

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 688 621**

51 Int. Cl.:

G01N 33/68 (2006.01)

C12Q 1/37 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **04.12.2009 PCT/EP2009/066395**

87 Fecha y número de publicación internacional: **10.06.2010 WO10063818**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **04.12.2009 E 09764259 (9)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **04.07.2018 EP 2364326**

54 Título: **Métodos para seleccionar polipéptidos resistentes a proteasa**

30 Prioridad:

05.12.2008 US 120135 P

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

05.11.2018

73 Titular/es:

**GLAXO GROUP LIMITED (100.0%)
980 Great West Road
Brentford, Middlesex TW8 9GS, GB**

72 Inventor/es:

**ENEVER, CAROLYN;
JESPER, LAURENT;
PUPECKA, MALGORZATA y
TOMLINSON, IAN M**

74 Agente/Representante:

ELZABURU, S.L.P

ES 2 688 621 T3

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

DESCRIPCIÓN

Métodos para seleccionar polipéptidos resistentes a proteasa

Antecedentes de la invención

5 Los polipéptidos y péptidos se han convertido en agentes cada vez más importantes en una variedad de aplicaciones, incluyendo aplicaciones industriales y uso como agentes medicinales, terapéuticos y de diagnóstico. Sin embargo, muchos péptidos, polipéptidos y proteínas terapéuticos son particularmente susceptibles a degradación *in vivo* por proteasas naturales. Más aún, en ciertos estados fisiológicos, tales como estados inflamatorios (p.ej. EPOC) y cáncer, la cantidad de proteasas presentes en un tejido, órgano o animal (p.ej. en el pulmón, en o adyacente a un tumor) puede incrementar. Este incremento en proteasas puede dar como resultado degradación acelerada e inactivación de proteínas endógenas y de péptidos, polipéptidos y proteínas terapéuticos que se administran para tratar enfermedad. Por consiguiente, algunos agentes que tienen potencial para uso *in vivo* (p.ej. uso en el tratamiento, diagnóstico o prevención de enfermedad en mamíferos tales como seres humanos) sólo tienen eficacia limitada debido a que son rápidamente degradados e inactivados por proteasas.

10 Los polipéptidos resistentes a proteasa proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, los polipéptidos resistentes a proteasa permanecen activos *in vivo* más tiempo que los agentes sensibles a proteasa y, por consiguiente, siguen siendo funcionales durante un período que es suficiente para producir efectos biológicos. Existe la necesidad de métodos mejorados para seleccionar polipéptidos que sean resistentes a degradación por proteasa y también que tengan actividad biológica deseable.

15 El péptido similar a glucagón (GLP)-1 es una hormona incretina con potentes acciones insulínica y glucagonostática dependientes de glucosa, efectos tróficos sobre las células β pancreáticas, y efectos inhibidores sobre secreción y motilidad gastrointestinal, que se combinan para reducir los niveles de glucosa en el plasma y reducir el número de excursiones glucémicas. GLP-1 es un agonista del receptor de GLP-1. Además, mediante su capacidad para incrementar saciedad, GLP-1 reduce la ingesta de alimentos, limitando así la ganancia de peso, e incluso puede causar pérdida de peso. Tomadas juntas, estas acciones dan a GLP-1 un perfil único, considerado altamente deseable para un agente antidiabético, particularmente debido que la dependencia de la glucosa de sus efectos antihiper glucémicos va a reducir al mínimo cualquier riesgo de hipoglucemia severa. Sin embargo, su perfil farmacocinético/farmacodinámico es tal que GLP-1 nativo no es terapéuticamente útil. Así, aunque GLP-1 es muy eficaz cuando se administra continuamente, las inyecciones subcutáneas esporádicas tienen efectos de corta duración. GLP-1 es altamente susceptible a degradación enzimática *in vivo*, y la digestión por dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV) es probablemente la más relevante, ya que ocurre rápidamente y genera un metabolito no insulínico. Por tanto, las estrategias para aprovechar el potencial terapéutico de GLP-1, con base en un entendimiento de factores que influyen en su estabilidad metabólica y perfil farmacocinético/farmacodinámico, ha sido foco de investigación intensa.

20 Se ha hecho trabajo exhaustivo para intentar inhibir la peptidasa o para modificar GLP-1 de tal manera que su degradación se desacelere mientras aún mantenga la actividad biológica. El documento WO05/027978 describe derivados de GLP-1 que tienen un perfil de acción protractado. El documento WO 02/46227 describe proteínas de fusión heterólogas que comprenden un polipéptido (por ejemplo, albúmina) fusionado a GLP-1 o análogos. Los documentos WO05/003296, WO03/060071, WO03/059934 describen proteínas de fusión en el extremo amino terminal, en donde GLP-1 ha sido fusionado con albúmina para intentar incrementar la semi-vida de la hormona.

25 Sin embargo, a pesar de estos esfuerzos, no se ha producido un GLP-1 activo de larga duración.

Compendio de la invención

La presente invención proporciona un dominio variable único de inmunoglobulina aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22. En una realización, el dominio variable único de inmunoglobulina es para uso en medicina.

30 Se proporciona una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que codifica un dominio variable único de inmunoglobulina de la presente invención. En una realización, la molécula de ácido nucleico aislada o recombinante comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en SEQ ID NO: 23.

También se proporciona un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante de la presente invención; una célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante, o un vector de la presente invención. En una realización, la célula anfitriona es una especie de *Pichia*.

La descripción se refiere a métodos para seleccionar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasas y métodos para seleccionar péptidos o polipéptidos que se unen a un ligando diana con alta afinidad. La descripción se refiere además a un método de producción de un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasas.

55 En un aspecto, la descripción es un método para seleccionar un péptido o polipéptido resistente a proteasas. El método comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, incubar el repertorio y una proteasa en

condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteasa, y recuperar un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada, por lo que se selecciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa.

5 En una realización, el repertorio de péptidos o polipéptidos se expresa en un sistema de presentación y la proteasa es una proteasa que se expresa en el sistema de presentación o anfitrión de expresión. Por ejemplo, en una realización, el repertorio de péptidos o polipéptidos se expresa en células bacterianas y la proteasa es una proteasa endógena a una bacteria. Adecuadamente, las condiciones para expresión de repertorios aumentan al máximo la expresión y actividad de la proteasa endógena, tal como una proteasa bacteriana. La expresión y la actividad de la proteasa aumenta al máximo, por ejemplo, al incrementar el tiempo y/o la temperatura para la expresión de las proteínas del repertorio en bacterias. Por ejemplo, el tiempo de incubación puede ser de 1 hora a una noche (p.ej. de 10 12 hasta 24 horas) o más (p.ej. de 24 hasta 48 horas, o más). En una realización, la temperatura puede ser de 30 a 37 grados C o más. Además, la expresión de la proteasa puede ser incrementada usando diferentes cepas bacterianas y/o modificando los ingredientes del medio. La densidad del cultivo de bacterias también se puede variar. En otra realización, el sistema de presentación puede ser modificado p.ej. por modificación genética para incrementar la expresión de proteasa.

