGAQ-YKFTPLDDLEQTLYEQLWTLQHV LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1666)
L1-1 (N)	MGAQ-QNYKPLDELDTLYEYHFIFHYT LEGGGGG-Fc

	(SEQ ID NO: 1667)
L1-4 (N)	MGAQ-VKFKPLDALEQTLYEHWMFQQA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1668)
L1-20 (N)	MGAQ-EDYMPLDALDAQLYEQFILLHG LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1669)
L1-22 (N)	MGAQ-YKFNPMDELEQTLYEEFLFQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1670)
L1-14 (N)	MGAQ-SNFMPLDELEQTLYEQFMLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1671)
L1-16 (N)	MGAQ-QKFQPLDELEETLYKQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1672)
L1-18 (N)	MGAQ-QKFMPLDELDEILYEQFMFQQS LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1673)
L1-3 (N)	MGAQ-TKFNPLDELEQTLYEQWTLQHQ LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1674)
L1-21 (N)	MGAQ-HTFQPLDELEETLYYQWLYDQL LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1675)
L1-C1 (N)	MGAQ-QKFKPLDELEQTLYEQWTLQQR LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1676)
L1-19 (N)	MGAQ-QTFQPLDDLEEYLYEQWIRRYH LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1677)
L1-9 (N)	MGAQ-SKFKPLDELEQTLYEQWTLQHA LEGGGGG-Fc (SEQ ID NO: 1678)
Pbs madurado por afinidad con derivado Con1	Secuencia de pepticuerpo (Seq Id No:)
Con1-4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-SGQLRPC EEIFGCGTQNLAL-LE (SEQ ID NO: 1679)
Con1-1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AGGMRPYDGMLGWPNYDVQA-LE (SEQ ID NO: 1680)
Con1-6 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GQDLRPCEDMFGCGTKDWYG-LE (SEQ ID NO: 1681)
Con1-3 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-APGQRPYDGMLGWPTYQRIV-LE (SEQ ID NO: 1682)
Con1-2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-QTWDDPCM HILGPVTWRRCI-LE (SEQ ID NO: 1683)
Con1-5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FGDKRPLECMFGGPIQLCPR-LE (SEQ ID NO: 1684)
Original: Con1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KRPC EEIFGGCTYQ-LE

	(SEQ ID NO: 1685)
Pbs madurado por afinidad con derivado 12-9	Secuencia de pepticuerpo (Seq Id No:)
12-9-3 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LQEWCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 1686)
12-9-7 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-MLDYCEGMDDPFTFGCDKQM-LE (SEQ ID NO: 1687)
12-9-6 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-HQEYCEGMEDPFTFGCEYQG-LE (SEQ ID NO: 1688)
12-9-C2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVDPFTFGCENQR-LE (SEQ ID NO: 1689)
12-9-5 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LLDYCEGVQDPFTFGCENLD-LE (SEQ ID NO: 1690)
12-9-1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-GFEYCDGMEDPFTFGCDKQT-LE (SEQ ID NO: 1691)
12-9-4 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-AQDYCEGMEDPFTFGCEMQR-LE (SEQ ID NO: 1692)
12-9-C1 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-LQDYCEGVDPFTFGCEKQR-LE (SEQ ID NO: 1693)
12-9-2 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-KLEYCDGMEDPFTQGCDNQS-LE (SEQ ID NO: 1694)
Original: 12-9 (C)	M-Fc-GGGGGAQ-FDYCEGVDPFTFGCDNH-LE (SEQ ID NO: 1695)

Además de los compuestos TMP expuestos en la tabla 6, pueden usarse numerosos otros compuestos TMP en conjunción con la presente invención. En un aspecto, compuestos TMP comprenden la siguiente estructura general:



- 5 En el que TMP_1 y TMP_2 se seleccionan cada uno independientemente del grupo de compuestos que comprende la estructura principal:

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

En el que,

X_2 se selecciona del grupo que consiste en Glu, Asp, Lys, y Val;

- 10 X_3 se selecciona del grupo que consiste en Gly y Ala;

X_4 es Pro;

X_5 se selecciona del grupo que consiste en Thr y Ser;

X_6 se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala y Phe;

X_7 se selecciona del grupo que consiste en Arg y Lys;

X_8 se selecciona del grupo que consiste en Gln, Asn, y Glu;

X_9 se selecciona del grupo que consiste en Trp, Tyr y Phe;

X_{10} se selecciona del grupo que consiste en Leu, Ile, Val, Ala, Phe, Met y Lys;

5 L_1 es un grupo de unión tal como se describe en el presente documento; y

n es 0 ó 1;

y sales fisiológicamente aceptables de los mismos.

10 En una realización, L_1 comprende $(Gly)_n$, en el que n es de 1 a 20, y cuando n es mayor de 1, hasta la mitad de los residuos Gly puede sustituirse por otro aminoácido seleccionado de los restantes 19 aminoácidos naturales o un estereoisómero de los mismos.

Además de la estructura principal X_2 - X_{10} expuesta anteriormente para TMP_1 y TMP_2 , también son posibles otras estructuras relacionadas en las que se añade uno o más de los siguientes a la estructural principal TMP_1 y/o TMP_2 : X_1 se une al extremo N-terminal y/o X_{11} , X_{12} , X_{13} y/o X_{14} se unen al extremo C-terminal, en el que X_1 , X_{12} , X_{13} , y X_{14} son de la siguiente manera:

15 X_1 se selecciona del grupo que consiste en Ile, Ala, Val, Leu, Ser, y Arg;

X_{11} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Ser, Thr, Lys, His, y Glu;

X_{12} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Gly, Ser, y Gln;

X_{13} se selecciona del grupo que consiste en Arg, Lys, Thr, Val, Asn, Gln, y Gly; y

X_{14} se selecciona del grupo que consiste en Ala, Ile, Val, Leu, Phe, Thr, Arg, Glu, y Gly.

20 Los compuestos TMP que pueden usarse en conjunción con la presente invención se componen de, es decir, comprenden, al menos 9 subunidades (X_2 - X_{10}), en el que X_2 - X_{10} comprenden la estructura principal. Las subunidades X_2 - X_{14} son aminoácidos independientemente seleccionados de entre los 20 aminoácidos naturales, sin embargo, la invención abarca compuestos en los que X_2 - X_{14} se seleccionan independientemente del grupo de aminoácidos no naturales atípicos bien conocidos en la técnica. Se identifican aminoácidos específicos para cada
 25 posición. Por ejemplo, X_2 puede ser Glu, Asp, Lys, o Val. Se usan abreviaturas tanto de tres letras como de una única letra para aminoácidos en el presente documento; en cada caso, las abreviaturas son las estándares que se usan para los 20 aminoácidos naturales o variaciones bien conocidas de las mismas. Estos aminoácidos pueden tener estereoquímica L o D (excepto por Gly, que no es ni L ni D), y los TMP (así como todos los demás compuestos de la invención) pueden comprender una combinación de estereoquímicas. La invención también proporciona
 30 moléculas de TMP inversas (así como para todos los demás péptidos dados a conocer en el presente documento) en las que la secuencia del extremo amino terminal al extremo carboxilo terminal de los aminoácidos está invertida. Por ejemplo, el inverso de una molécula que tiene la secuencia normal X_1 - X_2 - X_3 sería X_3 - X_2 - X_1 . La invención también proporciona moléculas TMP retroinversas (así como para todas las demás moléculas de la invención descritas en el presente documento) en las que, como un TMP inverso, la secuencia del extremo amino terminal al
 35 extremo carboxilo terminal de aminoácidos está invertida y los residuos que normalmente son enantiómeros "L" en TMP se alteran a la forma del estereoisómero "D".

Ejemplos de compuestos TMP que pueden usarse en conjunción con la presente invención por tanto incluyen sin limitación los siguientes compuestos:

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

40 IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (cíclico) (SEQ. ID NO: 994)



IEGPTLRQCLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQCLAARA (lineal) (SEQ ID NO 995)

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

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

45 IEGPTLRQWLAARA-GGGK(BrAc)GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 998)

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

IEGPTLRQWLAARA-GGGK(PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1000)

IEGPTLRQWLAARA-GGGC(PEG) GGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1001)

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

IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA

5

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

20 Fc-IEGPTLRQWLAARA-GGGCGGGG-IEGPTLRQWLAARA

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

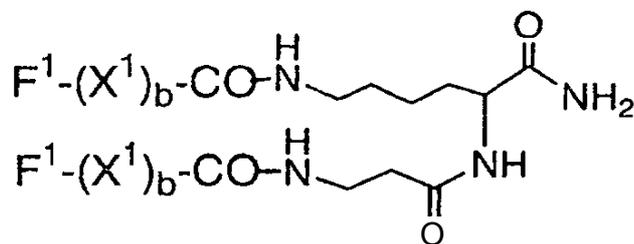
Fc-GGGGG-IEGPTLRQWLAARA-GGGGGGGG-IEGPTLRQWLAARA (SEQ. ID NO: 1017)

Derivados

25 La invención también contempla derivatizar la parte de péptido y/o vehículo (tal como se describe a continuación) de los compuestos. Tales derivados pueden mejorar la solubilidad, absorción, semivida biológica, y similares de los compuestos. Los restos pueden alternativamente eliminar o atenuar cualquier efecto secundario no deseado de los compuestos y similares. Ejemplos de derivados incluyen compuestos en los que:

30 1. El compuesto o alguna parte del mismo es cíclico. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener dos o más residuos Cys (por ejemplo, en el grupo de unión), que podrían ciclizar por formación de enlaces disulfuro. Para citas a referencias sobre la preparación de derivados ciclizados, véase la tabla 2.

35 2. El compuesto está reticulado o se hace incapaz de reticular entre moléculas. Por ejemplo, la parte de péptido puede modificarse para contener un residuo Cys y así ser capaz de formar un enlace disulfuro intermolecular con una molécula similar. El compuesto también puede reticularse a través de su extremo C-terminal, como en la molécula mostrada a continuación.



3. Uno o más uniones (enlaces) peptídico [-C(O)NR-] está sustituido por una unión no peptídico. Ejemplos de uniones no peptídico son -CH₂-carbamato [-CH₂-OC(O)NR-], fosfonato, -CH₂-sulfonamida [-CH₂-S(O)₂NR-], urea [-NHC(O)NH-], -CH₂-amina secundaria, y péptido alquilado [-C(O)NR₆- en el que R₆ es alquilo inferior].
- 5 4. El extremo N-terminal está derivatizado. Normalmente, el extremo N-terminal puede acilarse o modificarse a una amina sustituida. Ejemplos de grupos derivados N-terminal incluyen -NRR₁ (diferente de -NH₂), -NRC(O)R₁, -NRC(O)OR₁, -NRS(O)R₁, -NHC(O)NHR₁, succinimida, o benciloxicarbonil-NH- (CBZ-NH-), en los que R y R₁ son cada uno independientemente hidrógeno o alquilo inferior y en los que el anillo de fenilo puede estar sustituido con de 1 a 3 sustituyentes seleccionados del grupo que consiste en alquilo C1-C4, alcoxilo C1-C4, cloro; y bromo.
- 10 5. El extremo C-terminal libre estar derivatizado. Normalmente, el extremo C-terminal se esterifica o amida. Por ejemplo, pueden usarse métodos descritos en la técnica para añadir (NH-CH₂-CH₂-NH₂)₂ a compuestos de esta invención. De manera similar, pueden usarse métodos descritos en la técnica para añadir -NH₂ a compuestos de esta invención. Ejemplos de grupos derivados C-terminal incluyen, por ejemplo, -C(O)R₂ en el que R₂ es alcoxilo inferior o -NR₃R₄ en el que R₃ y R₄ son independientemente hidrógeno o alquilo C1-C8 (preferiblemente alquilo C1-C4).
- 15 6. Un enlace disulfuro está sustituido por otro resto de reticulación, preferiblemente más estable (por ejemplo, un alquileo). Véase, por ejemplo, Bhatnagar *et al.* (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9; Alberts *et al.* (1993) Thirteenth Am. Pep. Symp., 357-9.
- 20 7. Se modifica uno o más residuos de aminoácido individuales. Se conoce que varios agentes derivatizantes reaccionan específicamente con cadenas laterales o residuos terminales seleccionados, tal como se describe en detalle a continuación.
- 25 8. Se usan normalmente polímeros heterobifuncionales para unir proteínas. Un ejemplo es SMCC, o Succinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato. El extremo NHS (N-hidroxisuccinimida) reacciona con aminas primarias, que con la conjugación a pH ~ 7 es óptimo. Una vez formado el complejo, la reacción de la parte de maleimida de SMCC puede continuar con otra proteína/péptido que contiene un grupo sulfhidrilo libre, que se produce a una velocidad más rápida que la formación de la amida en la reacción inicial. El resultado es una unión entre dos proteínas, por ejemplo, conjugados anticuerpo-enzima. Una aplicación se ilustra mediante la preparación de fragmentos Fab' entrelazados a peroxidasa de rábano (Ishikwa, *et al.*, 1983a,b; Yoshitake *et al.*, 1982a,b; Imagawa *et al.*, 1982; Uto *et al.*, 1991). El uso de Sulfo SMCC (Sulfosuccinimidil-4-(N-maleimidometil)ciclohexan-1-carboxilato) permite la solubilidad en agua de modo que no es necesaria una etapa de solubilización orgánica, permitiendo mayor flexibilidad y menos interrupción de la actividad en la reacción con proteínas.
- 30 Pueden hacerse reaccionar residuos lisinilo y residuos amino-terminales con anhídridos de ácido succínico u otros anhídridos de ácido carboxílico, que invierten la carga de los residuos lisinilo. Otros reactivos adecuados para derivatizar residuos que contienen alfa-amino incluyen imidoésteres tales como picolinimidato de metilo; piridoxal fosfato; piridoxal; cloroborohidruro; ácido trinitrobencenosulfónico; O-metilisourea; 2,4-pentanodiona; y la reacción con glioxilato catalizada por transaminasa.
- 35 Los residuos de arginilo pueden modificarse mediante reacción con uno cualquiera o una combinación de varios reactivos convencionales, incluidos fenilglioxal, 2,3-butanodiona, 1,2-ciclohexanodiona y ninhidrina. La derivatización de residuos de arginilo requiere que la reacción se lleve a cabo en condiciones alcalinas debido al elevado pKa del grupo funcional de guanidina. Además, estos reactivos pueden reaccionar con los grupos de lisina así como con el grupo épsilon-amino de la arginina
- 40 La modificación específica de los residuos de tirosilo se ha estudiado extensamente, con un interés particular en la introducción de marcadores espectrales en los residuos de tirosilo mediante reacción con compuestos aromáticos de diazonio o con tetranitrometano. Más habitualmente, se utilizan N-acetilimidazol y tetranitrometano para formar especies de O-acetil tirosilo y derivados 3-nitro, respectivamente.
- 45 Los grupos laterales carboxílicos (aspartilo o glutamilo) pueden modificarse selectivamente mediante reacción con carbodiimidias (R'-N=C=N-R') tales como 1-ciclohexil-3-(2-morfolinil-(4-etil)carbodiimida o 1-etil-3-(4-azonia-4-4-dimetilpentil)carbodiimida). Además, los residuos de aspartilo y glutamilo pueden convertirse en residuos de asparaginilo y glutaminilo por reacción con iones de amonio.
- 50 Los residuos de glutaminilo y asparaginilo pueden desamidarse a los correspondientes residuos de glutamilo y aspartilo. Como alternativa, estos residuos se desamidán en condiciones ácidas suaves. Las dos formas de estos residuos están dentro del alcance de esta invención.
- Los residuos de cisteinilo pueden sustituirse por residuos de aminoácido u otros restos para o bien eliminar los enlaces disulfuro o bien, en cambio, estabilizar la reticulación. Véase, por ejemplo, Bhatnagar *et al.* (1996), J. Med. Chem. 39: 3814-9.
- 55 La derivatización con agentes bifuncionales es útil para reticular los péptidos o sus derivados funcionales a una matriz de soporte insoluble en agua o a otros vehículos macromoleculares. Agentes de entrecruzamiento que se

usan habitualmente incluyen, por ejemplo, 1,1-bis(diazoacetil)-2-feniletano, glutaraldehído, ésteres de N-hidroxisuccinimida, por ejemplo, ésteres con ácido 4-azidosalicílico, imidoésteres homobifuncionales, incluyendo ésteres de disuccinimidilo tales como 3,3'-ditiobis(succinimidilpropionato), y maleimidias bifuncionales tales como bis-N-maleimido-1,8-octano. Agentes derivatizantes tales como metil-3-[(p-azidofenil)ditio]propioimidato proporcionan intermedios que pueden fotoactivarse que son capaces de formar reticulaciones en presencia de luz. Alternativamente, matrices reactivos insolubles en agua tales como carbohidratos activados por bromuro de cianógeno y los sustratos reactivos descritos en las patentes estadounidenses nº 3.969.287; 3.691.016; 4.195.128; 4.247.642; 4.229.537; y 4.330.440 se emplean para la inmovilización de proteínas.

Grupos de carbohidrato (oligosacárido) pueden de manera conveniente unirse a sitios que se conocen que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, oligosacáridos unidos a O se unen a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que oligosacáridos unidos a N se unen a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en la que X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos naturales diferentes de prolina. Las estructuras de los oligosacáridos unidos a N y unidos a O y los residuos de azúcares que se encuentran en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra habitualmente en ambos es ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal de oligosacáridos unidos tanto a N como a O y, debido a su carga negativa, puede impartir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el grupo de unión de los compuestos de esta invención y se glicosilan preferiblemente por una célula durante la producción recombinante de los compuestos de polipéptido (por ejemplo, en células mamíferas tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden glicosilarse adicionalmente mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

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

Los compuestos de la presente invención pueden cambiarse a nivel de ADN también. La secuencia de ADN de cualquier parte del compuesto puede cambiarse a codones más compatibles con la célula huésped elegida. Para *E. coli*, que es la célula huésped preferida, se conocen codones optimizados en la técnica. Los codones pueden sustituirse para eliminar sitios de restricción o para incluir sitios de restricción silenciosos, que pueden ayudar en el tratamiento del ADN en la célula huésped seleccionada. El vehículo, el grupo de unión y las secuencias peptídicas de ADN pueden modificarse para incluir cualquiera de los cambios de secuencia anteriores.

Derivados conjugados con isótopos y toxinas. Otro conjunto de derivados útiles son las moléculas descritas anteriormente conjugadas a toxinas, trazadores o radioisótopos. Tal conjugación es especialmente útil para moléculas que comprenden secuencias peptídicas que se unen a células tumorales o patógenos. Tales moléculas pueden usarse como agentes terapéuticos o como ayuda en cirugía (por ejemplo, cirugía radioinmunoguiada o RIGS) o como agentes diagnósticos (por ejemplo, radioinmunodiagnóstico o RID).

Como agentes terapéuticos, estos derivados conjugados presentan varias ventajas. Facilitan el uso de toxinas y radioisótopos que serían tóxicos si se administrasen sin la unión específica proporcionada por la secuencia peptídica. También pueden reducir los efectos secundarios que acompañan al uso de radiación y quimioterapia facilitando dosis eficaces menores de la pareja de conjugación.

Las parejas de conjugación útiles incluyen:

- radioisótopos, tales como itrio 90, yodo 131, actinio 225 y bismuto 213;
- toxina ricina A, toxinas derivadas de microbios tales como endotoxina de *Pseudomonas* (por ejemplo, PE38, PE40), y similares;
- parejas moleculares en sistemas de captura (véase a continuación);
- biotina, estreptavidina (útiles como o bien parejas moleculares en sistemas de captura o bien como trazadores, especialmente para uso diagnóstico); y
- agentes citotóxicos (por ejemplo, doxorubicina).

Una adaptación útil de estos derivados conjugados es su uso en un sistema de captura. En un sistema de este tipo, la molécula de la presente invención comprendería una molécula de captura benigna. Esta molécula de captura podría unirse específicamente a una molécula efectora separada que comprende, por ejemplo, una toxina o un radioisótopo. Tanto la molécula conjugada con vehículo como la molécula efectora se administrarían al paciente. En un sistema de este tipo, la molécula efectora tendría una vida media corta excepto cuando está unida a la molécula de captura conjugada con el vehículo, minimizando por tanto cualquier efecto secundario tóxico. La molécula conjugada con el vehículo tendría una vida media relativamente larga pero sería benigna y no tóxica. Las partes de unión específica de ambas moléculas pueden ser parte de un par de unión específica conocida (por ejemplo, biotina,

estreptavidina) o pueden resultar de métodos de generación de péptidos tales como los descritos en el presente documento.

Tales derivados conjugados pueden prepararse mediante métodos conocidos en la técnica. En el caso de moléculas efectoras proteicas (por ejemplo, endotoxina de *Pseudomonas*), tales moléculas pueden expresarse como proteínas de fusión a partir de constructos de ADN correlativos. Pueden prepararse derivados conjugados con radioisótopos, por ejemplo, tal como se describe para el anticuerpo BEXA (Coulter). Pueden prepararse derivados que comprenden agentes citotóxicos o toxinas microbianas, por ejemplo, tal como se describe para el anticuerpo BR96 (Bristol-Myers Squibb). Pueden prepararse moléculas empleadas en sistemas de captura, por ejemplo, tal como se describe mediante las patentes, solicitudes de patente y publicaciones de NeoRx. Pueden prepararse moléculas empleadas para RIGS y RID, por ejemplo, mediante las patentes, solicitudes de patente y publicaciones de NeoProbe.

Vehículos

La invención requiere la presencia de al menos un vehículo unido a un péptido a través del extremo N-terminal, extremo C-terminal o una cadena lateral de uno de los residuos de aminoácido. También pueden usarse múltiples vehículos. En un aspecto, un dominio Fc es el vehículo. El dominio Fc puede fusionarse a los extremos N- o C-terminal de los péptidos o en los extremos tanto N- como C-terminal.

En varias realizaciones de la invención, el componente de Fc es o bien un Fc nativo o bien una variante de Fc. La fuente de inmunoglobulina del Fc nativo es, en un aspecto, de origen humano y puede, en realizaciones alternativas, ser de cualquier clase de inmunoglobulina. Los dominios Fc nativos están constituidos por polipéptidos monoméricos que pueden unirse para dar formas dimericas o multiméricas mediante asociación covalente (es decir, enlaces disulfuro) y/o no covalente. El número de enlaces disulfuro intermoleculares entre subunidades monoméricas de moléculas de Fc nativas oscila de 1 a 4 dependiendo de la clase (por ejemplo, IgG, IgA, IgE) o la subclase (por ejemplo, IgG1, IgG2, IgG3, IgA1, IgGA2). Un ejemplo de un Fc nativo es un dímero unido por enlaces disulfuro que resulta de la digestión con papaína de una IgG (véase Ellison *et al.* (1982), *Nucleic Acids Res.* 10: 4071-9).

Debe observarse que los monómeros de Fc se dimerizarán de manera espontánea cuando estén presentes los residuos de cisteína apropiados, a menos que estén presentes condiciones particulares que impiden la dimerización a través de la formación de enlaces disulfuro. Incluso si los residuos de cisteína que normalmente forman enlaces disulfuro en el dímero de Fc se eliminan o sustituyen por otros residuos, las cadenas monoméricas generalmente formarán un dímero a través de interacciones no covalentes. El término "Fc" en el presente documento se usa para referirse a cualquiera de estas formas: el monómero nativo, el dímero nativo (unido por enlaces disulfuro), dímeros modificados (unidos por enlaces disulfuro y/o de manera no covalente), y monómeros modificados (es decir, derivados).

Tal como se observa, las variantes de Fc son vehículos adecuados dentro del alcance de esta invención. Un Fc nativo puede modificarse extensamente para formar una variante de Fc siempre que se mantenga la unión al receptor salvaje; véanse por ejemplo los documentos WO 97/34631 y WO 96/32478. En tales variantes de Fc, pueden eliminarse uno o más sitios de un Fc nativo que proporcionan características estructurales o actividad funcional no requerida por las moléculas de fusión de esta invención. Pueden eliminarse estos sitios, por ejemplo, sustituyendo o delecionando residuos, insertando residuos en el sitio o truncando partes que contienen el sitio. Los residuos insertados o sustituidos también pueden ser aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos. Pueden ser deseables variantes de Fc por varios motivos, varios de los cuales se describen a continuación. Ejemplos de variantes de Fc incluyen moléculas y secuencias en las que:

1. Se eliminan sitios implicados en la formación de enlaces disulfuro. Tal eliminación puede evitar la reacción con otras proteínas que contienen cisteína presentes en la célula huésped usada para producir las moléculas de la invención. Para este fin, puede truncarse el segmento que contiene cisteína en el extremo N-terminal o pueden delecionarse o sustituirse residuos de cisteína por otros aminoácidos (por ejemplo, alanilo, serilo). Incluso cuando se eliminan residuos de cisteína, los dominios Fc de cadena sencilla pueden formar todavía un dominio Fc dimerico que se mantiene unido de manera no covalente.

2. Se modifica un Fc nativo para hacerlo más compatible con una célula huésped seleccionada. Por ejemplo, puede eliminarse la secuencia PA cerca del extremo N-terminal de un Fc nativo típico, que puede reconocerse por una enzima digestiva en *E. coli* tal como prolina iminopeptidasa. También puede añadirse un residuo de metionina N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.

3. Se elimina una parte del extremo N-terminal de un Fc nativo para impedir la heterogeneidad N-terminal cuando se expresa en una célula huésped seleccionada. Para este fin, puede delecionarse cualquiera de los primeros 20 residuos de aminoácido en el extremo N-terminal, particularmente aquellos en las posiciones 1, 2, 3, 4 y 5.

4. Se eliminan uno o más sitios de glicosilación. Residuos que normalmente están glicosilados (por ejemplo, asparagina) pueden conferir una respuesta citolítica. Tales residuos pueden delecionarse o sustituirse por residuos no glicosilados (por ejemplo, alanina).

5. Se eliminan sitios implicados en interacción con el complemento, tal como el sitio de unión a C1q. Por ejemplo, puede deleccionarse o sustituirse la secuencia EKK de IgG1 humana. El reclutamiento del complemento puede no ser ventajoso para las moléculas de esta invención y de ese modo puede evitarse con una variante de Fc de este tipo.
6. Se eliminan sitios que afectan a la unión a receptores de Fc distintos de un receptor salvaje. Un Fc nativo puede tener sitios para la interacción con determinados glóbulos blancos que no se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y por tanto pueden eliminarse.
7. Se elimina el sitio de ADCC. Los sitios de ADCC se conocen en la técnica; véase, por ejemplo, *Molec. Immunol.* 29 (5): 633-9 (1992) con respecto a sitios de ADCC en IgG1. Estos sitios tampoco se requieren para las moléculas de fusión de la presente invención y por tanto pueden eliminarse.
8. Cuando el Fc nativo se deriva de un anticuerpo no humano, el Fc nativo puede humanizarse. Normalmente, para humanizar un Fc nativo, se sustituirán residuos seleccionados en el Fc nativo no humano por residuos que se encuentran normalmente en Fc nativo humano. Se conocen bien en la técnica técnicas para la humanización de anticuerpos.
- Un vehículo alternativo sería una proteína, un polipéptido, péptido, anticuerpo, fragmento de anticuerpo o una molécula pequeña (por ejemplo, un compuesto peptidomimético) que puede unirse a un receptor salvaje. Por ejemplo, podría usarse como vehículo un polipéptido tal como se describe en la patente estadounidense n.º 5.739.277, concedida el 14 de abril de 1998 a *Presta et al.* También podrían seleccionarse péptidos mediante presentación en fago para la unión al receptor salvaje FcRn. Tales compuestos de unión a receptor salvaje también se incluyen dentro del significado de "vehículo" y están dentro del alcance de esta invención. Tales vehículos deben seleccionarse para lograr un aumento de la vida media (por ejemplo, evitando secuencias reconocidas por proteasas) y una disminución de la inmunogenicidad (por ejemplo, favoreciendo secuencias no inmunogénicas, tal como se descubre en la humanización de anticuerpos).
- Pueden construirse variantes, análogos o derivados de la parte de Fc, por ejemplo, realizando diversas sustituciones de residuos o secuencias.
- Polipéptidos de variantes (o análogos) incluyen variantes de inserción, en las que uno o más residuos de aminoácido complementan una secuencia de aminoácidos de Fc. Las inserciones pueden estar ubicadas en cualquiera o ambos extremos terminales de la proteína, o pueden estar colocadas dentro de regiones internas de la secuencia de aminoácidos de Fc. Variantes de inserción, con residuos adicionales en cualquiera o ambos extremos terminales, pueden incluir por ejemplo proteínas de fusión y proteínas que incluyen marcadores o etiquetas de aminoácido. Por ejemplo, la molécula de Fc puede contener opcionalmente una Met N-terminal, especialmente cuando la molécula se expresa de manera recombinante en una célula bacteriana tal como *E. coli*.
- En variantes de deleción de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácido en un polipéptido de Fc. Las deleciones pueden efectuarse en uno o ambos extremos terminales del polipéptido de Fc, o con eliminación de uno o más residuos dentro de la secuencia de aminoácidos de Fc. Las variantes de deleción, por tanto, incluyen todos los fragmentos de una secuencia de polipéptido de Fc.
- En variantes de sustitución de Fc, se eliminan uno o más residuos de aminoácido de un polipéptido de Fc y se sustituyen por residuos alternativos. En un aspecto, las sustituciones son de naturaleza conservativa y se conocen bien en la técnica sustituciones conservativas de este tipo. Alternativamente, la invención abarca sustituciones que son también no conservativas. Ejemplos de sustituciones conservativas se describen en Lehninger, [Biochemistry, 2ª edición; Worth Publishers, Inc. Nueva York (1975), pág. 71-77] y se exponen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS I

CARACTERÍSTICA DE CADENA LATERAL AMINOÁCIDO

No polar (hidrófoba)

A. Alifática	ALIVP
B. Aromática	FW
C. Que contiene azufre	M
D. Límite	G

No cargada polar:

A. Hidroxilo	STY
B. Amidas	NQ

C. Sulfhidrilo	C
D. Límite	G
Con carga positiva (básica)	KRH
Con carga negativa (ácida)	DE

Ejemplos de sustituciones conservativas alternativas se exponen a continuación.

SUSTITUCIONES CONSERVATIVAS II

RESIDUO ORIGINAL EJEMPLO DE SUSTITUCIÓN

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

5 Por ejemplo, pueden delecionarse o reemplazarse residuos de cisteína por otros aminoácidos para impedir la formación de parte de o todas las reticulaciones por disulfuros de las secuencias de Fc. Cada residuo de cisteína puede eliminarse y/o sustituirse por otros aminoácidos, tales como Ala o Ser. Como otro ejemplo, también pueden hacerse modificaciones para introducir sustituciones de aminoácidos para (1) suprimir el sitio de unión a receptor de Fc; (2) suprimir el sitio de unión al complemento (C1q); y/o (3) suprimir el sitio de citotoxicidad mediada por células dependiente de anticuerpos (ADCC). Tales sitios se conocen en la técnica, y cualquier sustitución conocida está dentro del alcance de Fc tal como se usa en el presente documento. Por ejemplo, véase Molecular Immunology, vol. 29, n.º 5, 633-639 (1992) con respecto a sitios de ADCC en IgG1.

10 Asimismo, pueden sustituirse uno o más residuos de tirosina por residuos de fenilalanina. Además, también se contemplan otras inserciones, delecciones y/o sustituciones de aminoácidos variantes y están dentro del alcance de la presente invención. Generalmente se prefieren sustituciones de aminoácidos conservativas. Además, las alteraciones pueden estar en forma de aminoácidos alterados, tales como peptidomiméticos o D-aminoácidos.

15 También pueden derivatizarse secuencias de Fc tal como se describe en el presente documento para péptidos, es decir, que llevan modificaciones distintas de inserción, delección, o sustitución de residuos de aminoácido. Preferiblemente, las modificaciones son de naturaleza covalente, e incluyen por ejemplo, enlaces químicos con polímeros, lípidos, otros restos orgánicos e inorgánicos. Pueden prepararse derivados de la invención para aumentar la vida media circulante, o pueden diseñarse para mejorar la capacidad de direccionamiento del polipéptido a

células, tejidos u órganos deseados.

También es posible usar el dominio de unión al receptor salvaje de la molécula de Fc intacta como la parte de Fc de un compuesto de la invención, tal como se describe en el documento WO 96/32478, titulado "Altered Polypeptides with Increased Half-Life". Miembros adicionales de la clase de moléculas designadas como Fc en el presente documento son aquellas que se describen en el documento WO 97/34631, titulado "Immunoglobulin like-domains with increased half-lives".

Componentes WSP

Los compuestos de la invención pueden incluir además al menos un WSP. El resto WPS de la molécula puede ser ramificado o no ramificado. Para el uso terapéutico de la preparación del producto final, el polímero es farmacéuticamente aceptable. En general, se selecciona un polímero deseado basándose en tales consideraciones como si el conjugado del polímero se usará terapéuticamente, y en ese caso, la dosis deseada, el tiempo de circulación, resistencia a proteólisis, y otras consideraciones. En diversos aspectos, el peso molecular promedio de cada polímero soluble en agua está entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 12 kDa y aproximadamente 40 kDa y entre aproximadamente 20 kDa y aproximadamente 35 kDa. En aún otro aspecto el peso molecular de cada polímero está entre aproximadamente 6 kDa y aproximadamente 25 kDa. El término "aproximadamente" tal como se usa en el presente documento y en su totalidad, indica que en las preparaciones de un polímero soluble en agua, algunas moléculas pesarán más, algunas menos, que el peso molecular mencionado. Generalmente, cuánto mayor es el peso molecular o cuántas más ramificaciones, más alta es la proporción polímero/proteína. Pueden usarse otros tamaños, en función del perfil terapéutico deseado incluyendo, por ejemplo, la duración de la liberación sostenida; los efectos, si los hay, sobre la actividad biológica; la facilidad en la manipulación; el grado o falta de antigenicidad y otros efectos conocidos de un polímero soluble en agua sobre una proteína terapéutica.

El WSP debe unirse a un polipéptido o péptido teniendo en consideración los efectos sobre dominios funcionales o antigénicos del polipéptido o péptido. En general, puede realizarse una derivatización química en cualquier condición adecuada usada para hacer reaccionar una proteína con una molécula de polímero activado. Los grupos de activación que pueden usarse para unir el polímero soluble en agua a una o más proteínas incluyen sin limitación sulfona, maleimida, sulfhidrido, tiol, triflato, tresilato, azidirina, oxirano y 5-piridilo. Si se une al péptido mediante alquilación reductora, el polímero seleccionado debe tener un único aldehído reactivo de modo que el grado de polimerización se controle.

Los polímeros solubles en agua adecuados, clínicamente aceptables incluyen sin limitación PEG, polietilenglicol propionaldehído, copolímeros de etilenglicol/propilenglicol, monometoxi-polietilenglicol, carboximetilcelulosa, poliacetales, poli (alcohol vinílico) (PVA), polivinilpirrolidona, poli-1,3-dioxolano, poli-1,3, 6-trioxano, copolímero de etileno/anhídrido maleico, poli-(beta-aminoácidos) (o bien homopolímeros o bien copolímeros al azar), poli (n-vinilpirrolidona) polietilenglicol, homopolímeros de propilenglicol (PPG) y otros poli (óxidos de alquileo), copolímeros de poli (óxido de propileno)/óxido de etileno, polioles polioxielados (POG) (por ejemplo, glicerol) y otros polioles polioxielados, sorbitol polioxielado o glucosa polioxielada, ácidos colónicos u otros polímeros de hidratos de carbono, Ficoll o dextrano y mezclas de los mismos.