15 En una realización, el repertorio se proporciona como un sistema de presentación sobre bacteriófagos en donde el repertorio de bacteriófagos se expresa y/o amplifica en células bacterianas de *E. Coli*, tal como células TBI de *E. Coli*, células TCI o células de la cepa HB2151 de *E. Coli*. Por consiguiente, en esta realización, la proteasa bacteriana es una proteasa expresada endógenamente en células de *E. coli*. En una realización, la proteasa bacteriana puede ser una proteasa que se expresa en el periplasma bacteriano. En una realización, la expresión de la proteasa puede suceder durante la producción de fagos, la secreción o en el sobrenadante bacteriano.

20 Así, en una realización, se describe un método que comprende las etapas de de tomar una colección de bacteriófagos; expresar dicha colección en bacterias en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica bacteriana; incubar dicha colección expresada con un ligando diana por lo que se selecciona un péptido de unión a diana resistente a proteasa. Opcionalmente, dicha incubación con un ligando diana incluye la presencia de una proteasa adicional.

25 En otra realización, el sistema de presentación es un sistema de presentación sobre levadura tal como *Pichia* y la proteasa es una proteasa endógena que se expresa en células de levadura.

30 En una realización, el método de acuerdo con la descripción comprende además combinar el repertorio y una proteasa adicional en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica adicional, y recuperar un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada, por lo que se selecciona un péptido o polipéptido resistente a proteasas. En una realización, la proteasa se combina con el repertorio en solución (es decir, la proteasa no se inmoviliza sobre un soporte). Adecuadamente la proteasa adicional se encuentra en uno o más de suero, esputo, moco (p.ej. moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogeneizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva o lágrimas.

35 En otro aspecto, se describe un método para seleccionar un péptido o polipéptido resistente a proteasa. El método comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, incubar el repertorio y una primera proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica y que comprende además combinar el repertorio con una segunda proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica y recuperar un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada, por lo que se selecciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa. En una realización de este aspecto, la primera proteasa es una proteasa endógena al sistema de presentación del repertorio y la segunda proteasa se selecciona de una proteasa encontrada en suero, esputo, moco (p.ej. moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogenado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva o lágrimas. Se apreciará, sin embargo, que la "primera" y "segunda" etapas de proteasa se pueden llevar a cabo en cualquier orden. Además, se apreciará que 40 múltiples repeticiones de cualesquiera de esas etapas pueden estar abarcadas dentro del método de la invención.

45 En una realización de cualquier aspecto de la descripción, dichas condiciones para la adicional o segunda actividad proteasa son (i) aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 3 mg/ml de proteasa, (ii) aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C y (iii) al menos durante aproximadamente 30 minutos. En una realización, estas condiciones astringentes permiten la selección de péptidos o polipéptidos con alta afinidad y/o T_m mejorada. En tal caso, los péptidos y polipéptidos pueden presentar alta afinidad en forma monomérica.

50 En una realización, en los métodos de la descripción de acuerdo con cualquier aspecto, para dichas condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolíticase usa de aproximadamente 10 a aproximadamente 100 µg/ml proteasa. Para dichas condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolíticase puede usar una temperatura de aproximadamente 30 a aproximadamente 37°C (p.ej. aproximadamente 37°C o aproximadamente temperatura ambiente). En una realización, el repertorio y la proteasa se pueden combinar al menos durante aproximadamente una hora (p.ej. aproximadamente 1 hora, aproximadamente dos horas, durante la noche p.ej. 18 a 24 horas). En los métodos de la descripción, el repertorio y la proteasa en una realización se incuban durante un período de al menos aproximadamente 30 minutos. En una realización, la proteasa se usa a aproximadamente 100 µg/ml, y el repertorio y proteasa combinados se incuban a aproximadamente 37°C al menos 55

durante aproximadamente hora.

En una realización de cualquier aspecto de la descripción, la relación (sobre una base de mol/mol) de proteasa, p.ej. tripsina, a polipéptido o dominio variable es 8.000 a 80.000 proteasa:dominio variable. En una realización, la relación (sobre una base de peso/peso, p.ej. microgramo/microgramo) de proteasa (p.ej. tripsina) a polipéptido o dominio variable es 16.000 a 160.000 proteasa:dominio variable. En una realización, la proteasa se usa a una concentración de al menos 100 ó 1000 microgramos/ml de proteasa.

Cualquier proteasa deseada se puede usar en un método de acuerdo con cualquier aspecto de la descripción, tal como uno o más de los siguientes, serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasas, tiol proteasas, metaloproteasa de matriz, carboxipeptidasa (p.ej. carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucosima, pancreatina, trombina, plasmina, cathepsinas (p.ej. cathepsina G), proteinasa (p.ej. proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimosina, enteropeptidasa, caspasa (p.ej. caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaina, clostripaína, actinidaína, bromelina, separasa y dipeptidil peptidasa IV (DPP-IV). En realizaciones particulares, la proteasa es tripsina, elastasa o leucosima. La proteasa también puede ser proporcionada por un extracto biológico, homogeneizado biológico o preparación biológica, p.ej. células enteras *in vitro*. Si se desea, el método comprende además añadir un inhibidor de proteasa a la combinación del repertorio y la proteasa después de que se complete la incubación.

En una realización de cualquiera de los métodos de la descripción, la(s) proteasa(s) está(n) en solución cuando se combina(n) con el repertorio.

En una realización de cualquier aspecto de la descripción, la actividad biológica deseada es actividad de unión, p.ej. a un ligando, p.ej. un ligando diana o un ligando genérico.