Los polímeros solubles en agua también pueden hacerse para ser térmicamente sensibles, como en la formación de geles térmicos inversos. Ejemplos incluyen Tetronics, con estructuras principales tetra armadas y copolímeros de PEG-PLGA. La hidrofilia de los polímeros puede variarse sustituyendo las partes hidrófobas en la cadena polimérica. Un ejemplo de esto es en la fabricación de PLGA, en el que la proporción de ácido láctico a ácido glicólico puede aumentarse para permitir una menor solubilidad en agua. Pueden desearse polímeros solubles en agua inferiores en determinadas aplicaciones, por ejemplo en el aumento del potencial para interaccionar con membranas celulares. A la hora de la reconstitución, puede usarse una proporción de fosfolípidos para inducir la formación de micelas o liposomas en disolución. La ventaja de un sistema tal puede estar en la capacidad de incorporar algo de la proteína dentro de la micela, con el potencial beneficio de prolongar la administración. Los fosfolípidos capaces de formar liposomas o micelas incluyen DMPG, DMPC, DOPC, DOPG y componentes de refuerzo de liposomas secundarios apropiados tales como colesterol. Determinados excipientes, tales como DEA-oleth-10 fosfato y oleth 10-fosfato, son capaces de formar micelas en disolución.

Los polímeros de polisacáridos son otro tipo de polímero soluble en agua que pueden usarse para la modificación de péptidos. La modificación de proteínas o péptidos mediante la adición de polisacárido(s), por ejemplo, glicosilación, puede aumentar la semivida, disminuir la antigenicidad, aumentar la estabilidad y disminuir la proteólisis. Los dextranos son polímeros de polisacáridos compuestos por subunidades individuales de glucosa unidas de manera predominante mediante enlaces α 1-6. El propio dextrano está disponible en muchos intervalos de peso molecular, y está fácilmente disponible en pesos moleculares de desde aproximadamente 1 kD hasta aproximadamente 70 kD. El dextrano es un polímero soluble en agua adecuado para su uso en la presente invención como vehículo por sí mismo o en combinación con otro vehículo (por ejemplo, Fc). Véanse, por ejemplo, los documentos WO 96/11953 y WO 96/05309. Se ha notificado el uso de dextrano conjugado a inmunoglobulinas terapéuticas o de diagnóstico; véase, por ejemplo, la publicación de patente europea n.º 0 315 456. Se prefiere dextrano de aproximadamente 1 kD a aproximadamente 20 kD cuando se usa dextrano como vehículo según la presente invención.

En una realización, el WSP es PEG y la invención contempla preparaciones en las que se modifica un compuesto para incluir cualquiera de las formas de PEG que se han usado para derivatizar otras proteínas tales como y sin limitación mono-(C1-C10) alcoxi- o ariloxi-polietilenglicol. El polietilenglicol propionaldehído puede tener ventajas en la fabricación debido a su estabilidad en agua. El grupo PEG puede ser de cualquier peso molecular conveniente y puede ser lineal o ramificado. El peso molecular promedio de PEG contemplado para su uso en la invención oscila entre aproximadamente 2 kDa y aproximadamente 100 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 50 kDa, entre aproximadamente 5 kDa y aproximadamente 10 kDa. En otro aspecto, el resto de PEG tiene un peso molecular de desde aproximadamente 6 kDa hasta aproximadamente 25 kDa. Los grupos PEG generalmente se unen a péptidos o proteínas por medio de acilación o alquilación reductora a través de un grupo reactivo en el resto de PEG (por ejemplo, un grupo aldehído, amino, tiol o éster) con un grupo reactivo en la proteína o el péptido diana (por ejemplo, un grupo aldehído, amino o éster). Usando métodos descritos en el presente documento, puede prepararse una mezcla de moléculas de conjugados de polímero/péptido, y la ventaja proporcionada en el presente documento es la capacidad para seleccionar la proporción de conjugado de polímero/péptido que va a incluirse en la mezcla. Por tanto, si se desea, puede prepararse una mezcla de péptidos con diversos números de restos de polímero unidos (es decir, cero, uno o dos) con una proporción determinada de conjugado de polímero/proteína.

Una estrategia útil para la pegilación (otros métodos se describen en más detalle en el presente documento) de péptidos sintéticos consiste en combinar, a través de la formación de un enlace de conjugado en disolución, un péptido y un resto de PEG, llevando cada uno una funcionalidad especial que es mutuamente reactiva hacia la otra. Los péptidos pueden prepararse fácilmente con síntesis en fase sólida convencional. Los péptidos se "preactivan" con un grupo funcional apropiado en un sitio específico. Los precursores se purifican y se caracterizan completamente antes de reaccionar con el resto de PEG. El ligamiento del péptido con PEG tiene lugar habitualmente en fase acuosa y puede monitorizarse fácilmente mediante HPLC analítica de fase inversa. Los péptidos pegilados pueden purificarse fácilmente mediante HPLC preparativa y caracterizarse mediante HPLC analítica, análisis de aminoácidos y espectrometría de masas de desorción láser.

25 Grupos de unión

Cualquier "grupo de unión" es opcional, tanto si se posiciona entre péptidos, péptido y vehículo o vehículo y WSP. Cuando está presente, su estructura química no es crítica, ya que sirve principalmente como separador. El grupo de unión se compone preferiblemente de aminoácidos unidos entre sí por enlaces peptídicos. Por tanto, en realizaciones preferidas, el grupo de unión se compone de desde 1 hasta 20 aminoácidos unidos por enlaces peptídicos, en el que los aminoácidos se seleccionan de los 20 aminoácidos naturales. Algunos de estos aminoácidos pueden glicosilarse, como entienden bien los expertos en la técnica. En una realización más preferida, los 1 a 20 aminoácidos se seleccionan de glicina, alanina, prolina, asparagina, glutamina, y lisina. Incluso más preferiblemente, un grupo de unión se compone de una mayoría de aminoácidos que están estéricamente impedidos, tal como glicina y alanina. Por tanto, grupos de unión preferidos son poligliconas (particularmente (Gly)₄, (Gly)₅, (Gly)₈, poli(Gly-Ala), y polialaninas. Otros ejemplos de grupos de unión específicos son:

(Gly)₃Lys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 1018)

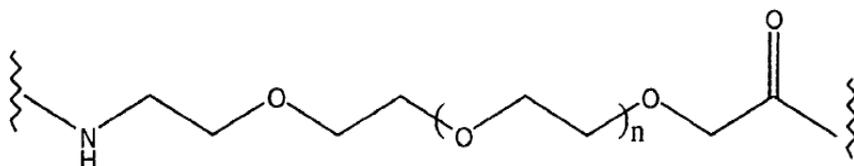
(Gly)₃AsnGlySer(Gly)₂ (SEQ ID NO: 1019);

(Gly)₃Cys(Gly)₄ (SEQ ID NO: 1020); y

GlyProAsnGlyGly (SEQ ID NO: 1021).

40 Para explicar la nomenclatura anterior, por ejemplo, (Gly)₃Lys(Gly)₄ significa Gly-Gly-Gly-Lys-Gly-Gly-Gly-Gly. También se prefieren combinaciones de Gly y Ala. Los grupos de unión mostrados aquí son ejemplos; los grupos de unión dentro del alcance de esta invención pueden ser más largos y pueden incluir otros residuos.

También son posibles grupos de unión no peptídicos. Por ejemplo, podrían usarse grupos de unión alquilo tales como -NH-(CH₂)_s-C(O)-, en el que s = 2-20. Estos grupos de unión alquilo pueden sustituirse adicionalmente por cualquier grupo que no impida estéricamente, tal como alquilo inferior (por ejemplo, C1-C6), acilo inferior, halógeno (por ejemplo, Cl, Br), CN, NH₂, fenilo, etc. Un ejemplo de grupo de unión no peptídico es un grupo de unión PEG,



en el que n es tal que el grupo de unión tiene un peso molecular de 100 a 5000 kD, preferiblemente 100 a 500 kD. Los grupos de unión peptídicos pueden alterarse para formar derivados de la misma manera descrita anteriormente.

50 Producción de péptidos y polipéptidos:

Un péptido que se ha identificado puede prepararse en células huésped transformadas usando técnicas de ADN recombinante. Si el componente de vehículo es un polipéptido, el producto de fusión de polipéptido- o péptido-vehículo puede expresarse como uno. Para hacer esto, se prepara en primer lugar una molécula de ADN recombinante que codifica para el péptido usando métodos bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, podrían cortarse secuencias que codifican para los péptidos de ADN usando enzimas de restricción adecuadas. Alternativamente, la molécula de ADN podría sintetizarse usando técnicas de síntesis química, tal como el método de fosforamidato. Además, podría usarse una combinación de estas técnicas. La invención proporciona por tanto polinucleótidos que codifican para un compuesto de la invención.

La invención también proporciona vectores que codifican para compuestos de la invención en un huésped apropiado. El vector comprende el polinucleótido que codifica para el compuesto operativamente unido a secuencias de control de la expresión adecuadas. Se conocen bien métodos para efectuar esta unión operativa, o bien antes o bien después de insertarse el polinucleótido en el vector. Las secuencias de control de la expresión incluyen promotores, activadores, potenciadores, operadores, sitios de unión ribosómicos, señales de iniciación, señales de detención, señales de caperuza, señales de poliadenilación y otras señales implicadas en el control de la transcripción o traducción.

El vector resultante que tiene el polinucleótido en el mismo se usa para transformar un huésped apropiado. Esta transformación puede realizarse usando métodos bien conocidos en la técnica.

Puede usarse cualquiera de un gran número de células huésped disponibles y bien conocidas en la práctica de esta invención. La selección de un huésped particular depende de varios factores reconocidos por la técnica. Estos incluyen, por ejemplo, la compatibilidad con el vector de expresión elegido, la toxicidad de los péptidos codificados por la molécula de ADN, la tasa de transformación, la facilidad de recuperación de los péptidos, las características de expresión, bioseguridad y costes. Debe conseguirse un equilibrio de estos factores con la comprensión de que no todos los huéspedes pueden ser igualmente eficaces para la expresión de una secuencia de ADN particular. Dentro de estas directrices generales, los huéspedes microbianos útiles incluyen bacterias (tales como *E. coli*), levaduras (tales como *Saccharomyces*) y otros hongos, insectos, plantas, células de mamífero (incluyendo ser humano) en cultivo, u otros huéspedes conocidos en la técnica.

A continuación, el huésped transformado se cultiva y se purifica. Las células huésped pueden cultivarse en condiciones de fermentación convencionales de modo que se expresen los compuestos deseados. Tales condiciones de fermentación se conocen bien en la técnica. Finalmente, los péptidos se purifican del cultivo mediante métodos bien conocidos en la técnica.

Dependiendo de la célula huésped utilizada para expresar un compuesto de la invención, pueden unirse convenientemente grupos hidrato de carbono (oligosacárido) a sitios que se sabe que son sitios de glicosilación en proteínas. Generalmente, se unen oligosacáridos con unión a O a residuos de serina (Ser) o treonina (Thr) mientras que se unen oligosacáridos con unión a N a residuos de asparagina (Asn) cuando son parte de la secuencia Asn-X-Ser/Thr, en donde X puede ser cualquier aminoácido excepto prolina. X es preferiblemente uno de los 19 aminoácidos que se producen de manera natural sin contar la prolina. Las estructuras de oligosacáridos con unión a N y con unión a O y los residuos de azúcar encontrados en cada tipo son diferentes. Un tipo de azúcar que se encuentra comúnmente en ambos es ácido N-acetilneuramínico (denominado ácido siálico). El ácido siálico es habitualmente el residuo terminal de oligosacáridos tanto con unión a N como con unión a O y, en virtud de su carga negativa, puede conferir propiedades ácidas al compuesto glicosilado. Tal(es) sitio(s) puede(n) incorporarse en el grupo de unión de los compuestos de esta invención y se glicosilan preferiblemente por una célula durante la producción recombinante de los compuestos de polipéptido (por ejemplo, en células de mamífero tales como CHO, BHK, COS). Sin embargo, tales sitios pueden glicosilarse además mediante procedimientos sintéticos o semisintéticos conocidos en la técnica.

Alternativamente, los compuestos pueden prepararse por métodos sintéticos. Por ejemplo, pueden usarse técnicas de síntesis en fase sólida. Se conocen bien en la técnica técnicas adecuadas, e incluyen las descritas en Merrifield (1973), *Chem. Polypeptides*, págs. 335-61 (Katsoyannis y Panayotis eds.); Merrifield (1963), *J. Am. Chem. Soc.* 85: 2149; Davis *et al.* (1985), *Biochem. Intl.* 10: 394-414; Stewart y Young (1969), *Solid Phase Peptide Synthesis*; patente estadounidense n.º 3.941.763; Finn *et al.* (1976), *The Proteins* (3ª ed.) 2: 105-253; y Erickson *et al.* (1976), *The Proteins* (3ª ed.) 2: 257-527. La síntesis en fase sólida en la técnica preferida de preparación de péptidos individuales ya que es el método más económico de preparación de péptidos pequeños.

Compuestos que contienen péptidos derivatizados o que contienen grupos no peptídicos son particularmente propensos a la síntesis mediante técnicas de química orgánica bien conocidas.

Modificación con WSP

Para obtener un compuesto covalentemente unido a WSP, se emplea cualquier método descrito en el presente documento o conocido de otra forma en la técnica. Los métodos para preparar derivados químicos de polipéptidos o péptidos comprenderán generalmente las etapas de (a) hacer reaccionar el péptido con la molécula de polímero activado (tal como un derivado de aldehído o éster reactivo de la molécula de polímero) en condiciones mediante las

cuales el polipéptido se une a una o más moléculas de polímero, y (b) obtener el/los producto(s) de reacción. Las condiciones de reacción óptimas se determinarán basándose en parámetros conocidos y el resultado deseado. Por ejemplo, cuanto mayor es la razón de moléculas de polímero:proteína, mayor es el porcentaje de molécula de polímero unida.

5 Una molécula biológicamente activa puede unirse a un polímero a través de cualquier grupo funcional disponible usando métodos convencionales bien conocidos en la técnica. Los ejemplos de grupos funcionales en o bien el polímero o bien la molécula biológicamente activa que pueden usarse para formar tales enlaces incluyen grupos amina y carboxilo, grupos tiol tales como en residuos de cisteína, aldehídos y cetonas, y grupos hidroxilo tal como pueden encontrarse en residuos de serina, treonina, tirosina, hidroxiprolina e hidroxilisina.

10 El polímero puede activarse acoplado un grupo reactivo tal como tricloro-s-triazina [Abuchowski, *et al.*, (1977), *J. Biol. Chem.* 252:3582-3586], carbonilimidazol [Beauchamp, *et al.*, (1983), *Anal. Biochem.* 131:25-33] o succinato de succinimidilo. [Abuchowski, *et al.*, (1984), *Cancer Biochem. Biophys.* 7: 175,186] con el fin de reaccionar con una funcionalidad amina en la molécula biológicamente activa. Otro método de acoplamiento implica la formación de un grupo glioxililo en una molécula y un grupo aminoóxido, hidrazida o semicarbazida en la otra molécula que va a conjugarse [Fields y Dixon, (1968), *Biochem. J.* 108:883-887; Gaertner, *et al.*, (1992), *Bioconjugate Chem.* 3:262-268; Geoghegan y Stroh, (1992), *Bioconjugate Chem.* 3:138- 146; Gaertner, *et al.*, (1994), *J. Biol. Chem.* 269:7224-7230]. Otros métodos implican la formación de un éster activo en un grupo alcohol libre de la primera molécula que va a conjugarse usando cloroformiato o carbonato de disuccinimidilo, que entonces puede conjugarse con un grupo amina en la otra molécula que va a acoplarse [Veronese, *et al.*, (1985), *Biochem. y Biotech.* 11: 141-152; Nitecki, *et al.*, patente estadounidense n.º 5.089.261; Nitecki, patente estadounidense n.º 5.281.698]. Otros grupos reactivos que pueden unirse por medio de grupos alcohol libres se exponen en Wright, documento EP 0539167A2, que también describe el uso de imidatos para el acoplamiento por medio de grupos amina libres.

25 Otra química implica la acilación de las aminas primarias de una diana usando el NHS-éster de metoxi-PEG (0-[(N-succinimidiloxicarbonil)-metil]-O'-metilpolietilenglicol). La acilación con metoxi-PEG-NHS da como resultado un enlace amida que eliminará la carga de la amina primaria original. Otros métodos utilizan oxidación suave de una diana en condiciones seleccionadas para seleccionar como diana el diol colgante del penúltimo ácido siálico de la unidad de glicosilo para su oxidación para dar un aldehído. El glicolaldehído resultante se hizo reaccionar entonces con un metoxi-PEG-hidrazida (O-(hidrazinocarbonilmetil)-O'-metilpolietilenglicol) para formar hidrazona semiestable entre PEG y la diana. La hidrazona se reduce posteriormente mediante cianoborohidruro de sodio para producir un conjugado de PEG estable. Véase por ejemplo, la patente estadounidense n.º 6.586.398 (Kinstler, *et al.*, 1 de julio de 2003).

30 En aplicaciones específicas de técnicas para modificación química, por ejemplo, la patente estadounidense n.º 4.002.531 establece que se usó alquilación reductora para la unión de moléculas de polietilenglicol a una enzima. La patente estadounidense n.º 4.179.337 da a conocer conjugados de PEG:proteína que implican, por ejemplo, enzimas e insulina. La patente estadounidense n.º 4.904.584 da a conocer la modificación del número de residuos de lisina en proteínas para la unión de moléculas de polietilenglicol por medio de grupos amina reactivos. La patente estadounidense n.º 5.834.594 da a conocer conjugados de PEG:proteína solubles en agua sustancialmente no inmunogénicos, que implican por ejemplo, las proteínas IL-2, interferón alfa e IL-1ra. Los métodos de Hakimi *et al.* implican la utilización de grupos de unión únicos para conectar los diversos grupos amino libres en la proteína a PEG. Las patentes estadounidenses n.ºs 5.824.784 y 5.985.265 enseñan métodos que permiten la modificación química en el extremo N-terminal de proteínas de manera selectiva y análogos de las mismas, incluyendo G-CSF e interferón consenso. De manera importante, estas proteínas modificadas tienen ventajas en lo que se refiere a la estabilidad de la proteína, así como proporcionan ventajas de procesamiento.