En algunas realizaciones, un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada es recuperado en función de una actividad de unión. Por ejemplo, el péptido o polipéptido puede ser recuperado en función de su unión a un ligando genérico, tal como proteína A, proteína G o proteína L. La actividad de unión también puede ser unión específica a un ligando diana. Ligandos diana ilustrativos incluyen ApoE, Apo-SAA, BDNF, Cardiotrofina-1, CEA, CD40, Ligando de CD40, CD56, CD38, CD138, EGF, receptor de EGF, ENA-78, Eotaxina, Eotaxina-2, Exodus-2, FAP α , FGF-ácido, FGF-básico, factor de crecimiento de fibroblastos-10, ligando de FLT3, Fractalkine (CX3C), GDNF, G-CSF, GM-CSF, GF- β 1, albúmina de suero humana, insulina, IFN- γ , IGF-I, IGF-II, IL- α , IL-1 β , receptor de IL-1, receptor de IL-1 tipo 1, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (72 a.a.), IL-8 (77 a.a.), IL-9, IL-10, IL-11, IL-12, IL-13, IL-15, IL-16, IL-17, IL-18 (IGIF), Inhibina α , Inhibina β , IP-10, factor de crecimiento de queratinocitos-2 (KGF-2), KGF, Leptina, LIF, Linfotactina, sustancia inhibidora Mulleriana, factor inhibidor de colonias de monocitos, proteína atrayente de monocitos, M-CSF, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MCP-1 (MCAF), MCP-2, MCP-3, MCP-4, MDC (67 a.a.), MDC (69 a.a.), MIG, MIP-1 α , MIP-1 β , MIP-3 α , MIP-3 β , MIP-4, factor inhibidor de progenitor mieloides-1 (MPL-1), NAP-2, Neurturin, factor de crecimiento de nervio, β -NGF, NT-3, NT-4, Oncostatin M, PDGF-AA, PDGF-AB, PDGF-BB, PF-4, RANTES, SDF1 α , SDF1 β , SCF, SCGF, factor de células madre (SCF), TARC, TGF- α , TGF- β , TGF- β 2, TGF- β 3, factor de necrosis tumoral (TNF), TNF- α , TNF- β , receptor de TNF I, receptor de TNF II, TNIL-1, TPO, VEGF, VEGF A, VEGF B, VEGF C, VEGF D, receptor 1de VEGF, receptor 2de VEGF, receptor 3 de VEGF, GCP-2, GRO/MGSA, GRO- β , GRO- γ , HCC1, 1-309, HER 1, HER 2, HER 3, HER 4, albúmina de suero, vWF, proteínas amiloides (p.ej. amiloide alfa), MMP12, PDK1, IgE, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23 IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGFb, CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimasa, FGF, Furin, Endotelina-1, Eotaxinas (p.ej. Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFNa, 1-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, elastasa de neutrofilos, osteopontin, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGFb, Trombin1, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptasa, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfabeta6, alfabeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amiloides (p.ej. amiloide alfa), MMP12, PDK1, y IgE. En otra realización, el ligando diana es receptor de GLP-1, o porciones del mismo. Por ejemplo, en el método de acuerdo con cualquier aspecto de la descripción, el ligando puede ser dominio extracelular de receptor de GLP-1.

En realizaciones particulares de cualquier aspecto de la descripción, el péptido o polipéptido es recuperado por reconocimiento y selección.

En una realización de cualquiera de los métodos de la descripción, el repertorio es expuesto a un ligando (ligando diana; ligando genérico) cuando está en presencia de la proteasa y uno o más miembros del repertorio se seleccionan en función de la unión al ligando.

En algunas realizaciones de cualesquiera métodos de la descripción, el repertorio comprende un sistema de presentación. Por ejemplo, el sistema de presentación puede ser presentación sobre bacteriófagos, presentación sobre ribosomas, compartimentalización y presentación en emulsión, presentación sobre levaduras, presentación sobre puromicina, presentación sobre bacterias, presentación sobre plásmidos, o presentación covalente. Los sistemas de presentación preferidos enlazan la función codificante de un ácido nucleico y características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico. En realizaciones particulares, el sistema de presentación comprende paquetes genéticos replicables.

En algunas realizaciones de cualesquiera métodos de la descripción, el sistema de presentación comprende presentación de bacteriófagos. Por ejemplo, el bacteriófago puede ser fd, M13, lambda, MS2 o T7. En realizaciones particulares, el sistema de presentación de bacteriófagos es multivalente. En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido es presentado como una proteína de fusión de pIII.

5 En una realización de cualesquiera métodos de la descripción, el repertorio de péptidos o polipéptidos (p.ej. dominios variables) es presentado sobre bacteriófagos, por ejemplo a un tamaño de colección de fagos de 10^6 a 10^{13} , p.ej. 10^8 a 10^{12} unidades replicativas (viriones infectivos). En una realización, el repertorio es presentado sobre bacteriófagos cuando se incuba con la segunda o adicional proteasa.

10 En otras realizaciones de cualquier aspecto de la descripción, el método comprende además amplificar el ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada. En realizaciones particulares, el ácido nucleico es amplificado por amplificación de fagos, crecimiento celular o reacción en cadena de polimerasa.

15 En una realización de cualquier aspecto de la descripción, el repertorio de péptidos o polipéptidos es presentado sobre bacteriófagos que son amplificados y expresados en células bacterianas tales como *E. Coli*. En esta realización, el repertorio de péptidos o polipéptidos son expuestos a proteasa bacteriana cuando son expresados en células bacterianas.

20 En algunas realizaciones, el repertorio es un repertorio de dominio variable único de inmunoglobulina. En realizaciones particulares, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena pesada. En realizaciones muy particulares, el dominio variable de cadena pesada es un dominio variable de cadena pesada humana. En otras realizaciones, el dominio variable único de inmunoglobulina es un dominio variable de cadena ligera. En realizaciones particulares, el dominio variable de cadena ligera es un dominio variable de cadena ligera humano.

25 En otro aspecto, la descripción es un método para seleccionar un péptido o polipéptido que se une a un ligando diana con alta afinidad a partir de un repertorio de péptidos o polipéptidos. El método comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar el repertorio y una proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y recuperar un péptido o polipéptido que se une al ligando diana.

En cuanto a los métodos anteriores de la invención, en donde la actividad biológica deseada es actividad de unión, el ligando que se une (ligando diana; ligando genérico) no es el mismo que la proteasa(s).

30 En otro aspecto, la invención es un método de producción de un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. El método comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y recuperar una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada, por lo que se produce un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa.

35 En algunas realizaciones, una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada es recuperada en función de una actividad de unión. Por ejemplo, una pluralidad de péptidos o polipéptidos puede ser recuperada en función de la unión a un ligando genérico, tal como proteína A, proteína G o proteína L.

40 En otro aspecto, la descripción es un método para seleccionar un polipéptido resistente a proteasa que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina (dAb) que se une a un ligando diana a partir de un repertorio. En una realización, el método comprende proporcionar un sistema de presentación sobre fagos que comprende un repertorio de polipéptidos que comprenden un dominio variable único de inmunoglobulina, combinar el sistema de presentación sobre fagos y una proteasa seleccionada del grupo que consiste en elastasa, leucosima y tripsina, en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y recuperar un fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana. Adecuadamente, en una realización de este aspecto, el método comprende además incubar en condiciones para la expresión de una proteasa endógena. Una proteasa endógena es, por ejemplo, una proteasa que es expresada por el sistema de presentación.

En algunas realizaciones, la proteasa se usa a $100 \mu\text{g/ml}$, y la combinación del sistema de presentación sobre fagos y la proteasa se incuba a aproximadamente 37°C durante la noche.

50 En algunas realizaciones, el fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana es recuperado mediante unión a dicha diana. En otras realizaciones, el fago que presenta un polipéptido que comprende un dominio variable único de inmunoglobulina que se une al ligando diana es recuperado por reconocimiento y selección.

55 La descripción también se refiere un péptido o polipéptido resistente a proteasa aislado seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí. En una realización particular, la descripción se refiere a agonistas de receptor de GLP-1 tales como péptidos de GLP-1 como se describe aquí. Los péptidos de GLP-1 y derivados de péptidos de GLP-1 adecuados se exponen en los ejemplos y en la figura 1. Otros péptidos adecuados incluyen

homólogos o derivados de GLP-1 tales como exendina y sus homólogos y derivados. Derivados adecuados adicionales incluyen derivados de GLP-1 resistentes a dipeptidilo peptidasa IV. Un péptido preferido es identificado por la secuencia de aminoácidos DMS7148 (secuencia 6 en la figura 1). Otro péptido preferido es identificado por la secuencia de aminoácidos DMS7161 (secuencia 11 en la figura 1). Adecuadamente, estos péptidos de GLP-1 se fusionan a una secuencia de AlbuAb™. En otra realización, la descripción se refiere a un dominio variable único de inmunoglobulina (p.ej. dominio variable de cadena pesada de anticuerpo humano, dominio variable de cadena ligera de anticuerpo humano) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí aislado resistente a una proteasa (p.ej. tripsina, elastasa, leucozima).

Ventajosamente, péptidos o polipéptidos de acuerdo con la descripción pueden presentar propiedades mejoradas en términos de expresión en anfitriones de bajo coste sin proteólisis durante la expresión, haciéndolos así más adecuados para producción a escala industrial.

La descripción también se refiere a un ácido nucleico aislado o recombinante que codifica un péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa o leucozima) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí, y a vectores (p.ej. vectores de expresión) y células anfitrionas que comprenden los ácidos nucleicos.

La descripción también se refiere a un método para hacer un péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. un dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa o leucozima) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí, que comprende mantener una célula anfitriona que contiene un ácido nucleico recombinante que codifica el péptido o polipéptido resistente a proteasa en condiciones adecuadas para expresión, por lo que se produce un péptido o polipéptido resistente a proteasa.

Por lo tanto, en el contexto de cualquier aspecto de la presente descripción, la proteasa puede ser una proteasa endógena a un sistema de presentación tal como una proteasa bacteriana o se encuentra en uno o más de suero, esputo, moco (p.ej. moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogeneizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva o lágrimas. En una realización, la proteasa es una encontrada en los ojos y/o lágrimas. Como se describe aquí, los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa seleccionados tienen utilidad en terapia, profilaxis y diagnóstico de enfermedades o condiciones en mamíferos, p.ej. seres humanos. En particular, los péptidos y polipéptidos tienen utilidad como la base de fármacos que probablemente van a encontrar proteasas cuando se administren a un paciente, tal como un ser humano.

Por ejemplo, cuando se administran al tracto GI (p.ej. administrado por vía oral, sublingual, rectal), en cuyo caso el péptido o polipéptido puede ser expuesto a proteasas en uno o más del tracto GI superior, tracto GI inferior, boca, estómago, intestino delgado e intestino grueso. Una realización, por lo tanto, proporciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa que va a ser administrado por vía oral, sublingual o rectal al tracto GI de un paciente para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición en el paciente.

Por ejemplo, en una realización la descripción se refiere a la administración oral de un péptido o polipéptido antagonista de TNF alfa, seleccionado o seleccionable por el método de la descripción, para el tratamiento y/o prevención de una condición o enfermedad mediada por TNF alfa tal como artritis (p.ej. artritis reumatoide), IBD, psoriasis o enfermedad de Crohn. En esta realización, el antagonista puede ser un dominio variable único de inmunoglobulina (dAb) anti-TNFR1. En otro ejemplo, el péptido o polipéptido es probable que encuentre proteasa cuando se administre (p.ej. por inhalación o por vía intranasal) a tejido pulmonar (p.ej. el pulmón o vías aéreas). Una realización, por lo tanto, proporciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa para ser administrado por inhalación o por vía intranasal a tejido pulmonar de un paciente para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición en el paciente. Dicha condición puede ser asma (p.ej. asma alérgica), EPOC, gripe o cualquier otra enfermedad o condición pulmonar descrita en el documento WO2006038027 (US2006002935).

En otro ejemplo, es probable que el péptido o polipéptido encuentre proteasas en el suero cuando se administre por vía parenteral, por ejemplo a través de inyección, p.ej. por vía subcutánea. Una realización, por lo tanto, proporciona un péptido o polipéptido resistente a proteasa para ser administrado por inyección y para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición en el paciente. Dicha condición puede ser diabetes. En una realización, la descripción proporciona la administración parenteral de un agonista del receptor del péptido 1 similar a glucagón tal como GLP-1 o sus homólogos y derivados, tal como exendina o derivados de la misma, seleccionados o seleccionables por el método de la descripción para el tratamiento y/o prevención de la diabetes o de trastornos relacionados con la diabetes.

Los péptidos y polipéptidos de acuerdo con la descripción pueden presentar temperaturas de fusión (Tf) mejoradas o relativamente altas, proporcionando estabilidad incrementada. La unión a la diana de alta afinidad también puede ser una característica de los péptidos y polipéptidos. Estas características, combinadas con la resistencia a la proteasa, hacen a los péptidos y polipéptidos adecuados para uso como fármacos en mamíferos, tales como seres humanos, en donde es probable que haya proteasas, p.ej. para administración en el tracto GI, tejido pulmonar o parenteral.