45 La modificación con WSP también se describe en Francis *et al.*, en: *Stability of protein pharmaceuticals: in vivo pathways of degradation and strategies for protein stabilization* (Eds. Ahem., T. y Manning, M. C.) Plenum, N. Y., 1991. En todavía otro aspecto, el método descrito en Delgado *et al.*, "Coupling of PEG to Protein By Activation With Tresyl Chloride, Applications in Immunoaffinity Cell Preparation", en: Fisher *et al.*, eds., *Separations Using Aqueous Phase Systems, Applications In Cell Biology and Biotechnology*, Plenum Press, N.Y., N.Y., 1989 págs. 211:213 que implica el uso de cloruro de tresilo, que da como resultado la falta de grupo de unión entre el resto de WSP y el resto de polipéptido. En otros aspectos, la unión de un WSP se realiza a través del uso de ésteres de N-hidroxisuccinimidilo de carboximetilmetoxipolietilenglicol, tal como se conoce bien en la técnica.

50 Para otras descripciones de modificación de una diana con un WSP, véanse, por ejemplo, la solicitud de patente estadounidense n.º 20030096400; los documentos EP 0 442724A2; EP 0154316; EP 0401384; WO 94/13322; las patentes estadounidenses n.ºs 5.362.852; 5.089.261; 5.281.698; 6.423.685; 6.635.646; 6.433.135; la solicitud internacional WO 90/07938; Gaertner y Offord, (1996), *Bioconjugate Chem.* 7:38-44; Greenwald *et al.*, *Crit Rev Therap Drug Carrier Syst.* 2000; 17:101-161; Kopecek *et al.*, *J Controlled Release.*, 74:147-158, 2001; Harris *et al.*, *Clin Pharmacokinet.* 2001; 40(7):539-51; Zalipsky *et al.*, *Bioconjug Chem.* 1997; 8:111-118; Nathan *et al.*, *Macromolecules.* 1992; 25:4476-4484; Nathan *et al.*, *Bioconj Chem.* 1993; 4:54- 62; y Francis *et al.*, *Focus on Growth Factors*, 3:4-10 (1992).

60 Alquilación reductora

En un aspecto, la unión covalente de un WSP se lleva a cabo mediante procedimientos de modificación química por alquilación reductora tal como se proporciona en el presente documento para modificar selectivamente el grupo α -amino N-terminal, y sometiendo a prueba el producto resultante para detectar la característica biológica deseada, tal como los ensayos de actividad biológica proporcionados en el presente documento.

5 La alquilación reductora para la unión de un WSP a una proteína o péptido se aprovecha de la reactividad diferencial de diferentes tipos de grupos amino primarios (por ejemplo, lisina frente al N-terminal) disponibles para la derivatización en una proteína particular. En las condiciones de reacción apropiadas, se logra una derivatización sustancialmente selectiva de la proteína en el extremo N-terminal con un polímero que contiene grupo carbonilo.

10 Para la alquilación reductora, el/los polímero(s) seleccionado(s) podrían tener un único grupo aldehído reactivo. Un aldehído reactivo es, por ejemplo, polietilenglicolpropionaldehído, que es estable en agua, o derivados de monoalcoxilo o ariloxilo C_1 - C_{10} de los mismos (véase la patente estadounidense n.º 5.252.714. En un enfoque, se emplea alquilación reductora para conjugar un PEG-aldehído (O-(3-oxopropil)-O'-metilpolietilenglicol) con una amina primaria. En las condiciones apropiadas, se ha demostrado que este enfoque produce conjugados de PEG modificados predominantemente a través de α -amina en el extremo N-terminal de la proteína.

15 Puede generarse una funcionalidad aldehído útil para conjugar la molécula biológicamente activa a partir de una funcionalidad que tiene grupos amino y alcohol adyacentes. En un polipéptido, por ejemplo, puede usarse una serina, treonina o hidroxilisina N-terminal para generar una funcionalidad aldehído por medio de escisión oxidativa en condiciones suaves usando peryodato. Estos residuos, o sus equivalentes, pueden estar presentes normalmente, por ejemplo en el extremo N-terminal de un polipéptido, pueden exponerse por medio de digestión química o
20 enzimática o pueden introducirse por medio de métodos recombinantes o químicos. Las condiciones de reacción para generar el aldehído implican normalmente la adición de un exceso molar de metaperyodato de sodio y en condiciones suaves para evitar la oxidación en otras posiciones en la proteína. El pH es preferiblemente de aproximadamente 7,0. Una reacción típica implica la adición de un exceso molar de 1,5 veces de metaperyodato de sodio, seguido por incubación durante 10 minutos a temperatura ambiente en la oscuridad.

25 El grupo funcional aldehído puede acoplarse a un polímero activado que contiene una funcionalidad hidrazida o semicarbazida para formar un enlace hidrazona o semicarbazona. Están disponibles comercialmente polímeros que contienen hidrazida, y pueden sintetizarse, si es necesario, usando técnicas convencionales. Las PEG-hidrazidas para su uso en la invención pueden obtenerse de Shearwater Polymers, Inc., 2307 Spring Branch Road, Huntsville, Ala. 35801 (ahora parte de Nektar Therapeutics, 150 Industrial Road, San Carlos, CA 94070-6256). El aldehído se
30 acopla al polímero mezclando la disolución de los dos componentes entre sí y calentando hasta aproximadamente 37°C hasta que la reacción es sustancialmente completa. Se usa normalmente un exceso del polímero hidrazida para aumentar la cantidad de conjugado obtenido. Un tiempo de reacción típico es de 26 horas. Dependiendo de la estabilidad térmica de los reactantes, la temperatura y el tiempo de reacción pueden alterarse para proporcionar resultados adecuados. Se expone una determinación detallada de las condiciones de reacción para tanto la oxidación como el acoplamiento en Geoghegan y Stroh, (1992), Bioconjugate Chem. 3:138-146, y en Geoghegan,
35 patente estadounidense n.º 5.362.852.

Usando alquilación reductora, el agente reductor debe ser estable en disolución acuosa y preferiblemente poder reducir sólo la base de Schiff formada en el proceso inicial de alquilación reductora. Se seleccionan agentes reductores de, y sin limitación, borohidruro de sodio, cianoborohidruro de sodio, borato de dimetilamina, borato de
40 trimetilamina y borato de piridina.

El pH de reacción afecta a la razón de polímero con respecto a proteína que va a usarse. En general, si el pH de la reacción es inferior al pK_a de un grupo reactivo diana, se deseará un exceso mayor de polímero con respecto a proteína. Si el pH es superior al pK_a diana, no es necesario que la razón de polímero: proteína sea tan grande (es decir, están disponibles más grupos reactivos, de modo que se necesitan menos moléculas de polímero).

45 Por consiguiente, la reacción se realiza en un aspecto a un pH que permite aprovecharse de las diferencias de pK_a entre los grupos ϵ -amino de los residuos de lisina y el del grupo α -amino del residuo N-terminal de la proteína. Mediante tal derivatización selectiva, se controla la unión de un polímero soluble en agua a una proteína; la conjugación con el polímero tiene lugar predominantemente en el extremo N-terminal de la proteína y sin que se produzca modificación significativa de otros grupos reactivos, tales como los grupos amino de la cadena lateral de la
50 lisina.

En un aspecto, por tanto, se proporcionan métodos para la unión covalente de un WSP a un compuesto diana y que proporcionan una preparación sustancialmente homogénea de moléculas de conjugado de WSP/proteína, en ausencia de purificación extensiva adicional tal como se requiere usando otras químicas de modificación química. Más específicamente, si se usa polietilenglicol, los métodos descritos permiten la producción de una proteína
55 pegilada en el extremo N-terminal que carece posiblemente de grupos de unión antigénicos, es decir, el resto de polietilenglicol está acoplado directamente al resto de proteína sin subproductos potencialmente tóxicos.

Dependiendo del método de unión de WSP elegido, la proporción de moléculas de WSP unidas a la molécula de péptido o proteína diana variará, así como sus concentraciones en la mezcla de reacción. En general, la razón

óptima (en cuanto a eficacia de reacción de que no haya proteína o polímero sin reaccionar en exceso) se determina mediante el peso molecular del WSP seleccionado. Además, cuando se usan métodos que implican unión no específica y purificación posterior de una especie deseada, la razón puede depender del número de grupos reactivos (normalmente grupos amino) disponibles.

5 Purificación

El método de obtención de una preparación modificada con WSP sustancialmente homogénea es, en un aspecto, mediante purificación de una especie predominantemente única de compuesto modificado a partir de una mezcla de especies. A modo de ejemplo, se separa en primer lugar una especie sustancialmente homogénea mediante cromatografía de intercambio iónico para obtener material que tiene una característica de carga de una única especie (aun cuando puedan estar presentes otras especies que tienen la misma carga aparente), y entonces se separa la especie deseada usando cromatografía de exclusión molecular. Se notifican otros métodos y los contempla la invención, incluye por ejemplo, el documento PCT WO 90/04606, publicado el 3 de mayo de 1990, que describe un procedimiento para fraccionar una mezcla de aductos de PEG-proteína que comprende repartir los aductos de PEG/proteína en un sistema bifásico acuoso que contiene PEG.

Por tanto, un aspecto es un método para preparar un conjugado de compuesto modificado con WSP comprendido por (a) hacer reaccionar un compuesto que tiene más de un grupo amino con un resto de polímero soluble en agua en condiciones de alquilación reductora, a un pH adecuado para activar selectivamente el grupo α -amino en el extremo amino-terminal del resto de proteína de modo que dicho polímero soluble en agua se une selectivamente a dicho grupo α -amino; y (b) obtener el producto de reacción. Opcionalmente, y particularmente para un producto terapéutico, los productos de reacción se separan de los restos sin reaccionar.

Tal como se determina mediante mapeo de péptidos y secuenciación N-terminal, se da a conocer una preparación que comprende al menos el 50% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar. Se dan a conocer otras preparaciones que comprenden al menos el 75% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar; al menos el 85% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar; al menos el 90% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar; al menos el 95% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar; y al menos el 99% de péptido pegilado en una mezcla de péptido pegilado y péptido sin reaccionar.

No se pretende que los siguientes ejemplos sean limitativos, sino únicamente a modo de ejemplo de realizaciones específicas de la invención.

30 Ejemplo 1

Conjunto de constructo de expresión mFc-TMP

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

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

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

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

40 1209-85: CGTACAGTTTACGCAAGAAAATGG (SEQ ID NO: 1028)

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

Se purificaron en gel los fragmento de PCR resultantes y se combinaron en un único tubo para una segunda ronda de PCR con los cebadores 1209-85 (SEQ ID NO: 1030) y 1388-00 (SEQ ID NO: 1031). El producto de PCR de esta segunda ronda de amplificación se purificó en gel y se digirió con las enzimas de restricción *NdeI* y *XhoI*. Se purificó el fragmento de digestión y se ligó al vector pAMG21, digerido previamente con las mismas enzimas. Se transformó esta mezcla de ligación por medio de electroporación en *E. coli* y se sembró en placas sobre medios de LB + kanamicina. Se exploraron las colonias por medio de PCR y secuenciación de ADN. Se identificó un clon positivo con una secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO: 1032) que codifica para la proteína de fusión mFc-TMP (SEQ ID NO: 1033) y se designó como 6397.

50 Polinucleótido que codifica para proteínas de fusión TMP con Fc murino (SEQ ID NO: 1034)

1 GATTTGATTC TAGATTTGTT TTAAC TAATT AAAGGAGGAA TAACAT

Marco de lectura abierto:

ES 2 599 318 T3

ATGGTCGACGGTTG TAAGCCATGC ATTTGTACAG TCCCAGAAGT ATCATCTGTC
101 TTCATCTTCC CCCCAAAGCC CAAGGATGTG CTCACCATTA CTCTGACTCC
151 TAAGGTCACG TGTGTTGTGG TAGACATCAG CAAGGATGAT CCCGAGGTCC
201 AGTTCAGCTG GTTTGTAGAT GATGTGGAGG TGCACACAGC TCAGACGCAA
251 CCCCGGGAGG AGCAGTTCAA CAGCACTTTC CGCTCAGTCA GTGAACTTCC
301 CATCATGCAC CAGGACTGGC TCAATGGCAA GGAGTTCAAA TGCAGGGTCA
351 ACAGTGCAGC TTTCCCTGCC CCCATCGAGA AAACCATCTC CAAAACCAAA
401 GGCAGACCGA AGGCTCCACA GGTGTACACC ATTCCACCTC CCAAGGAGCA
451 GATGGCCAAG GATAAAGTCA GTCTGACCTG CATGATAACA GACTTCTTCC
501 CTGAAGACAT TACTGTGGAG TGGCAGTGG AATGGGCAGCC AGCGGAGAAC
551 TACAAGAACA CTCAGCCCAT CATGGACACA GATGGCTCTT ACTTCGTCTA
601 CAGCAAGCTC AATGTGCAGA AGAGCAACTG GGAGGCAGGA AATACTTTCA
651 CCTGCTCTGT GTTACATGAG GGCCTGCACA ACCACCATAC TGAGAAGAGC
701 CTCTCCCACT CTCCGGGTAA AGGTGGAGGT GGTGGTATCG AAGGTCCGAC
751 TCTGCGTCAG TGGCTGGCTG CTCGTGCTGG TGGTGGAGGT GCGGCGGAG
801 GTATTGAGGG CCCAACCCTT CGCCAATGGC TTGCAGCACG CGCATAA

Secuencia 3':

TCTCGAGGATCCG CGGAAAGAAG AAGAAGAAGA AGAAAGCCCG AAAGG

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

1 MVDGCKPCIC TVPEVSSVFI FPPKPKDVLIT ITLTPKVTCV VVDISKDDPE
 51 VQFSWFVDDV EVHTAQTPR EEQFNSTFRS VSELPIMHQD WLNKKEFKCR
 101 VNAAFPAPI EKTISKTKGR PKAPQVYTIP PPKEQMAKDK VSLTCMITDF
 151 FPEDITVEWQ WNGQPAENYK NTQPIMDTDG SYFVYSKLVN QKSNWEAGNT
 201 FTCSVLHEGL HNHHTKSL S HSPGKGGGGG IEGPTLRQWL AARAGGGGGG
 251 GGIEGPTLRQ WLAARA*

Ejemplo 2

Fermentación de la cepa 6397

5 Se inició la fermentación de la cepa 6397 mediante la inoculación de 500 ml de caldo Luria esterilizado con un cultivo de siembra de la cepa en un matraz con agitación. Cuando la densidad de células alcanzó 0,9 a 600 nm, se usó el contenido para inocular un fermentador de 15 l que contenía 10 l de medio de crecimiento a base de complejo (800 g de glicerol, 500 g de tripticasa, 3 g de citrato de sodio, 40 g de KH₂PO₄, 20 g (NH₄)₂SO₄, 5 ml de antiespumante Fluka P-2000, 10 ml de metales traza (cloruro férrico 27,0 g/l, cloruro de zinc 2,00 g/l, cloruro de cobalto 2,00 g/l, molibdato de sodio 2,00 g/l, cloruro de calcio 1,00 g/l, sulfato cúprico 1,90 g/l, ácido bórico 0,50 g/l, cloruro de manganeso 1,60 g/l, citrato de sodio dihidratado 73,5 g/l), 10 ml de vitaminas (biotina 0,060 g/l, ácido fólico 0,040 g/l, riboflavina 0,42 g/l, HCl de piridoxina 1,40 g/l, niacina 6,10 g/l, ácido pantoténico 5,40 g/l, hidróxido de sodio 5,30 ml/l), añadir agua para llevar hasta 10 l). Se mantuvo el fermentador a 37°C y pH 7 con niveles de oxígeno disueltos mantenidos a un mínimo del 30% de saturación. Cuando la densidad de células alcanzó 13,1 unidades de DO a 600 nm, se indujo el cultivo mediante la adición de 10 ml de N-(3-oxo-hexanoil)homoserina-lactona 0,5 mg/ml. A las 6 horas tras la inducción, se enfrió el caldo hasta 10°C y se recogieron las células mediante centrifugación a 4550 g durante 60 min a 5°C. Entonces se almacenó la pasta de células a -80°C.

Ejemplo 3

Replegamiento de proteína

20 Se disolvió la pasta de *E. coli* (300 g) de la cepa 6397 que expresa mFc-TMP en 2250 ml de tampón de lisis (Tris HCl 50 mM, EDTA 5 mM, pH 8,0) y se hizo pasar dos veces a través de un microfluidizador enfriado a 13.000 PSI. Entonces se centrifugó el homogeneizado a 11.300 g durante 60 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en 2400 ml de agua usando una trituradora tisular. Entonces se centrifugó el homogeneizado a 11.300 g durante 60 minutos a 4°C. Se desechó el sobrenadante y se resuspendió el sedimento en volúmenes de 200 ml de agua usando una trituradora tisular. Se centrifugó el homogeneizado a 27.200 g durante 30 minutos a 4°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió aproximadamente el 12,5% del sedimento en 28 ml de Tris HCl 20 mM, pH 8,0, con 35 mg de lisozima de clara de huevo de gallina (Sigma, St. Louis, MO) usando una trituradora tisular y se incubó a 37°C durante 20 min. Tras la incubación, se centrifugó la suspensión a 27.200 g durante 30 minutos a 22°C y se desechó el sobrenadante. Se resuspendió el sedimento en 35 ml de HCl de guanidina 8 M, Tris HCl 50 mM, pH 8,0, tras lo cual se añadieron 350 µl de DTT 1 M (Sigma, St. Louis, MO) y se incubó el material a 37°C durante 30 minutos. Entonces se centrifugó la disolución a 27.200 g durante 30 minutos a 22°C. Entonces se transfirió el sobrenadante a 3,5 l de tampón de replegamiento (base de Tris 50 mM, HCl de arginina 160 mM, urea 3 M, glicerol al 20%, pH 9,5, cisteína 1 mM, HCl de cistamina 1 mM) a 1 ml/min con agitación suave a 4°C.

Ejemplo 4

35 Purificación de constructo

Tras aproximadamente 40 horas de incubación a 4°C con agitación suave, se concentró la disolución de replegamiento descrita en el ejemplo 3 hasta 500 µl usando un aparato de ultrafiltración de flujo tangencial con un cartucho de 30 kDa (Satorius, Goettingen, Alemania) seguido por diafiltración frente a 3 l de Q-Buffer A (Tris HCl 20 mM, pH 8,0). Se filtró el material concentrado a través de un filtro GF/A de Whatman y se cargó en una columna de flujo rápido de 86 ml de Q-Sepharose (2,6 cm de DI) (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ) a 15 ml/min. Tras lavar la resina con varios volúmenes de columna de Q-Buffer A, se eluyó la proteína usando un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna hasta el 60% de Q-Buffer B (Tris HCl 20 mM, NaCl 1 M, pH 8,0) a 10 ml/min. Se

combinaron las fracciones pico y se hizo pasar la combinación a través de un filtro de jeringa Mustang E (Pall Corporation, East Hills, NY) a 1 ml/min. Se filtró el material filtrado una segunda vez a través de un filtro de acetato de celulosa de 0,22 μm y se almacenó a -80°C .

Ejemplo 5

5 Pegilación de proteína

A una disolución con agitación, enfriada (4°C), de mFc-TMP (3,5 ml, 0,8 mg/ml) en un tampón acetato de sodio 100 mM, pH 5, que contenía NaCNBH_3 20 mM, se le añadió un exceso molar de 3,8 veces de metoxipolietilenglicol aldehído (MPEG) (peso molecular promedio, 20 kDa) (Nektar). Se continuó agitando la mezcla de reacción a la misma temperatura. Se monitorizó el grado de la modificación de proteína durante el transcurso de la reacción mediante SEC HPLC usando una columna Superose 6 HR 10/30 (Amersham Biosciences) eluida con un tampón fosfato 0,05 M con NaCl 0,15 M, pH 7,0 a 0,4 ml/min. Tras 16 horas, el análisis de SEC HPLC indicó que la mayoría de la proteína se había conjugado con MPEG. En este momento, se cambió el tampón de la mezcla de reacción a un tampón Tris/HCl 20 mM, pH 8,12. Se aislaron los conjugados de MPEG-mFc-AMP2 mediante cromatografía de intercambio iónico usando una columna Hi Trap HP Q de 1 ml (Amersham Biosciences) equilibrada con un tampón Tris/HCl 20 mM, pH 8,12. Se cargó la mezcla de reacción en la columna a una velocidad de flujo de 0,5 ml/min y se eluyó el MPEG aldehído que no había reaccionado con tres volúmenes de columna del tampón de partida. Se usó un gradiente lineal de 20 volúmenes de columna de desde el 0% hasta el 100% de tampón Tris/HCl 20 mM, pH 8,12, que contenía NaCl 0,5 M para eluir los conjugados de proteína-polímero. Las fracciones (2 ml) recogidas durante la separación por cromatografía de intercambio iónico se analizaron mediante HPLC SEC tal como se describió anteriormente. Se concentró una fracción que contenía los conjugados de mono- y di-MPEG-mFc-TMP en una razón aproximada de 2,3 a 1 (tal como se determinó mediante SEC HPLC), y se filtró de manera estéril.

Ejemplo 6

Pruebas *in vivo*

Se dividieron ratones BDF1 (Charles River Laboratories, Wilmington, Massachusetts) en grupos de 10 y se les inyectó en los días 0, 21 y 42 por vía subcutánea o bien agente de dilución (PBS de Dulbecco con albúmina sérica bovina al 0,1%) o bien agente de dilución con 50 μg de proteína de conjugado de mono- y di-MPEG-mFc-TMP de prueba (tal como se describió anteriormente) por kg de animal. Se dividió cada grupo por la mitad y se extrajo sangre (140 μl) del seno retroorbital en puntos de tiempo alternos (días 0, 3, 5, 7, 10, 12, 14, 19, 24, 26, 28, 31, 33, 40, 45, 47, 49, 52 y 59). El día 59, se anestesiaron los ratones con isoflurano antes de la extracción de sangre. Se analizó la sangre recogida para un recuento completo y diferencial usando un analizador de sangre automatizado ADVIA 120 con software murino (Bayer Diagnostics, Nueva York, NY).

Ejemplo 7

Fc-TMP humano liofilizado

Estudios de exploración de la formulación liofilizada inicial

35 El peptidocuerpo Fc-TMP humano descrito en el presente documento en el ejemplo 7 corresponde a una forma dimérica de SEQ ID NO: 1017, en la que el Fc humano es SEQ ID NO: 1, que tiene una metionina iniciadora en el extremo N-terminal.

Se evaluó la estabilidad de Fc-TMP mediante varias técnicas de cromatografía: HPLC de fase inversa, HPLC de intercambio catiónico, HPLC de exclusión molecular y SDS-PAGE, todas las cuales indicaban estabilidad a temperatura elevada. Se exploraron formulaciones que oscilaban en su concentración entre 0,1 y 40 mg/ml para la degradación tanto química como física a una temperatura acelerada, refrigerada y congelada. Se evaluó la estabilidad de Fc-TMP con respecto a un pH variable y la inclusión de manitol o glicina como agentes de formación de torta y sacarosa como lioprotector. Se eligieron finalmente manitol y sacarosa por una optimización adicional, después de que el otro candidato (glicina) no mostrase ninguna mejora en la estabilidad de la proteína. También se mostró que Tween-20 (polisorbato 20) inhibía la agregación tras la liofilización a lo largo de un intervalo de concentración del 0,002 al 0,1%. Se examinaron los siguientes tampones en estudios de exploración a lo largo de un intervalo de pH de 4-8: glicina, succinato, histidina, fosfato y Tris. A partir de estos estudios de exploración, se mostró que Fc-TMP formulado en tampón histidina a pH 5 con una pequeña cantidad de Tween-20 (0,004%) añadida era más óptimo para la estabilidad.

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

Los esfuerzos de desarrollo posteriores se centraron en validar el nivel de sacarosa, manitol y Tween-20 en la formulación a una concentración de proteína de aproximadamente 0,5 mg/ml (para adaptarse a los requisitos de dosificación anticipados en la práctica clínica). En estos estudios se demostró el efecto de la sacarosa, el manitol y Tween-20 en la optimización de la estabilidad. También se iniciaron estudios de seguimiento con el propósito de anticipar las cuestiones y problemas de fabricación.

La sacarosa es beneficiosa a la hora de minimizar la degradación química a temperatura elevada

Se sometió a prueba el efecto de concentraciones de sacarosa y manitol variables sobre la estabilidad de Fc-TMP. Se formuló la proteína a 0,3 y 2 mg/ml con el fin de delimitar el intervalo de concentración anticipado en la práctica clínica. Además, se prepararon muestras con y sin Tween-20 al 0,004%. Se cambió la razón de sacarosa:manitol variando la cantidad de sacarosa y ajustando el nivel de manitol a cada concentración de sacarosa para mantener la isotonicidad. Se examinaron las siguientes razones de sacarosa:manitol (expresadas como porcentaje en peso por volumen): 0,2:5,1; 0,5:4,8; 1:4,5; 1,5:4,3 y 2:4.

Se muestra que razones superiores de sacarosa:manitol minimizan la degradación química según se monitorizó mediante intercambio catiónico y HPLC de fase inversa. Tal como se muestra en la tabla 39, el pico principal en tanto por ciento se compara inicialmente y tras un almacenamiento a temperatura elevada de Fc-TMP durante 18 semanas a 37°C. La mayor pérdida de pico principal de intercambio catiónico se produce en la formulación líquida (Fc-TMP formulado en acetato 10 mM, sorbitol al 5% a pH 5), seguida por las formulaciones liofilizadas con sacarosa al 0,2, 0,5 y 1,0%, respectivamente. También se observó el efecto protector de la sacarosa minimizando la degradación química mediante el análisis de HPLC de fase inversa de muestras tras un almacenamiento a temperatura elevada (tabla 39). El pico principal en tanto por ciento (determinado a partir del análisis de HPLC de fase inversa de Fc-TMP) cae significativamente a los niveles de sacarosa bajos, pero no parece cambiar significativamente en formulaciones con concentraciones de sacarosa de más del 1%. Interpretados en conjunto, estos resultados indican que mantener los niveles de sacarosa al 1,5% o superior es crítico para la estabilidad de Fc-TMP tras la liofilización.

Tabla 39

**Fc-TMP en histidina 10 mM, tamponado a pH 5 con Tween-20
Pérdida de pico principal de RP y CEX-HPLC tras 18 semanas a 37°C**

Formulación	RP-HPLC		CEX-HPLC	
	Tiempo cero	18 semanas	Tiempo cero	18 semanas
sacarosa al 0,2%, manitol al 5,1%	78,6	72,2	79,8	62,6
sacarosa al 0,5%, manitol al 4,8%	77,3	73,1	78,9	71,6
sacarosa al 1%, manitol al 4,5%	78,4	78,0	80,5	73,9
sacarosa al 1,5%, manitol al 4,3%	73,2	79,8	80,5	78,7
sacarosa al 2%, manitol al 4%	79,2	81,3	78,6	78,9
acetato 10 mM, sorbitol al 5%, pH 5 (control líquido)	74,7	42,8	75,5	34,1

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

A temperatura refrigerada, no se observa degradación química mediante intercambio catiónico ni HPLC de fase inversa en la formulación liofilizada tras un almacenamiento de largo plazo. Por ejemplo, los cromatogramas de intercambio catiónico no mostraron cambios evidentes a temperaturas variadas (-80°C, 4°C y temperatura ambiente controlada durante 6 meses). Debido a la falta de degradación química en la formulación liofilizada a lo largo del tiempo a la temperatura ambiente controlada e inferior, gran parte del trabajo de desarrollo de la formulación se centró en minimizar la agregación física asociada con el secado por congelación.

Tween-20 minimiza la agregación inducida mediante liofilización

Es necesaria la inclusión de Tween-20 a una concentración baja (0,004%) para minimizar una pequeña cantidad de agregación que resulta evidente tras la liofilización. Esto puede demostrarse examinando los resultados relevantes a partir de varios estudios de estabilidad en los se evalúan muestras para determinar su estabilidad con y sin la adición de Tween-20.

En primer lugar se usó una concentración de proteína más alta de Fc-TMP para explorar un intervalo amplio de Tween-20 con el fin de investigar la cantidad necesaria para minimizar la agregación. La concentración de Fc-TMP en este estudio era de 20 mg/ml, con los niveles de Tween-20 fijados al 0,002, al 0,004, al 0,006 y al 0,01%. Tras un almacenamiento durante un año a 4°C, la agregación está limitada a <0,1% en todas las formulaciones con Tween-20. Los resultados a los seis meses tampoco mostraron una agregación significativa. Se eligió Tween-20 al 0,004% para su consideración adicional en los estudios de formulación, tal como se comenta en el presente documento, diseñados para Fc-TMP a 0,5 mg/ml.

La tabla 40 muestra la cantidad de agregación en Fc-TMP monitorizado en el tiempo cero, 3 y 11 meses tras el almacenamiento a 4°C. En este estudio, se liofilizó Fc-TMP a 0,5 mg/ml en la formulación mencionada anteriormente

5 y en formulaciones con razones de sacarosa:manitol variables sin Tween-20 añadido. Además, se hizo un seguimiento de la estabilidad en la formulación actual sin Tween-20 y tamponada a pH 4,5, 5 y 5,5. Los resultados muestran que sólo la formulación mencionada anteriormente tiene una agregación mínima a pH 5. En formulaciones sin Tween-20, la agregación varía desde el 0,5% hasta aproximadamente el 5%. La agregación también es mayor a pH 4,5 y 5,5 en comparación con la detectada a pH 5. Las razones de sacarosa:manitol inferiores (formulaciones de sacarosa al 0,2, al 0,5 y al 1%) tiene una agregación mayor, ya que los niveles son normalmente de aproximadamente el 5%. A lo largo del tiempo, el nivel de agregación se mantiene constante en la formulación mencionada anteriormente y en la formulación sin Tween-20 hasta el punto de tiempo de 1 año.

Tabla 40

10 **Fc-TMP en histidina 10 mM, formulaciones variadas, 0,5 mg/ml**
Agregación en tanto por ciento medida mediante SEC-HPLC

Formulación	Tiempo cero	3 meses	11 meses ¹
sacarosa al 2%, manitol al 4%, pH 5,0 (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	<0,1	<0,1
sacarosa al 2%, manitol al 4%, pH 4,5	2,4	2,9	-
sacarosa al 2%, manitol al 4%, pH 5,0	0,5	1,6	0,8
sacarosa al 2%, manitol al 4%, pH 5,5	2,3	2,5	-
sacarosa al 0,2%, manitol al 5,1%, pH 5,0	4,8	7,3	-
sacarosa al 0,5%, manitol al 4,8%, pH 5,0	5,1	4,4	-
sacarosa al 1%, manitol al 4,5%, pH 5,0	4,5	4,3	-

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

15 Se diseñaron estudios de formulación adicionales para confirmar el efecto beneficioso de Tween-20 minimizando la agregación. Todas las muestras en estos estudios se formularon a pH 5 con y sin Tween-20 al 0,004%. La tabla 41 enumera la agregación en tanto por ciento tras el almacenamiento a 4°C durante intervalos de tiempo de cero, 18 semanas y 1 año de estabilidad. En el tiempo cero, inmediatamente tras la liofilización, se minimiza la agregación en todas las muestras con Tween-20 al 0,004%. Se observan pequeñas cantidades de agregación en muestras sin Tween-20, encontrándose la mayor cantidad en la formulación con sacarosa al 0,2%. La eficacia de Tween-20 minimizando la agregación también se prolonga hasta el punto de tiempo de 18 semanas, encontrándose una agregación en tanto por ciento mayor en muestras que carecen de Tween-20 y a razones de sacarosa:manitol bajas. Tras el almacenamiento durante un año a 4°C, la agregación también es baja de manera constante en las muestras que contienen Tween-20.

Tabla 41

20 **Fc-TMP en histidina 10 mM, formulaciones variadas, 0,3 mg/ml, pH 5**
Agregación en tanto por ciento medida mediante SEC-HPLC tras almacenamiento a 4°C

Formulación	Tiempo cero	4 meses	1 año ¹
sacarosa al 2%, manitol al 4% (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	0,2	<0,1
sacarosa al 2%, manitol al 4%	0,2	0,2	-
sacarosa al 0,2%, manitol al 5,1% (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	<0,1	<0,1
sacarosa al 0,2%, manitol al 5,1%	1,1	1,3	-
sacarosa al 0,5%, manitol al 4,8% (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	0,2	<0,1
sacarosa al 0,5%, manitol al 4,8%	0,2	0,8	-
sacarosa al 1%, manitol al 4,5% (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	<0,1	<0,1
sacarosa al 1%, manitol al 4,5%	0,1	0,3	-
sacarosa al 1,5%, manitol al 4,8% (con Tween-20 al 0,004%)	<0,1	<0,1	<0,1
sacarosa al 1,5%, manitol al 4,8%	0,1	0,3	-

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

25 Otro estudio de estabilidad, diseñado para someter a prueba la eficacia de antioxidantes minimizando la degradación química, reforzó el efecto protector de Tween-20. Los antioxidantes no tuvieron un impacto sobre la minimización de la degradación química tras almacenamiento a temperatura elevada. Sin embargo, la formulación mencionada anteriormente, con Tween-20 al 0,004% y a una concentración de Fc-TMP de 0,2 mg/ml, tuvo una agregación del <0,1% en el tiempo cero y del 0,1% tras 5 meses de almacenamiento a 4°C. La misma formulación sin Tween-20 tuvo una agregación del 0,4% en el tiempo cero y una agregación del 1% tras almacenamiento durante 5 meses.

30 Los resultados del estudio de estabilidad presentados en las tablas II, III y los estudios mencionados anteriormente

5 ilustran el efecto protector de Tween-20 minimizando la agregación tras la liofilización. El crecimiento de agregación a lo largo del tiempo es mínimo, al no mostrar los puntos de tiempo que se prolongan hasta 1 año a 4°C ningún aumento significativo en la agregación en muestras formuladas con Tween-20 al 0,004%. Basándose en estos resultados de estudio de estabilidad que muestran que la adición de Tween-20 minimiza la agregación tras la liofilización, se inició un trabajo de ampliación a escala con la formulación recomendada.