En otro ejemplo, es probable que el péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable o antagonista) encuentre proteasa cuando se administre (p.ej. por inyección intraocular o como gotas para los ojos) a un ojo de un paciente. Una

realización, por lo tanto, proporciona la administración ocular del péptido, polipéptido, dominio variable único de inmunoglobulina, agonista o antagonista resistente a proteasa a un paciente (p.ej. a un ser humano) para tratar y/o prevenir una enfermedad o condición (p.ej. una enfermedad o condición de los ojos) en el paciente. La administración podría ser administración tópica a los ojos, en forma de gotas para los ojos o por inyección en los

5

En una realización, la descripción proporciona una formulación pulmonar para suministrarse a los pulmones, en donde la formulación comprende un agonista, antagonista, péptido, polipéptido o dominio variable de la descripción con un intervalo de tamaño de partícula de menos de 5 micras, por ejemplo menos de 4,5, 4, 3,5 ó 3 micras (p.ej. cuando está en regulador de pH Britton-Robinson, p.ej. a un pH de 6,5 a 8,0, p.ej. a un pH de 7 a 7,5, p.ej. a un pH de 7 o a un pH de 7,5).

10

En una realización, las formulaciones y composiciones de la descripción se proporcionan a un pH de 6,5 a 8,0, por ejemplo 7 a 7,5, por ejemplo 7, por ejemplo 7,5.

Los péptidos o polipéptidos (p.ej. dominios variables) de acuerdo con cualquier aspecto de la invención pueden tener una T_f de al menos 50°C, o al menos 55°C, o al menos 60°C, o al menos 65°C, o al menos 70°C. Un agonista, antagonista, uso, método, composición, dispositivo o formulación de la descripción puede comprender dicho péptido o polipéptido.

15

En un aspecto de la descripción, los péptidos, polipéptidos, dominios variables, agonistas, antagonistas, composiciones o formulaciones de la invención son sustancialmente estables después de la incubación (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 1 mg/ml) a 37 a 50°C durante 14 días en tampón Britton-Robinson. En una realización, al menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del péptido, polipéptido, agonista, antagonista o dominio variable permanece en forma no agregada después de dicha incubación a 37 grados C. En una realización, al menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del péptido, polipéptido o dominio variable sigue siendo monomérico después de dicha incubación a 37 grados C. En una realización, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del péptido, polipéptido, agonista, antagonista o dominio variable permanece en forma no agregada después de dicha incubación a 50 grados C. En una realización, al menos 5, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 96, 97, 98, 99% del péptido, polipéptido o dominio variable sigue siendo monomérico después de dicha incubación a 50 grados C. En una realización, la no agregación del péptido, polipéptidos, dominios variables, agonistas, antagonistas se ve después de cualquiera de dichas incubaciones. En una realización, el pH del péptido, polipéptido o dominio variable permanece invariable o sustancialmente invariable después de incubación a 37 grados C a una concentración de polipéptido o dominio variable de 1 mg/ml en regulador de pH Britton-Robinson.

20

25

30

En un aspecto de la descripción, los péptidos, polipéptidos, dominios variables, agonistas, antagonistas, composiciones o formulaciones de la descripción son sustancialmente estables después de la incubación (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 100 mg/ml) a 4°C durante 7 días en tampón Britton-Robinson a un pH de 7 a 7,5 (p.ej. un pH de 7 o pH de 7,5). En una realización, al menos 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 9,57,5, 98, 98,5, 99 ó 99,5% del péptido, polipéptido, agonista, antagonista o dominio variable permanece en forma no agregada después de dicha incubación. En una realización, al menos 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 9,57,5, 98, 98,5, 99 ó 99,5% del péptido, polipéptido o dominio variable sigue siendo monomérico después de dicha incubación. En una realización, la no agregación del péptido, polipéptido, dominio variable, agonista, antagonista se ve después de cualquiera de dichas incubaciones. En un aspecto de la descripción, los péptidos, polipéptidos, dominios variables, agonistas, antagonistas, composiciones o formulaciones de la invención son sustancialmente estables después de la nebulización (a una concentración de polipéptido o dominio variable de 40 mg/ml) p.ej. a temperatura ambiente, 20 grados C o 37°C, durante 1 hora, p.ej. en un nebulizador de chorro, p.ej. una copa de Pari LC+. En una realización, al menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 9,57,5, 98, 98,5, 99 ó 99,5% del péptido, polipéptido, agonista, antagonista o dominio variable permanece en forma no agregada después de dicha nebulización. En una realización, al menos 65, 70, 75, 80, 85, 86, 87, 88, 90, 91, 92, 93, 94, 95, 95,5, 96, 96,5, 97, 9,57,5, 98, 98,5, 99 ó 99,5% del péptido, polipéptido o dominio variable sigue siendo monomérico después de dicha nebulización. En una realización, no agregación del péptido, polipéptidos, dominio variables, agonistas, antagonistas se ve después de cualquiera de dicha nebulización.

35

40

45

50

El péptido o polipéptido puede ser aislado y/o recombinante. Adecuadamente en una realización de cualquier aspecto de la descripción, el péptido o polipéptido resistente a proteasa se selecciona de un repertorio de péptidos o polipéptidos.

La descripción también se refiere a un péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa o leucosima) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí para usarse en medicina (p.ej. para terapia o diagnóstico). La descripción también se refiere al uso de un péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa o leucosima) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí para la fabricación de un medicamento para tratar enfermedad. La descripción también se refiere a un método de tratamiento de una enfermedad, que comprende administrar a un sujeto que necesita el mismo, una cantidad efectiva de un péptido o

55

60

polipéptido resistente a proteasa (p.ej. dominio variable único de inmunoglobulina resistente a tripsina, elastasa o leucosima) seleccionable o seleccionado por los métodos descritos aquí.

5 En una realización de cualquier aspecto de la descripción, el método comprende además combinar una segunda proteasa con el repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa, en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad de la segunda proteasa; y recuperar al menos un péptido o polipéptido que tiene una actividad biológica deseada, por lo que se selecciona al menos un péptido o polipéptido que es resistente a la segunda proteasa. La primera y segunda proteasas son diferentes. La segunda proteasa puede ser como se definió antes. En una realización, la primera o segunda proteasa es endógena al repertorio sistema de presentación.

10 La descripción proporciona además un agonista de receptor de GLP-1 aislado que comprende un péptido o polipéptido, que es resistente a una o más proteasas mencionada antes, cuando se incuba con la proteasa bajo las condiciones adecuadas para un método de la invención, p.ej. una condición de (i) aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 3 mg/ml proteasa, (ii) aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C y (iii) al menos aproximadamente durante 30 minutos (p.ej. bajo la condición de 100 µg/ml o proteasa a 37°C al menos durante una hora), para administración a un paciente para tratar y/o prevenir diabetes. El agonista puede ser usado para
15 administración por inyección.