Estudios de aumento a escala

La agregación depende de la concentración

10 Se diseñó un estudio de aumento a escala inicial para simular las condiciones de fabricación y examinar la robustez de la formulación con respecto un estrés por envío y la estabilidad tras la reconstitución. Se cambió el tampón de Fc-TMP al tampón de formulación usando un dispositivo de filtración de flujo tangencial, similar a procesos de escala mayor. Posteriormente se diluyó la proteína hasta concentraciones de 0,5 y 0,1 mg/ml añadiéndose también Tween-20 antes de la etapa de filtración final. Tras cargarse las muestras, se llevó a cabo la liofilización. A continuación se expone un proceso de liofilización a modo de muestra:

Etapas de tratamiento térmico

	Temp.	Tiempo	Varía/Se mantiene
Etapa n.º 1	-50	120	V
Etapa n.º 2	-50	120	M
Etapa n.º 3	-13	60	V
Etapa n.º 4	-13	360	M
Etapa n.º 5	-50	60	V
Etapa n.º 6	-50	60	M

Temp. de congelación	-50°C
Congelación adicional	0 min
Punto de ajuste de condensador	-60°C
Punto de ajuste de vacío	100 mTorr

15

Etapas de secado primario

	Temp.	Tiempo	Vac.	Varía/Se mantiene
Etapa n.º 1	-50	15	100	M
Etapa n.º 2	-25	120	100	V
Etapa n.º 3	-25	600	100	M
Etapa n.º 4	-25	600	100	M
Etapa n.º 5	0	800	100	V
Etapa n.º 6	25	800	100	V
Etapa n.º 7	25	800	100	M
Etapa n.º 8	25	800	100	M
Etapa n.º 9	25	0	100	M
Etapa n.º 10	25	0	100	M
Etapa n.º 11	25	0	100	M
Etapa n.º 12	25	0	100	M
Etapa n.º 13	25	0	100	M
Etapa n.º 14	25	0	100	M
Etapa n.º 15	25	0	100	M
Etapa n.º 16	25	0	100	M
Tras el calor	25	100	100	M

Temperatura secundaria 28°C

20 El almacenamiento pasivo a 4°C dio como resultado más agregación a la concentración de Fc-TMP baja (0,1 mg/ml). En el tiempo cero, se determinó mediante SEC-HPLC que la agregación era del 0,4% en la formulación de 0,1 mg/ml, mientras que se detectó una agregación del 0,1% en la proteína formulada a 0,5 mg/ml. Tras seis meses de almacenamiento a temperatura refrigerada, la agregación se mantuvo a los mismos niveles que los observados para las muestras de tiempo cero para ambas concentraciones de Fc-TMP, en concordancia con los resultados de estudios de estabilidad previos. Debido a la mayor cantidad de agregación observada a la concentración más baja (0,1 mg/ml) se decidió que 0,5 mg/ml sería la más adecuada como la concentración de elección para el trabajo de aumento a escala adicional.

La agregación no aumenta tras un esfuerzo cortante simulado

25 También se sometieron a transporte por tierra y por aire simulado muestras liofilizadas (no reconstituidas) del estudio de aumento a escala inicial con la ayuda de equipo de simulación de estrés. En resumen, se siguió el

5 protocolo explicado en la norma ASTM (American Society of Testing Methods), método n.º D-4728. Se llevó a cabo el transporte por tierra y por aire simulado usando una mesa de vibración electrodinámica, modelo S202, y un amplificador de potencia, modelo n.º TA240 (Unholtz-Dickie Corporation, Wallingford, CT). Tras el estrés por transporte, se comparó el aspecto físico de las tortas liofilizadas con controles pasivos, con el resultado de que no resultaba evidente ningún cambio morfológico de la torta. La estabilidad tanto química como física fueron aceptables, con agregación constante en las muestras sometidas a estrés y en los controles pasivos (<0,1% en las muestras 0,5 mg/ml muestras en comparación con el 0,4% en las muestras 0,1 mg/ml).

10 Se examinó la estabilidad tras la reconstitución en este estudio preparando muestras recién reconstituidas e incubando durante 3, 7 y 14 días o bien de manera pasiva, con volteo lento, o bien con agitación vigorosa. La tabla 42 muestra los resultados para las formulaciones 0,1 y 0,5 mg/ml. Como era de esperar, la cantidad de agregación se minimiza en las formulaciones a 0,5 mg/ml. En comparación con el volteo lento a lo largo del tiempo frente a las muestras no volteadas, no resulta evidente ningún aumento significativo en la agregación a lo largo del periodo de 14 días. La cantidad de dimerización en estas formulaciones (sin volteo y con volteo) también es constante. De manera interesante, los resultados de agitación parecen reflejar una tendencia; es decir la agregación cae hasta menos de niveles detectables tras el tiempo cero en las muestras tanto 0,1 como 0,5 mg/ml. Al mismo tiempo, hay un aumento correspondiente en la cantidad de dimerización observada en la mayoría de las muestras agitadas en cada punto de tiempo, lo que sugiere que existe cierta reversibilidad al pasar del agregado al estado de dímero tras someter Fc-TMP a esfuerzo cortante.

Tabla 42

20 **Fc-TMP en histidina 10 mM, con sacarosa al 2%, manitol al 4% y Tween-20 al 0,004%, pH 5**
Dimerización y agregación en tanto por ciento medida mediante SEC-HPLC tras almacenamiento a 4

0,1 mg/ml	Tiempo cero agreg., dímero	3 días agreg., dímero	7 días agreg., dímero	14 días agreg., dímero
Sin volteo	0,4, 0,3	1,2, 0,6	1,1, 0,4	1,0, 0,4
Con volteo	0,4, 0,3	0,7, 0,4	0,7, 0,3	1,1, 0,3
Con agitación	0,4, 0,3	<0,1, 0,9	<0,1, 0,1	<0,1, 1,6
0,5 mg/ml				
Sin volteo	0,1, 0,5	0,2, 0,5	0,2, 0,5	0,2, 0,6
Con volteo	0,1, 0,5	0,2, 0,6	0,1, 0,6	0,1, 0,6
Con agitación	0,1, 0,5	<0,1, 0,9	<0,1, 1,0	<0,1, 2,2

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

25 Se llevó a cabo un segundo estudio de aumento a escala en el que se cambió el tampón de Fc-TMP y se diluyó hasta 0,5 mg/ml en la formulación recomendada. Se consiguió la liofilización con un ciclo que consistía en una etapa de congelación inicial a -50°C, seguido por templado a -13°C. Entonces se redujo la temperatura hasta -50°C, se mantuvo durante una hora y se inició el secado primario a -50°C con un punto de ajuste de vacío de 100 mTorr. Tras un breve periodo de reposo a -50°C, se redujo la temperatura hasta -25°C a lo largo de un periodo de dos horas, se mantuvo a -25°C durante 20 horas, y entonces se aumentó gradualmente hasta 25°C tras aproximadamente 27 horas para el comienzo del secado secundario. Se continuó con el secado secundario durante un mínimo de 12 horas a 25°C. Durante el ciclo de liofilización, se tomaron muestras tras 12, 18 y 24 horas de secado secundario con el fin de comprobar la estabilidad y comparar el nivel de humedad residual. Los resultados muestran que la humedad residual, medida mediante la valoración de Karl Fisher, es de aproximadamente el 0,6% o menos (tabla 43) en todas las muestras examinadas. La humedad es baja de manera similar en las tortas de placebo de tampón. Basándose en este trabajo, el tiempo de secado secundario del ciclo de liofilización puede acortarse hasta un intervalo de entre 30 35 12-18 horas.

Tabla 43

Humedad residual en Fc-TMP
Tiempos de secado secundario mantenidos a 12, 18 y 24 horas

Tiempo de secado secundario	Humedad en tanto por ciento según Karl Fisher
12 horas	0,23
12 horas	0,38
Placebo con tampón	0,43
18 horas	0,63
18 horas	0,28
Placebo con tampón	0,3
24 horas	0,46
24 horas	0,37

Placebo con tampón

0,31

Los resultados de estabilidad también son comparables a lo largo de este intervalo de tiempo de secado secundario, ya que las muestras no tienen diferencias con respecto a la estabilidad química o física. Por ejemplo, la cantidad de agregación es del <0,1% para todas las muestras examinadas, mientras el porcentaje de dímero está constantemente al 0,1%. Estos resultados confirman que el tiempo de secado secundario puede acortarse a menos de 24 horas sin afectar a la estabilidad inicial de la proteína.

Se llevó a cabo un trabajo adicional para evaluar la robustez de la formulación con respecto a concentraciones de excipientes variables. Dado que el trabajo de estabilidad previo había mostrado que la sacarosa, por ejemplo, puede tener un impacto sobre la estabilidad, fue necesario examinar la robustez de Fc-TMP tras cambios menores en los niveles de excipientes.

10 Estudio estadístico de Fc-TMP

Robustez de la formulación

Se diseñó un estudio estadístico inicial para examinar cambios menores en variables de formulación tales como el pH de la formulación, la concentración de tampón histidina y la razón de sacarosa:manitol, usando un paquete de software E-chip. Estas muestras se liofilizaron pero se usó un ciclo de secado por congelación no óptimo, que dio como resultado una agregación mayor que la observada normalmente. El estudio fue un estudio de exploración, asumiendo una superficie de respuesta lineal. Los resultados de la evaluación de estabilidad mostraron que el pH (de 4,7 a 5,3) y la concentración de tampón histidina (variada desde 5 hasta 15 mM), tenían poco impacto sobre la estabilidad de Fc-TMP. Con el fin de verificar la contribución de Tween-20 y la razón de sacarosa:manitol a la estabilidad global de Fc-TMP, se inició un estudio de diseño estadístico de seguimiento usando el ciclo de liofilización más óptimo.

Estudio de estabilidad estadístico cuadrático

El segundo estudio de diseño estadístico examinó las variaciones en Tween-20 (al 0,001%, al 0,0045% y al 0,008%), la razón de sacarosa:manitol (1,7:4,2, 2:4 y 2,3:3,8), y las variaciones en la concentración de proteína (0,3, 0,65 y 1 mg/ml). También se ajustó el pH de las formulaciones a 4,7, 5 y 5,3, y se varió la concentración de tampón histidina desde 7, 10 y 13 mM. Se prepararon muestras y se liofilizaron usando un liofilizador Virtis (SP Industries, Inc., Gardiner, NY), con un ciclo conservativo optimizado usado para los estudios de estabilidad previos. Se interpretaron los resultados de estabilidad usando E-chip (paquete de software de diseño estadístico, Hockessin, DE) de dos maneras: una evaluación del impacto de variables de formulación sobre la cantidad de agregación y dimerización observada en el tiempo cero, y del efecto de variables de formulación a la hora de afectar a la estabilidad de almacenamiento a temperatura elevada (37°C) medida mediante las tasas de cambio con respecto al tiempo cero.

Resultados de formulación de tiempo cero del estudio estadístico cuadrático

Los resultados de la evaluación de tiempo cero mostraron que, como era de esperar, Tween-20 minimiza la agregación, sin embargo la concentración de proteína también era significativa a la hora de reducir la tendencia a la agregación tras el secado por congelación. El programa de software E-chip evalúa los efectos que diferentes variables de entrada (las condiciones de formulación) tienen sobre la agregación y dimerización de Fc-TMP durante el secado por congelación. Con respecto a la dimerización de Fc-TMP en el tiempo cero, se consideró que ningún excipiente de la formulación (basándose en los resultados de E-chip) tenía un efecto significativo. Varias variables de formulación tenían un impacto sobre la cantidad de agregación observada tras el secado por congelación de Fc-TMP. Basándose en los resultados de resumen proporcionados por E-chip, la concentración de Fc-TMP tenía el mayor efecto sobre el grado de agregación observado en el tiempo cero, seguido por el nivel de Tween-20. Se observa que la agregación es máxima, en el tiempo cero, en las muestras de baja concentración. Del mismo modo, cantidades mayores de Tween-20 tienen un mayor efecto protector a la hora de minimizar la agregación en el tiempo cero, aunque esta tendencia no es tan significativa como el efecto de la concentración de proteína. Se observaron cantidades mayores de agregación en este estudio en comparación con resultados de estudio previos, y se observó aproximadamente un 0,5% de agregación en algunas muestras a las concentraciones de proteína menores con Tween-20.

Se observó que la variabilidad en la agregación cae a medida que aumenta la concentración de proteína. A 0,5 mg/ml y concentraciones mayores, Fc-TMP tiene una agregación promedio menor que en muestras formuladas a o menos de 0,3 mg/ml.

Tween-20 al 0,004% es eficaz a la hora de minimizar la agregación tras un almacenamiento a temperatura elevada

También se usó el diseño estadístico para evaluar los cambios tras el almacenamiento a temperatura elevada. Se compararon las tasas de agregación en las condiciones de formulación variadas tras 16 días a 37°C restando los resultados de temperatura elevada de los resultados iniciales (tiempo cero) y normalizando a un tiempo de un mes. Por tanto, las tasas que son negativas se refieren a una pérdida evidente de la propiedad medida a lo largo del

tiempo. Se determinaron las variables de respuesta (que corresponden a los resultados de los ensayos) a través de RP-HPLC (pureza de pico principal en tanto por ciento y tanto por ciento antes del pico), HPLC de intercambio catiónico (pureza de pico principal en tanto por ciento), HPLC de exclusión molecular (agregación y formación de dímeros) y NIR-agua (humedad residual mediante espectroscopía infrarroja, que se correlacionó con los resultados de valoración de Karl Fisher en algunas muestras para verificar la precisión).

Los resultados de una comparación de las tasas de cambio obtenidas de cada técnica de ensayo muestran que los cambios en la agregación y la oxidación por RP-HPLC eran estadísticamente significativos con respecto a la concentración de Fc-TMP y el cuadrado de la concentración de Tween-20, hasta dentro de dos desviaciones estándar. El término cuadrado de Tween-20 surge de la manera más probable de la naturaleza cuadrática del estudio, que asume una superficie de respuesta curvada. En este caso, el término de Tween-20 cuadrado se adapta mejor al modelo, además de sugerir posiblemente que hay un efecto interactivo con el mismo que afecta a la estabilidad. Las otras respuestas medidas, tales como la pureza de pico principal de HPLC de intercambio catiónico, o las condiciones de pH variadas, por ejemplo, no presentaban ninguna respuesta significativa a la hora de afectar a la estabilidad de la proteína.

Como es el caso con el estudio de aumento a escala inicial comentado previamente (muestras con volteo, sin volteo y agitadas), la cantidad de agregación es menor tras el almacenamiento a alta temperatura. La tasa de cambio en estas muestras se usó para hacer predicciones basándose en el modelo estadístico (estudio cuadrático) para anticipar el efecto protector de Tween-20. La tabla 44 muestra predicciones para la cantidad de agregación esperada, basándose en el modelo de diseño estadístico, ya que la concentración de Tween-20 se aumenta desde el 0 hasta el 0,008%. Tal como se muestra, la tasa de agregación, normalizada a un mes a 37°C, es negativa (indicando la pérdida de agregado en estas condiciones) con la excepción de Tween-20 al 0%, en cuyo caso se predice que la agregación crecería. La tasa de pérdida de agregado parece alcanzar una meseta a concentraciones de Tween-20 del 0,002% y superiores, sugiriendo que Tween-20 a niveles bajos (0,002-0,006%) es suficiente a la hora de minimizar la degradación física. La tasa de crecimiento de dímero es correspondientemente similar en estas condiciones y no está correlacionada estadísticamente con ninguno de los excipientes de la formulación, tal como se mencionó previamente.

Tabla 44

**Predicciones de modelo cuadrático estadístico
Concentración de Tween-20 y Fc-TMP variada
Basadas en 16 días de incubación a 37°C (normalizadas a un mes)**

% de Tween 20	Fc-TMP (mg/ml)	% de agregación mediante SEC	límites de predicción	% de oxidación mediante RP-HPLC	límites de predicción
0	0,5	0,09	(-0,32, 0,50)	0,47	(-2,59, 1,65)
0,002	0,5	-0,35	(-0,69, -0,0)	-0,68	(-2,44, 1,08)
0,004	0,5	-0,53	(-0,87, -0,19)	-0,58	(-2,32, 1,17)
0,006	0,5	-0,45	(-0,78, -0,12)	-0,17	(-1,86, 1,52)
0,008	0,5	-0,12	(-0,46, 0,21)	0,54	(-1,18, 2,26)
0,004	0,3	-0,59	(-0,94, -0,25)	0,58	(-1,18, 2,34)
0,004	0,1	-0,63	(-1,10, -0,16)	2,69	(0,28, 5,09)

La tasa de cambio en la oxidación medida mediante RP-HPLC a 0,5 mg/ml, asumiendo que esto corresponde a cambios en la región previa al pico de cada cromatograma, no es estadísticamente significativa con respecto al término cuadrado de Tween-20. En este caso, el modelo (tal como se muestra en la tabla 44) predice que a cuando se varía la concentración de Tween-20, la tasa de oxidación concuerda con los límites de los intervalos de predicción. La concentración de proteína afecta a la oxidación, ya que la tasa de crecimiento aumenta desde 0,58 hasta 2,69 a medida que la concentración de proteína cae desde 0,3 hasta 0,1 mg/ml (mientras se mantiene el Tween-20 constante al 0,004%).

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

Estabilidad a temperatura refrigerada

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

Se monitorizó la formulación para determinar la estabilidad a temperatura refrigerada durante un periodo de un año. La tabla 45 muestra los resultados de estabilidad de este estudio, enumerándose los resultados desde el tiempo cero, 3 meses y 1 año. Tal como se muestra, la pureza de pico principal en tanto por ciento, medida mediante HPLC de fase inversa y de intercambio catiónico, no parece disminuir con el tiempo. Las diferencias menores en la pureza

de pico principal a lo largo del tiempo son típicas de la variación normal en la resolución de las columnas de cromatografía y también se observan en el patrón congelado. La agregación en tanto por ciento es constante y no parece crecer después de un año.

Tabla 45

Pico principal en tanto por ciento mediante HPLC de fase inversa

Concentración	Punto de tiempo		
	0	3 meses	1 año
0,3	81,0	82,5	82,4
0,5	69,0	82,7	83,4
1,0	80,6	82,4	83,2
Material de partida congelado	82,4	84,0	84,5

Pico principal en tanto por ciento mediante HPLC de intercambio catiónico

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

Agregación en tanto por ciento mediante HPLC de exclusión molecular

Concentración	Punto de tiempo		
	0	3 meses	1 año
0,3	<0,1	0,1	0,1
0,5	<0,1	<0,1	0,1
1,0	<0,1	<0,1	<0,1
Material de partida congelado	0,1	0,1	<0,1

- 5 Fc-TMP se formula en histidina 10 mM, tamponada a pH 5,0 con sacarosa al 2%, manitol al 4% y Tween-20 al 0,004%. Se ha mostrado que un pH 5 es más óptimo para la estabilidad, y que la razón de sacarosa:manitol es crítica a la hora de minimizar la degradación química tras el almacenamiento a temperatura elevada para este sistema de proteína. Se necesita Tween-20 a una concentración baja con el fin de minimizar la cantidad de agregación que se produce como resultado del proceso de liofilización. Estudios de estabilidad para aplicaciones de
- 10 aumento a escala respaldan estas conclusiones. También se han diseñado estudios estadísticos que validan el nivel de cada excipiente en la formulación, incluyendo la necesidad de que la concentración de proteína esté a 0,5 mg/ml. La estabilidad a temperatura refrigerada de la formulación recomendada no muestra una degradación significativa tras el almacenamiento durante un año a 4°C.