En una realización de los métodos de la descripción, el péptido o polipéptido seleccionado se evalúa además para determinar la resistencia a una segunda proteasa o a la primera proteasa pero bajo un conjunto de condiciones que difieren de las usadas en el método de selección. La segunda proteasa es diferente de la primera proteasa, pero por lo demás puede ser cualquier proteasa descrita anteriormente. En una realización, más de un péptido o polipéptido
20 resistente a proteasa es seleccionado en los métodos de la descripción, seguido por un paso adicional de determinar cuál de estos péptido(s) o polipéptido(s) muestra resistencia a una segunda proteasa o a la primera proteasa pero bajo un conjunto de condiciones que difieren de aquellos usados en el método de selección. La segunda proteasa es diferente de la primera proteasa, pero de otra manera puede ser cualquier proteasa descrita anteriormente. De esta forma, se obtiene uno o más péptidos o polipéptidos que son resistentes a más de una proteasa. En una realización,
25 la primera o segunda proteasa es una proteasa que es endógenamente expresada en el repertorio sistema de presentación.

En una realización de los métodos de la invención, se selecciona un péptido o polipéptido monomérico resistente a proteasa (p.ej. un monómero de dominio variable único de inmunoglobulina).

30 Los medicamentos, agonistas y antagonistas de la descripción pueden comprender una región constante de anticuerpo (p.ej. un Fc) fusionada al péptido o polipéptido.

En una realización, la descripción proporciona el uso de péptido o polipéptido resistente a proteasa en la fabricación de un medicamento para administración a un mamífero para proporcionar un medicamento con una PK mejorada. La PK mejorada puede ser una AUC (área bajo la curva) mejorada y/o una vida media mejorada. En una realización, el péptido o polipéptido resistente a proteasa es seleccionado o seleccionable por un método de la descripción. En una
35 realización, el péptido o polipéptido es un dominio variable único de inmunoglobulina. El medicamento puede comprender una región constante de anticuerpo fusionada al péptido o polipéptido, p.ej. un Fc de anticuerpo.

La descripción proporciona un medicamento que comprende un péptido o polipéptido resistente a proteasa para administración a un mamífero (p.ej. un humano) para proporcionar un medicamento con una PK mejorada en el mamífero. En una realización, el péptido o polipéptido resistente a proteasa es seleccionado o seleccionable por un
40 método de la presente descripción. En una realización, el péptido o polipéptido es un dominio variable único de inmunoglobulina. El medicamento puede comprender una región constante de anticuerpo (p.ej. una Fc) fusionada al péptido o polipéptido.

Breve descripción de las figuras

La figura 1 muestra secuencias de variantes de fusión 1-10 de GLP-1-AlbudAb.

45 La figura 2 muestra un gel de variantes de fusión 6-10 de GLP-1-AlbudAb.

La figura 3 muestra un gel de variantes de fusión 6-10 de GLP-1-AlbudAb (concentradas).

La figura 4 muestra un gel de variantes de fusión 11 de GLP-1-AlbudAb.

Las figuras 5A-5F muestran resultados de EM de variantes de fusión 6-11 de GLP-1-AlbudAb.

50 La figura 5A muestra DMS7148 (Variante 6); (Notas del análisis: La masa medida concuerda con la masa esperada con un disulfuro sencillo (15245.88)); la figura 5B muestra DMS7149 (Variante 7) (Notas del análisis: La masa medida concuerda con los residuos 24-142 (12860.56), 26-142 (12603.26) y 28-142 (12390.97), todos con disulfuros sencillos. Cada pico tiene un pico asociado que es +42 Da - muy probablemente acetilado); la figura 5C muestra DMS7150 (Variante 8) (Notas del análisis: La masa medida concuerda con los residuos 26-142 con un disulfuro sencillo (12603.26)); la figura 5D muestra DMS7151 (Variante 9) (Notas del análisis: Incapaz de explicar 12960.

12890.5, 12603 y 12391.50 son concordancias cercanas a los residuos 24-142, 26-142 y 28-142 respectivamente, cada uno con un disulfuro sencillo (12862.53, 12605.24 y 12392.94). Sin embargo, el valor es una discrepancia de masa de 2 Da entre las masas medida y calculada; la figura 5E muestra DMS7152 (Variante 10) (Notas del análisis: 12790.5 y 12320.5 concuerdan con los residuos 24-142 y 28-142 respectivamente con disulfuros sencillos (12790.42 y 12320.84)); la figura 5F muestra DMS7161 (Variante 11).

La figura 6 muestra los resultados de una prueba de variante de fusión 6 de GLP-1-AlbudAb.

La figura 7 muestra los resultados de una prueba de variante de fusión 11 de GLP-1-AlbudAb.

Descripción detallada de la invención

Dentro de esta memoria descriptiva, la invención se ha descrito, con referencia a realizaciones, de una manera que permite redactar una memoria descriptiva clara y concisa. Se pretende y se debe apreciar que las realizaciones pueden combinarse de diversas formas o estar separadas sin separarse de la invención.

Como se usa aquí, "péptido" se refiere a aproximadamente dos a aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos entre sí mediante enlaces peptídicos.

Como se usa aquí, "polipéptido" se refiere a al menos aproximadamente 50 aminoácidos que están unidos entre sí mediante enlaces peptídicos. Los polipéptidos generalmente comprenden una estructura terciaria y se pliegan en dominios funcionales.

Como se usa aquí, un péptido o polipéptido (p.ej. un anticuerpo de dominio (dAb)) que es "resistente a la degradación por proteasas" no es sustancialmente degradado por una proteasa cuando se incuba con la proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica. Un polipéptido (p.ej. un dAb) no es sustancialmente degradado cuando no más de aproximadamente 25%, no más de aproximadamente 20%, no más de aproximadamente 15%, no más de aproximadamente 14%, no más de aproximadamente 13%, no más de aproximadamente 12%, no más de aproximadamente 11%, no más de aproximadamente 10%, no más de aproximadamente 9%, no más de aproximadamente 8%, no más de aproximadamente 7%, no más de aproximadamente 6%, no más de aproximadamente 5%, no más de aproximadamente 4%, no más de aproximadamente 3%, no más de aproximadamente 2%, no más de aproximadamente 1%, o sustancialmente nada de proteína es degradada por la proteasa al incubarse con la proteasa durante aproximadamente una hora a una temperatura adecuada para que se manifieste la actividad para que se manifieste la actividad proteolítica. Por ejemplo, a 37 ó 50 grados C. La degradación de proteína puede ser evaluada usando cualquier método adecuado, por ejemplo, por SDS-PAGE o por un ensayo funcional (p.ej. unión a ligando) como se describe aquí.