Ejemplo 815 Péptido de unión a Fc-Ang-2 liofilizado

Con el fin de determinar la formulación óptima para el péptido de unión a Fc-Ang-2 liofilizado, se llevaron a cabo análisis que evaluaban la agregación y estabilidad del péptido de unión a Fc-Ang-2 a diversos valores de pH, concentraciones de excipientes y concentraciones de proteína.

- 20 El péptido de unión a Fc-Ang-2 consiste en dos moléculas de polipéptido farmacéuticamente activas unidas al extremo C-terminal de la parte de Fc de una molécula de anticuerpo anti-IgG1. La molécula está compuesta por 574 residuos de aminoácido con un peso molecular total de 63.511 Daltons. El pI de la molécula es de 5,45. Hay dos enlaces disulfuro en cada uno de los polipéptidos activos. Hay un total de 20 residuos de cisteína por toda la molécula, la mayoría de los cuales están oxidados en puentes disulfuro. La secuencia del péptido de unión a Fc-Ang-2 es tal como sigue:

MDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
 WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
 PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE
 NNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
 PGKGGGGGAQQEECEWDPWTCEHMGSGSATGGSGSTASSGSGSATHQEECEWDPW
 TCEHMLE (SEQ ID NO: 2)

25

La parte de Fc de la IgG1 termina en K228. G229-G233 compone una secuencia de grupo de unión. El polipéptido activo comienza en A234 y se extiende al resto de la secuencia.

Examen de pH del péptido de unión a Fc-Ang-2 liofilizado

5 El examen de pH sometió a prueba la estabilidad de un péptido de unión a Fc-Ang-2 a pH 4,0, 7,0 y 8,0. A pH 4,0, los tampones sometidos a prueba incluían ácido glutámico, citrato de sodio y succinato de sodio, cada a una concentración de 10 mM. A pH 7,0, los tampones examinados eran histidina y Tris, ambos a una concentración de 10 mM. También se examinaron histidina y Tris a pH 8,0, cada uno a 10 mM. Cada uno de los tampones contenía manitol al 4% como agente de formación de torta de liofilización y sacarosa al 2% como excipiente. Además, se examinó el tampón histidina a pH 7,0 con y sin la presencia de un tensioactivo, Tween 20 al 0,01% (p/p). Se diluyó la proteína hasta 5 mg/ml con cada uno de los tampones de formulación. Entonces se dializó esta disolución en cada uno de los tampones de formulación usando tubos de diálisis con un límite de exclusión de peso molecular de 10.000 Da, realizándose un total de 6 intercambios con un mínimo de 4 horas de equilibrado entre intercambios. Tras la diálisis, se pusieron alícuotas de la proteína en viales de vidrio de 3 cc con un volumen de llenado de 1 ml. Entonces se liofilizaron estos viales usando un instrumento de secado por congelación de escala de laboratorio. Tras la liofilización, se sellaron los viales y se almacenaron para su incubación a 4°C, 29°C y 37°C, tomándose viales individuales y analizándose en diversos puntos a lo largo del tiempo, comenzando inmediatamente tras la liofilización y prolongándose hasta un periodo de 24 meses. Se reconstituyeron las muestras con el volumen apropiado de agua y se analizaron para determinar la estabilidad de proteína usando cromatografía de líquidos de exclusión molecular y electroforesis en gel (que detectan agregación, dimerización y escisión proteolítica), cromatografía de líquidos de intercambio aniónico (que detecta oxidación). Además, se analizaron las propiedades de la torta, tal como tiempos de reconstitución y humedad, y las propiedades de la disolución líquida reconstituida (tal como pH).

Estudio de excipientes de péptido de unión a Fc-Ang-2 liofilizado

Se realizó el examen de excipientes en un único tampón, histidina 10 mM a pH 7,0. Los dos excipientes comparados en este estudio fueron arginina al 0,85% y sacarosa al 1%. El agente de formación de torta usado con arginina fue manitol al 4%, y el agente de formación de torta usado con sacarosa fue glicina al 2%. Se sometió a prueba cada una de las formulaciones a concentraciones de proteína de 1 mg/ml, 30 mg/ml y 60 mg/ml. Además, se sometió a prueba una formulación que contenía una combinación de manitol-sacarosa a 30 mg/ml. Cada una de las formulaciones contenía Tween 20 al 0,01%. La proteína se concentró en primer lugar hasta 70 mg/ml y se dializó en la formulación apropiada usando un dispositivo de ultrafiltración/diafiltración de escala de laboratorio. Entonces se diluyó la proteína hasta cada una de las tres concentraciones con el tampón de formulación apropiado. Entonces se pusieron alícuotas de la proteína en viales de vidrio de 3 cc con un volumen de llenado de 1 ml. Entonces se liofilizaron los viales usando un instrumento de secado por congelación de escala de laboratorio. Tras la liofilización, se sellaron los viales y se almacenaron para su incubación a 4°C, 29°C, 37°C y 52°C, tomándose viales individuales y analizándose en diversos puntos a lo largo del tiempo, comenzando inmediatamente tras la liofilización y prolongándose hasta un periodo de 24 meses. Se analizaron las muestras para determinar la estabilidad de proteína usando cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico y SDS-PAGE. También se analizaron las propiedades de la torta liofilizada y las disoluciones líquidas reconstituidas.

Examen de concentración de péptido de unión a Fc-Ang-2 liofilizado

Se realizó el examen de concentración en histidina 10 mM a pH 7,2, con manitol al 4% como agente de formación de torta y sacarosa al 2% como excipiente. Se concentró la proteína hasta aproximadamente 140 mg/ml y se dializó en la formulación usando un dispositivo de ultrafiltración/diafiltración de escala de laboratorio. Entonces se diluyó la proteína dializada hasta 30 mg/ml, 60 mg/ml y 120 mg/ml en el tampón de formulación. Entonces se pusieron alícuotas de las disoluciones en viales de vidrio de 3 cc a un volumen de llenado de 1 ml. Se liofilizaron los viales usando un instrumento de secado por congelación de escala de laboratorio. Tras la liofilización, se sellaron los viales y se almacenaron para su incubación a 4°C, 29°C, 37°C y 52°C, tomándose viales individuales y analizándose en diversos puntos a lo largo del tiempo, comenzando inmediatamente tras la liofilización y prolongándose hasta un periodo de 24 meses. Se analizaron las muestras para determinar la estabilidad de proteína usando cromatografía de exclusión molecular, cromatografía de intercambio aniónico y SDS-PAGE. También se analizaron las propiedades de la torta liofilizada y las disoluciones líquidas reconstituidas.

Conclusión

Considerando lo anterior, la(s) formulación/formulaciones óptima(s) comprende(n) histidina 10 mM, manitol al 4%, sacarosa al 2%, Tween-20 al 0,01%, pH 7,0.

Ejemplo 9

Péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado

55 Con el fin de determinar la formulación óptima para el péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado, se llevaron a cabo análisis que evaluaron la agregación y estabilidad del péptido de unión a Fc-Agp-3 a diversos valores de pH, concentraciones de excipiente, y concentraciones de proteína.

Péptido de unión a Fc-Agp-3 es un pepticuerpo unido a N contra el factor activador de célula B (BAFF) dirigido contra enfermedades relacionadas con células B. El pepticuerpo se construye con dos polipéptidos unidos por disulfuro no glicosilados con una masa total de ~63,6 kD. Se ha estimado que el punto isoeléctrico para este pepticuerpo es de pH 7,36.

5 SECUENCIA DE Fc (SEQ ID NO: 1696):

VDKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SECUENCIA PEPTÍDICA DE UNIÓN A Agp-3 (SEQ ID NO: 1697):

GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLP
 GCKWDLLIKQWVCDPLGGGGG

Por tanto, la secuencia del péptido de unión a Fc-Agp-3 es tal como sigue:

GCKWDLLIKQWVCDPLGSGSATGGSGSTASSGSGSATHMLP
 GCKWDLLIKQWVCDPLGGGGGVDKTHTCPPCPAPPELLGGPS
 VFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVD
 GVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK
 CKVSNKALPAPIEKTISKAK GQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
 VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSF
 FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSP
 10 G K (SEQ ID NO: 1698)

Examen de pH amplio del péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado a 10 mg/ml

Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad a temperaturas elevadas. Para evaluar las propiedades de estabilidad y reconstitución del péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado a lo largo del intervalo de pH de 3,85-7,6, se formularon 10mg/ml del péptido de unión a Fc-Agp-3 en diversos tampones 10 mM en presencia de manitol al 2,5% y sacarosa al 2,0%. Se sometieron a prueba los siguientes tampones a aumentos de unidades de pH de aproximadamente 0,5: acetato, succinato, histidina, pirofosfato, fosfato y Tris.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. Se realizó la etapa de templado a -20°C y duró 4 horas para permitir la cristalización de manitol. Se realizó el secado primario a la temperatura de almacenamiento de -25°C durante 20 horas. Se completó el secado primario a -25°C ya que no se observó ningún pico en el vacío según se aumentó la temperatura de almacenamiento hasta 0°C. No se observó un colapso importante y las muestras procedieron exitosamente a través del secado secundario primero a 0°C, y después a 25°C. Tras la reconstitución las formulaciones con pH de o superior a 7 eran ligeramente turbias, mientras que todas las demás formulaciones eran transparentes. Esto se explicó mediante la proximidad de las formulaciones de pH alto al punto isoeléctrico del péptido de unión a Fc-Agp-3 (pI=7,36). El análisis mediante SE-HPLC reveló un dímero como la especie de alto peso molecular principal. Se observó que el % de dímero relativo era fuertemente dependiente de pH con la acumulación más baja a pH 5 e inferior. La cantidad de agregados solubles también mostró algo de dependencia de pH. No se observaron agregados solubles en las muestras antes de la liofilización. En cambio, estaba presente una pequeña cantidad de dímero en todas las formulaciones antes de la liofilización, y aumentó adicionalmente en las

muestras reconstituidas, tras la liofilización. No se observó acortamiento significativo en las formulaciones. La mayor cantidad del monómero intacto era en el caso de formulaciones de acetato, succinato e histidina a pH 5 e inferior.

Examen de pH amplio del péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado a 30 mg/ml: efecto estabilizante de sacarosa y manitol

- 5 Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de manitol al 2,5% y sacarosa al 3,5% sobre las propiedades de estabilidad y reconstitución del péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado a lo largo del intervalo de pH de 4,5-7,5, se formuló el péptido de unión a Fc-Agp-3 a 30 mg/ml en tampones de succinato, histidina y fosfato 10 mM. Se excluyeron tampones de pirofosfato y Tris de este estudio debido a su bajo rendimiento en exámenes de pH amplio anteriores. Se excluyó tampón acetato debido a la posibilidad de cambios de pH en las muestras reconstituidas como resultado de la sublimación de acetato durante la liofilización.

15 Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. Se realizó la etapa de templado a -20°C y duró 5 horas para permitir una cristalización de manitol más completa. Se realizó el secado primario a la temperatura de almacenamiento de -25°C durante 20 horas. No se terminó de completar el secado primario -25°C, y se observaron algunos picos en el vacío según se aumentó la temperatura de almacenamiento hasta 0°C. No se observó un colapso importante y las muestras procedieron exitosamente a través del secado secundario primero a 0°C, y después a 25°C. Tras la reconstitución las formulaciones con un pH alrededor de 7 eran ligeramente turbias, mientras que todas las demás formulaciones eran transparentes. Tal como se mencionó previamente, esto puede explicarse mediante la proximidad de las formulaciones de pH alto al punto isoeléctrico del péptido de unión a Fc-Agp-3. El análisis mediante SE-HPLC reveló un dímero como la especie de alto peso molecular principal. De nuevo, se observó que el % de dímero relativo era fuertemente dependiente de pH con la acumulación más baja a pH 5 e inferior. La cantidad de agregados solubles no mostró una dependencia de pH clara. No se observaron agregados solubles en las muestras antes de la liofilización. Se observaron ~0,6% de dímero en el material a granel no de GMP antes de la formulación y aumentó hasta el 3,0% para formulaciones de pH alto antes de la liofilización como resultado de concentración/intercambio de tampón.

20 También se confirmó la dependencia de pH de la acumulación de dímero mediante correspondencia cercana de la cantidad relativa de dímero a un pH dado independientemente del tipo de tampón. El % de dímero no aumentó significativamente tras la liofilización tal como se muestra mediante las muestras T=0. La única excepción fueron las muestras que no contenían ni sacarosa ni manitol, que mostraron un aumento notable del ~0,25-0,5% en el % de dímero. En presencia de sacarosa el pico de pérdida principal era mínimo incluso después de la liofilización/intercambio de tampón para formulaciones de succinato e histidina con pH 4,1 y 4,7, respectivamente. En comparación con éstas, todas las formulaciones de fosfato mostraron una pérdida del ~3% del pico principal antes de la liofilización. Aunque, se formó la torta incluso en ausencia tanto de sacarosa como de manitol, el pico principal correspondiente cayó un 0,5-0,7% en comparación con las formulaciones que contenían azúcar. Además, la reconstitución de las formulaciones sin azúcar fue mucho más larga (>2 min) y requería algo de agitación. Con el fin de asegurar robustez de la torta se incluyeron manitol o glicina como agentes de carga en todas las formulaciones posteriores incluso aunque la sacarosa sola mostró que confería suficiente estabilidad de proteína.

35 Examen de pH estrecho del péptido de unión a Fc-Agp-3 liofilizado a 30 mg/ml

40 Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC) y HPLC de fase inversa (RP-HPLC), que eran indicadores de estabilidad temperaturas elevadas. Ya que el % de recuperación del pico principal era mayor a pH 5 e inferior, se omitió el tampón fosfato del examen de pH estrecho. En adición a los tampones de succinato e histidina, que tuvieron un buen rendimiento en los exámenes de pH amplios, el examen de pH estrecho incluía glutamato 10 mM, pH 4-6. Se sometieron a prueba las formulaciones a aumentos de pH de 0,2 unidades. El contenido en sacarosa y manitol se mantuvo constante al 3,5% y 2,5%, respectivamente, excepto para dos formulaciones de succinato a pH 4,5 con sacarosa al 2,0% y al 5,0%. También, se sometieron a prueba seis formulaciones de liofilización genéricas potenciales a cada aumento de unidad de pH, tales como:

- 45 1) histidina 20 mM, glicina al 2,0%, sacarosa al 1,0% a pH 5,0
- 50 2) histidina 20 mM, glicina al 2,0%, sacarosa al 1,0% a pH 6,0
- 3) histidina 20 mM, glicina al 2,0%, sacarosa al 1,0% a pH 7,0
- 4) histidina 20 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 5,0
- 5) histidina 20 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 6,0
- 6) histidina 20 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 7,0

55 Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida

congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. Se modificó adicionalmente el ciclo de liofilización. Se realizó la etapa de templado a -15°C para permitir la cristalización de glicina y duró 5 horas. Se realizó el secado primario inicialmente a -30°C durante un periodo de tiempo corto (4 h). Entonces se elevó la temperatura de almacenamiento hasta -25°C y se mantuvo constante durante 24 horas. Sin embargo, no se terminó de completar el secado primario a -25°C tal como se muestra mediante un pequeño pico en el vacío según se aumentó adicionalmente la temperatura de almacenamiento hasta 0°C. Sin embargo, no se observó un colapso importante y las muestras procedieron exitosamente a través del secado secundario primero a 0°C, y después a 25°C. Se generaron hasta 6 meses de estabilidad en estado liofilizado a 37°C para evaluar estabilidad a largo plazo del péptido de unión a Fc-Agp-3. Los aumentos en pH dan como resultado la pérdida del pico principal para todas las formulaciones de histidina. Solo se monitorizaron formulaciones genéricas durante hasta 6 meses, pero la ventaja del pH cercano a 5,0 ya era obvia para los puntos de tiempo de 1 y 3 meses. Además, los datos de 6 meses para las formulaciones genéricas sugieren que formulaciones de manitol+sacarosa son más estables que las de glicina+sacarosa, especialmente a pH 6 y superior.

En el caso de formulaciones de glutamato y succinato también hubo un aumento dependiente de pH claro en la cantidad de dímero, el producto de degradación principal, según se vuelve el pH menos ácido. Se vio una dependencia de pH similar para los agregados. Se observó el mayor pico principal de recuperación para pH 5 e inferior. Puede explicarse la pérdida inicial del pico principal para T=0 mediante degradación de proteína durante el intercambio de tampón y concentración tal como se muestra mediante una pérdida similar para las formulaciones antes de la liofilización. Sin embargo, los datos de estabilidad de 3 meses sugieren que las formulaciones de glutamato tenían una estabilidad física mayor que sus equivalentes de succinato (con el mismo pH). Debe observarse que en este estudio también se sometió a prueba el efecto de concentraciones de sacarosa aumentadas sobre la estabilidad de formulaciones de succinato. En adición a formulaciones de sacarosa al 3,5%, se comparó sacarosa al 2,0% y 5,0% en succinato, pH 4,5. El aumento en sacarosa descendió las especies de alto peso molecular hasta cierto punto, pero no afectó significativamente la cantidad del pico principal. Por tanto, se consideró que sacarosa al 3,5% era óptima ya que tales formulaciones se ajustaban más a la tonicidad fisiológica.