Como se usa aquí, "sistema de presentación" se refiere a un sistema en el cual una colección de polipéptidos o péptidos están accesibles para su selección en función de una característica deseada, tal como una característica física, química o funcional. El sistema de presentación puede ser un repertorio de polipéptidos o péptidos adecuados (p.ej. en una solución, inmovilizados sobre un soporte adecuado). El sistema de presentación también puede ser un sistema bioquímico que emplea un sistema de expresión celular (p.ej. expresión de una colección de ácidos nucleicos en, p.ej. células transformadas, infectadas, transfectadas o transducidas y presentación de los polipéptidos codificados sobre la superficie de las células) o un sistema de expresión acelular (p.ej. compartimentalización y presentación sobre emulsión). Los sistemas de presentación preferidos enlazan la función codificante de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido codificado por el ácido nucleico. Cuando se emplea dicho sistema de presentación, se pueden seleccionar los polipéptidos o péptidos que tienen una característica física, química y/o funcional deseada y puede aislarse o recuperarse fácilmente un ácido nucleico que codifica el polipéptido o péptido seleccionado. Buen número de sistemas de presentación que enlazan la función codificante de un ácido nucleico y las características físicas, químicas y/o funcionales de un polipéptido o péptido son conocidos en la técnica, por ejemplo, presentación sobre bacteriófagos (presentación sobre fagos), presentación sobre ribosomas, compartimentalización y presentación sobre emulsión, presentación sobre levaduras, presentación sobre puromicina, presentación sobre bacterias, presentación sobre plásmidos, presentación covalente y similares (véase, p.ej. EP 0436597 (Dyax), patente de EE.UU. No. 6,172,197 (McCafferty et al), patente de EE.UU. No. 6,489,103 (Griffiths et al)).

Como se usa aquí, "repertorio" se refiere a una colección de polipéptidos o péptidos que son caracterizados por una diversidad de secuencias de aminoácidos. Los miembros individuales de un repertorio pueden tener características comunes, tales como características estructurales comunes (p.ej. una estructura de núcleo común) y/o características funcionales comunes (p.ej. capacidad para unirse a un ligando común (p.ej. un ligando genérico o un ligando diana)).

Como se usa aquí, "funcional" describe un polipéptido o péptido que tiene actividad biológica, tal como actividad de unión específica. Por ejemplo, el término "polipéptido funcional" incluye un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo que se une a un antígeno diana a través de su sitio de unión a antígeno, y una enzima que se une a su(s) sustrato(s).

Como se usa aquí, "ligando genérico" se refiere a un ligando que se une a una porción sustancial (p.ej.

sustancialmente todos) de los miembros funcionales de un repertorio dado. Un ligando genérico (p.ej. un ligando genérico común) puede unirse a muchos miembros de un repertorio dado aun cuando los miembros pueden no tener especificidad de unión para un ligando diana común. En general, la presencia de un sitio de unión a ligando genérico funcional en un polipéptido (como se indica por la capacidad para unirse a un ligando genérico) indica que el polipéptido está correctamente plegado y es funcional. Ejemplos adecuados de ligandos genéricos incluyen superantígenos, anticuerpos que se unen a un epítipo expresado en una porción sustancial de miembros funcionales de un repertorio, y similares.

"Superantígeno" es un término de la técnica que se refiere a ligandos genéricos que interactúan con miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas a un sitio que es distinto de los sitios de unión a ligando diana de estas proteínas. Las enterotoxinas estafilocócicas son ejemplos de superantígenos que interactúan con receptores de células T. Los superantígenos que se unen a anticuerpos incluyen Proteína G, que se une a la región constante de IgG (Bjorck y Kronvall, *J. Immunol.*, 133:969 (1984)); Proteína A que se une a la región constante de IgG y dominios V_H (Forsgren y Sjoquist, *J. Immunol.*, 97:822 (1966)); y Proteína L que se une a dominios V_L (Bjorck, *J. Immunol.*, 140: 1194 (1988)).

Como se usa aquí, "ligando diana" se refiere a un ligando al que se une específicamente o selectivamente un polipéptido o péptido. Por ejemplo, cuando un polipéptido es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo, el ligando diana puede ser cualquier antígeno o epítipo deseado, y cuando un polipéptido es una enzima, el ligando diana puede ser cualquier sustrato deseado. La unión al antígeno diana es dependiente del polipéptido o péptido que es funcional.

Como se usa aquí, "formato de anticuerpo" se refiere a cualquier estructura de polipéptido adecuada en la que puede incorporarse un dominio variable de anticuerpo para conferir especificidad de unión a antígeno sobre la estructura. Buena variedad de formatos de anticuerpo deseados son conocidos en la técnica, tales como, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpos, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores (p.ej. un fragmento Fv (p.ej. Fv de cadena única (scFv), un Fv unido a disulfuro), un fragmento Fab, un fragmento Fab', un fragmento $F(ab')_2$), un dominio variable único de anticuerpo (p.ej. a dAb , V_H , V_{HH} , V_L), y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (p.ej. modificado por la unión covalente de polietilenglicol u otro polímero adecuado).

La frase "dominio variable único de inmunoglobulina" se refiere a un dominio variable de anticuerpo (V_H , V_{HH} , V_L) al que se une específicamente un antígeno o epítipo independientemente de otras regiones V o dominios. Un dominio variable único de inmunoglobulina puede estar presente en un formato (p.ej. homo- o hetero-multímero) con otras regiones variables o dominios variables en donde las otras regiones o dominios no son necesarios para la unión del antígeno al dominio variable único de inmunoglobulina (es decir, en donde el dominio variable único de inmunoglobulina se une al antígeno independientemente de los dominios variables adicionales). Un "anticuerpo de dominio" o "dAb" es el mismo que un "dominio variable único de inmunoglobulina" como se usa el término aquí. Un dominio variable único de inmunoglobulina es preferiblemente un dominio variable de anticuerpo humano, pero también incluye dominios variables únicos de anticuerpos de otras especies tales como roedores (por ejemplo, como se describe en el documento WO 00/29004, V_{HH} dAbs de tiburón nodriza y camélidos. Los V_{HH} de camélidos son polipéptidos de dominio variable único de inmunoglobulina que se derivan de especies que incluyen camello, llama, alpaca, dromedario y guanaco, que producen anticuerpos de cadena pesada naturalmente desprovistos de cadenas ligeras.