Se observó una especie de acortamiento creciendo a pH bajo mediante RP-HPLC. Una parte significativa del acortamiento dependiente de pH en las formulaciones liofilizadas sucede antes de la liofilización como resultado de etapas de intercambio de tampón y concentración de proteína que consumen tiempo. Después de la liofilización no se observó un aumento significativo en la cantidad de acortamientos incluso después de almacenamiento de 3 a 6 meses a 37°C. En general los datos sugieren usar formulaciones de pH mayor para mitigar el acortamiento ya que no se puede observar a pH 6 y mayor. Sin embargo, la cantidad del dímero es significativa a pH mayores y puede ser tan alto como del 2,5-4,5% a pH 6 y mayor. Por tanto, puede encontrarse un compromiso en la formulación de péptido de unión a Fc-Agp-3 a pH 5, donde el acortamiento es moderado, especialmente en los tampones de glutamato e histidina, y cuando la formación de dímero todavía está suficientemente suprimida.

Conclusión

Manitol al 2,5% y sacarosa al 3,5% han proporcionado suficiente estabilidad de torta y proteína tal como se confirma mediante estudio de almacenamiento de 6 meses a 37°C. Por tanto, pueden usarse histidina 10 mM, manitol al 2,5%, sacarosa al 3,5% a pH 5,0 y glutamato 10 mM, manitol al 2,5%, sacarosa al 3,5% a pH 5,0 para la formulación de 30 mg/ml de péptido de unión a Fc-Agp-3. Además, este estudio muestra que histidina 20 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 5,0 también tienen un buen rendimiento y pueden considerarse como una formulación de liofilización genérica para peptidocuerpos.

Ejemplo 10

Péptido de unión a Fc-Myo liofilizado

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

El péptido de unión a Fc-Myo es un peptidocuerpo con unión a C contra la proteína miostatina dirigido contra enfermedades relacionadas con atrofia muscular. El peptidocuerpo se construye con dos polipéptidos unidos por disulfuro no glicosilados con una masa total de ~59,1 kD. Se ha estimado que el punto isoeléctrico para este peptidocuerpo es de pH 6,88.

SECUENCIA DE Fc (SEQ ID NO: 1699):

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SECUENCIA DE PÉPTIDO DE UNIÓN A MIOSTATINA (SEQ ID NO: 1700):

GGGGGAQLADHGQCIRWPMCPPEGWE

Por tanto, la secuencia de péptido de unión a Fc-Myo es tal como sigue:

MDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTC
 VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYR
 VVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK GQ
 PREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN
 5 GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSC
 SVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKGGGGGAQLADHGQCIRW
 WPMCPPEGWE (SEQ ID NO:1701)

Determinación del estado de pH para péptido de unión a Fc-Myo liofilizado

10 Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad a temperaturas elevadas. Se diseñó un estudio de examen de pH y se realizó para determinar el pH óptimo de la formulación en el estado líquido antes de la liofilización. Se formuló la proteína en pH 4,5, 4,75, 5,0, 5,5 y 6,0 con agentes tampón de acetato e histidina y sacarosa como estabilizador (o lioprotector). Se almacenaron los viales formulados a 29°C durante hasta 1 año. Se monitorizó la estabilidad usando SE-HPLC. Se calcularon las constantes de tasa de agregación para cada una de la condiciones de formulación. Se encontró que la tasa de agregación a pH 4,5 era mínima, por tanto se seleccionó pH 4,5 como condición de pH preferida de la formulación.

15 Estudio de agente tampón de péptido de unión a Fc-Myo a 30 mg/ml.

Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad. Una forma de dosificación de 30 mg/ml tal como se investigó usando tres agentes tamponantes diferentes: glutamato 10 mM, histidina 10 mM y succinato 10 mM a pH 4,5. Todas las formulaciones contienen polisorbato 20 al 0,004%.

20 Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Vitris usando un ciclo conservativo. La formulación de proteína liofilizada presentaba una elegancia de torta aceptable. Tras la reconstitución las formulaciones eran transparentes, se almacenó el péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 4, 29, 37 y 52°C. Se llevaron a cabo estudios de estabilidad en tiempo real a 4°C y se encontró que
 25 eran comparables para estas formulaciones durante hasta 3 meses. Sin embargo, en almacenamiento a 52°C 3 meses, la formulación que contenía histidina era ligeramente mejor que la formulación que contenía glutamato. La formulación que contenía succinato era significativamente menos estable que las otras dos formulaciones. Basándose en estos resultados, se consideró que la histidina y el glutamato eran agentes tampón preferidos para la formulación de péptido de unión a Fc-Myo final.

30 Estudio de excipiente de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 30 mg/ml: efecto estabilizante de sacarosa, trehalosa e hidroxietil-almidón

Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de trehalosa, hidroxietil-almidón y sacarosa sobre la estabilidad de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado, se formuló péptido de unión a Fc-Myo a 30 mg/ml en tampón glutamato 10 mM

con manitol al 4%. La concentración de trehalosa y sacarosa usada fue del 2,0%, se añadió hidroxietil-almidón al 1% a la formulación de sacarosa para preparar una formulación final de glutamato 10 mM, manitol al 4%, sacarosa al 2%, hidroxietil-almidón al 1%. Todas las formulaciones contienen polisorbato 20 al 0,004%.

5 Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. La formulación de proteína liofilizada presentaba una elegancia de torta aceptable. Tras la reconstitución las formulaciones eran transparentes.

Se monitorizó la estabilidad de estas formulaciones usando SE-HPLC.

10 Se almacenó péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 4, 29, 37 y 52°C. Se encontró que la estabilidad en la condición de tiempo de almacenamiento en tiempo real (4°C) era comparable entre estas formulaciones durante hasta 3 meses. Sin embargo en la condición de almacenamiento a 52°C durante 3 meses, la formulación que contenía sacarosa era ligeramente mejor que la formulación que contenía trehalosa. La adición de hidroxietil-almidón no presentó ningún impacto negativo sobre la estabilidad. Basándose en estos resultados, se consideró la sacarosa como el estabilizador preferido para la formulación de péptido de unión a Fc-Myo final.

15 Estudio de excipiente de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 30 mg/ml: efecto estabilizante de sacarosa y manitol

20 Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad. Para evaluar el efecto de la presencia de una cantidad variable de manitol y sacarosa sobre las propiedades de estabilidad y reconstitución de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado con respecto al intervalo de manitol del 4,0 al 8% y el intervalo de sacarosa del 1,0% al 4,0%, se formuló péptido de unión a Fc-Myo a 30 mg/ml en tampón glutamato 10 mM. Todas las formulaciones contienen polisorbato 20 al 0,004%.

Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se dializó el material en los tampones de formulación apropiados y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. La formulación de proteína liofilizada presentaba una elegancia de torta aceptable. Tras la reconstitución las formulaciones eran transparentes.

25 Se monitorizó la estabilidad de estas formulaciones usando un método de SE-HPLC. Se almacenó péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 4, 29, 37 y 52°C. Se encontró que la estabilidad en la condición de tiempo de almacenamiento en tiempo real (4°C) era comparable entre estas formulaciones durante hasta 3 meses. Sin embargo, cuando se almacenaron a 52°C durante 3 meses, se encontró una cantidad creciente de sacarosa que contribuía al aumento en la estabilidad contra la agregación. Debido a un problema para mantener la condición isotónica para la formulación final que limita la cantidad total de disacáridos y para mantener una razón apropiada de manitol y sacarosa para conservar la propiedad de torta liofilizada, manitol al 4,0% y sacarosa al 2,0% fueron los excipientes preferidos para la formulación final.

30 Estudio de excipiente de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 1, 30, 85 mg/ml

35 Se evaluó la estabilidad principalmente mediante HPLC de exclusión molecular (SE-HPLC), que indicaba estabilidad. Para evaluar el efecto de la concentración de proteína sobre las propiedades de estabilidad y reconstitución de péptido de unión a Fc-Myo liofilizado, se formuló péptido de unión a Fc-Myo a 1, 30, 85 mg/ml en tampón glutamato 10 mM con manitol al 4% y sacarosa al 2%. Todas las formulaciones contienen polisorbato 20 al 0,004%.

40 Para el trabajo de desarrollo de la formulación, se obtuvo material a granel purificado en la formulación líquida congelada de 30 mg/ml. Se intercambió el tampón del material por los tampones de formulación apropiados usando UF/DF y se liofilizó en una liofilizadora Virtis usando un ciclo conservativo. La formulación de proteína liofilizada presentaba una elegancia de torta aceptable. Tras la reconstitución las formulaciones eran transparentes.

45 Se monitorizó la estabilidad de estas formulaciones usando un método de SE-HPLC. Se almacenó péptido de unión a Fc-Myo liofilizado a 4, 29, 37°C. Se encontró que la estabilidad en la condición de tiempo de almacenamiento en tiempo real (4°C) era comparable entre estas formulaciones durante hasta 6 meses. La estabilidad es probablemente aceptable para todas las concentraciones estudiadas como formulación de producto comercial.

Conclusión

50 Manitol al 4,0% y sacarosa al 2,0% han proporcionado una estabilidad de proteína y torta suficiente tal como se confirma por un estudio de almacenamiento de 12 meses a 4°C. Por tanto, pueden usarse histidina 10 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 4,5 y glutamato 10 mM, manitol al 4,0%, sacarosa al 2,0% a pH 4,5 para formular péptido de unión a Fc-Myo de 1 a 100 mg/ml.

REIVINDICACIONES

1. Composición de pepticuerpos liofilizada que comprende un tampón, un agente de carga, un agente estabilizante y un tensioactivo; en la que dicho tampón está compuesto por un agente tamponante del pH, en la que:

5 a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

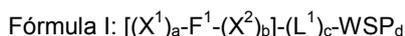
10 b) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v; o

15 c) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o

d) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o

20 e) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v;

y en la que dicho pepticuerpo comprende una estructura expuesta en la fórmula I,



25 en la que:

F¹ es un dominio Fc;

X¹ se selecciona de:

- P¹-(L²)_e-
- P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e-
- 30 P³-(L⁴)_g-P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e- y
- P⁴-(L⁵)_h-P³-(L⁴)_g-P²-(L³)_f-P¹-(L²)_e;

X² se selecciona de:

- (L²)_e-P¹,
- (L²)_e-P¹-(L³)_f-P²,
- 35 -(L²)_e-P¹-(L³)_f-P²-(L⁴)_g-P³, y
- (L²)_e-P¹-(L³)_f-P²-(L⁴)_g-P³-(L⁵)_h-P⁴;

en la que P¹, P², P³ y P⁴ son cada uno independientemente secuencias de péptidos farmacológicamente activos;

L^1, L^2, L^3, L^4 y L^5 son cada uno independientemente grupos de unión;

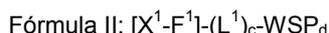
a, b, c, e, f, g y h son cada uno independientemente 0 ó 1, con la condición de que al menos uno de a y b sea 1;

d es 0, 1 o mayor de 1; y

5 WSP es un polímero soluble en agua, cuya unión se realiza en cualquier resto reactivo en F^1 .

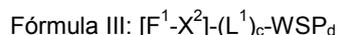
2. Composición según la reivindicación 1, en la que dicho pepticuerpo comprende

a) una estructura expuesta en la fórmula II



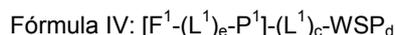
10 en la que el dominio Fc se une en el extremo C-terminal de X^1 , y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ; o

b) una estructura expuesta en la fórmula III



en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de X^2 , y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ; o

15 c) una estructura expuesta en la fórmula IV



en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-(L^1)_c-P^1$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 ; o

d) una estructura expuesta en la fórmula V

20
$$\text{Fórmula V: } [F^1-(L^1)_e-P^1-(L^2)_f-P^2]-(L^1)_c-WSP_d$$

en la que el dominio Fc se une en el extremo N-terminal de $-L^1-P^1-L^2-P^2$ y ningún, uno o más WSP se unen al dominio Fc, opcionalmente a través del grupo de unión L^1 .

3. Composición según la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho pepticuerpo es un multímero o un dímero.

25 4. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 3, en la que P^1, P^2, P^3 y/o P^4 se seleccionan independientemente de un péptido expuesto en una cualquiera de las tablas 4 a 38.

5. Composición según la reivindicación 4, en la que P^1, P^2, P^3 y/o P^4 tienen la misma secuencia de aminoácidos.

6. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en la que el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1.

30 7. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 6, en la que WSP es PEG.

8. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 7, en la que el dominio Fc se expone en SEQ ID NO: 1 y WSP es PEG.

9. Composición según la reivindicación 8, en la que PEG tiene un peso molecular de entre aproximadamente 2 kDa y 100 kDa o de entre aproximadamente 6 kDa y 25 kDa.

35 10. Composición según la reivindicación 9, en la que dicha composición comprende al menos el 50% de pepticuerpo pegilado, o al menos el 75% de pepticuerpo pegilado, o al menos el 85% de pepticuerpo pegilado, o al menos el 90% de pepticuerpo pegilado, o al menos el 95% de pepticuerpo pegilado.

11. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 10, en la que la concentración de pepticuerpo es de entre aproximadamente 0,25 mg/ml y 250 mg/ml.

40 12. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1, L^1 es $(Gly)_5$, P^1 y P^2 son cada uno SEQ ID NO: 459, L^2 es $(Gly)_8$; e = 1, f = 1, c = 0 y d = 0.

13. Composición según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1, el pepticuerpo comprende una estructura de fórmula V, L^1 es $(Gly)_5$, P^1 y P^2 son cada uno SEQ ID NO: 459, L^2 es $(Gly)_8$; e = 1, f = 1, c = 0 y d = 0.

14. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1 y en la que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1017.
- 5 15. Composición según la reivindicación 14, en la que una metionina está en el extremo N-terminal del pepticuerpo, SEQ ID NO: 1017 está en el extremo C-terminal de dicha metionina y SEQ ID NO: 1 está en el extremo C-terminal del pepticuerpo.
16. Composición según la reivindicación 14, en la que metionina en el extremo N-terminal del pepticuerpo, SEQ ID NO: 1 está en el extremo C-terminal de dicha metionina y SEQ ID NO: 1017 está en el extremo C-terminal del pepticuerpo.
- 10 17. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 12 a 16, en la que:
dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v.
- 15 18. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 2.
19. Composición según la reivindicación 18, en la que:
dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
20 dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v.
20. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1698.
21. Composición según la reivindicación 20, en la que:
a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
25 dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o
b) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v.
- 30 23. Composición según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 11, en la que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1701.
24. Composición según la reivindicación 23, en la que:
dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v; y
35 dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v.
25. Método para producir una composición de pepticuerpos según cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24, comprendiendo el método las etapas de:
i) preparar una disolución de un tampón, un agente de carga, un agente estabilizante y un tensioactivo;
en el que dicho tampón está compuesto por un agente tamponante del pH, en el que
40 a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

- dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o
- b) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
- 5 dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v; o
- c) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o
- 10 d) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y
dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v; o
- e) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;
- 15 dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v;
- ii) liofilizar dicha disolución.
26. Método para preparar una composición de pepticuerpos reconstituida que comprende las etapas de:
- a) producir una composición de pepticuerpos liofilizada según la reivindicación 25; y
- 20 b) reconstituir dicha composición de pepticuerpos liofilizada.
27. Kit para preparar una composición farmacéutica acuosa que comprende un primer recipiente que tiene una composición de pepticuerpos liofilizada según una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 24 y un segundo recipiente que tiene un disolvente fisiológicamente aceptable para la composición de pepticuerpos liofilizada.
- 25 28. Método según la reivindicación 25, en el que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1, el pepticuerpo comprende una estructura de fórmula V, L¹ es (Gly)₅, P¹ y P² son cada uno SEQ ID NO: 459, L² es (Gly)₈; e =1, f =1, c = 0 y d=0.
29. Método según la reivindicación 25, en el que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1, el pepticuerpo comprende una estructura de fórmula V, L¹ es (Gly)₅, P¹ y P² son cada uno SEQ ID NO: 459, L² es (Gly)₈; e =1, f =1, c = 0 y d=0.
- 30 30. Método según la reivindicación 25, en el que el dominio Fc es SEQ ID NO: 1 y en el que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1017.
31. Método según la reivindicación 25, en el que una metionina está en el extremo N-terminal del pepticuerpo, SEQ ID NO: 1017 está en el extremo C-terminal de dicha metionina y SEQ ID NO: 1 está en el extremo C-terminal del pepticuerpo.
- 35 32. Método según la reivindicación 25, en el que una metionina está en el extremo N-terminal del pepticuerpo, SEQ ID NO: 1 está en el extremo C-terminal de dicha metionina y SEQ ID NO: 1017 está en el extremo C-terminal del pepticuerpo.
33. Método según una cualquiera de las reivindicaciones 28 a 32, en el que:
- 40 dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;
dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;
dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,004% p/v.

34. Método según la reivindicación 25, en el que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 2.

35. Método según la reivindicación 34, en el que:

dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 7,0;

5 dicho agente de carga es manitol al 4% p/v;

dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v; y

dicho tensioactivo es polisorbato 20 al 0,01% p/v.

36. Método según la reivindicación 25, en el que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1698.

37. Método según la reivindicación 36, en el que:

10 a) dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 2,5% p/v; y

dicho agente estabilizante es sacarosa al 3,5% p/v; o

b) dicho agente tamponante del pH es histidina 20 mM y el pH es de 5,0;

dicho agente de carga es manitol al 4,0% p/v; y

15 dicho agente estabilizante es sacarosa al 2,0% p/v.

38. Método según la reivindicación 25, en el que el pepticuerpo comprende SEQ ID NO: 1701.

39. Método según la reivindicación 38, en el que:

dicho agente tamponante del pH es histidina 10 mM y el pH es de 4,5;

dicho agente de carga es manitol al 4% p/v; y

20 dicho agente estabilizante es sacarosa al 2% p/v.