Un "dominio" es una estructura de proteína plegada que tiene estructura terciaria independiente del resto de la proteína. Generalmente, los dominios son responsables de propiedades funcionales discretas de las proteínas, y en muchos casos pueden ser añadidos, retirados o transferidos a otras proteínas sin pérdida de función del resto de la proteína y/o del dominio. Un "dominio variable único de anticuerpo" es un dominio de polipéptido plegado que comprende secuencias características de dominios variables de anticuerpo. Por lo tanto, incluye dominios variables de anticuerpo completos y dominios variables modificados, por ejemplo, en los cuales uno o más bucles han sido reemplazados por secuencias que no son características de dominios variables de anticuerpo, o dominios variables de anticuerpo han sido truncados o comprenden extensiones N- o C-terminal, así como fragmentos doblados de dominios variables que retienen al menos la actividad y especificidad de unión del dominio de longitud completa.

El término "colección" se refiere a una mezcla de polipéptidos o ácidos nucleicos heterogéneos. La colección está compuesta de miembros, cada uno de los cuales tiene una secuencia única de polipéptido o ácidos nucleicos. A tal efecto, "colección" es sinónimo de "repertorio." Las diferencias de las secuencias entre los miembros de la colección son responsables de la diversidad presente en la colección. La colección puede adoptar la forma de una mezcla simple de polipéptidos o ácidos nucleicos, o puede estar en forma de organismos o células, por ejemplo, bacterias, virus, células animales o vegetales y similares, transformadas con una colección de ácidos nucleicos. Preferiblemente, cada organismo o célula individual contiene sólo un miembro de la colección o un número limitado de ellos. Ventajosamente, los ácidos nucleicos están incorporados en vectores de expresión, a fin de permitir la expresión de los polipéptidos codificados por los ácidos nucleicos. En un aspecto preferido, por lo tanto, una colección puede adoptar la forma de una población de organismos anfitriones, conteniendo cada organismo una o más copias de un vector de expresión que contiene un solo miembro de la colección en forma de ácido nucleico que

puede ser expresado para producir su miembro de polipéptido correspondiente. Por lo tanto, la población de organismos anfitriones tiene potencial para codificar un gran repertorio de diversos polipéptidos.

Un "armazón universal" es una secuencia única de armazón de anticuerpo correspondiente a las regiones de un anticuerpo con secuencias conservadas como define Kabat ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", US Department of Health and Human Services, 1991) o correspondiente al repertorio o estructura de inmunoglobulina de línea germinal humana como definen Chothia y Lesk, (1987) *J. Mol. Biol.* 196:910-917. La descripción proporciona el uso de un armazón único, o de un conjunto de esos armazones, que se ha encontrado que permiten la derivación de virtualmente cualquier especificidad de unión a través de variación en las regiones hipervariables en solitario.

Los alineamientos de secuencias de aminoácidos y nucleótidos, así como su homología, similitud o identidad, como se define aquí se preparan y se determinan preferiblemente usando el algoritmo BLAST 2 Sequences, usando parámetros por omisión (Tatusova, T. A. et al, *FEMS Microbiol Lett*, 774: 187-188 (1999)).

La descripción se refiere a un método de selección de péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa que tienen una actividad biológica deseada. Al menos dos presiones selectivas se usan en el método para producir un procedimiento eficiente para seleccionar polipéptidos que son altamente estables y resistentes a la degradación por proteasa, y que tienen una actividad biológica deseada. Como se describe aquí, los péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa generalmente retienen actividad biológica. Por el contrario, los péptidos y polipéptidos sensibles a proteasa son cortados o digeridos por proteasa en los métodos descritos aquí, y por lo tanto, pierden su actividad biológica. Por consiguiente, los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa son generalmente seleccionados en función de su actividad biológica, tal como la actividad de unión.

Los métodos descritos aquí proporcionan varias ventajas. Por ejemplo, como se describe y ejemplifica aquí, los péptidos o polipéptidos que se seleccionan para resistencia a degradación proteolítica por una proteasa (p.ej. tripsina), también son resistentes a degradación por otras proteasas (p.ej. elastasa, leucosima). Además, la resistencia a proteasa se correlaciona con una temperatura de fusión más alta (T_f) del péptido o polipéptido. Las temperaturas de fusión más altas son indicativas de péptidos y polipéptidos más estables. La resistencia a la degradación por proteasa también se correlaciona con unión de alta afinidad a ligandos diana. Por lo tanto, los métodos descritos aquí proporcionan una forma eficiente de seleccionar, aislar y/o recuperar polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada y que están bien adaptados para uso terapéutico y/o de diagnóstico *in vivo* porque son resistentes y estables a proteasa.

Métodos de selección

En un aspecto, la descripción es un método para seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido de una colección o un repertorio de péptidos y polipéptidos (p.ej. un sistema de presentación) que es resistente a degradación por una proteasa (p.ej. uno o más proteasas). Preferiblemente, el método es un método para seleccionar, aislar y/o recuperar un polipéptido de una colección o un repertorio de péptidos y polipéptidos (p.ej. un sistema de presentación) que es resistente a degradación por una proteasa (p.ej. uno o más proteasas). Generalmente, el método comprende proporcionar una colección o un repertorio de péptidos o polipéptidos, incubar la colección o el repertorio en presencia de una proteasa (p.ej. una proteasa bacteriana o una proteasa exógenamente añadida tal como tripsina, elastasa, leucosima, pancreatina, esputo) en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que es resistente a la degradación por la proteasa y que tiene una actividad biológica deseada. Los péptidos o polipéptidos que son degradados por una proteasa generalmente tienen una actividad biológica reducida o pierden su actividad biológica debido a la actividad de proteasa. Por consiguiente, los péptidos o polipéptidos que son resistentes a degradación por proteasa pueden ser seleccionados, aislados y/o recuperados usando el método en función de su actividad biológica, tal como actividad de unión (p.ej. unión a un ligando general, unión a un ligando específico, unión a un sustrato), actividad catalítica u otra actividad biológica.

Como se describe y se ejemplifica aquí, los dAbs resistentes a proteasa generalmente se unen a su ligando diana con alta afinidad. Por lo tanto, en otro aspecto, la descripción es un método para seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que se une a un ligando, preferiblemente a un ligando diana, con alta afinidad. Preferiblemente, el método es un método para seleccionar, aislar y/o recuperar un polipéptido que se une a un ligando, preferiblemente a un ligando diana, con alta afinidad. Generalmente, el método comprende proporcionar una colección o un repertorio de péptidos o polipéptidos, combinar la colección o el repertorio con una proteasa (p.ej. tripsina, elastasa, leucosima, pancreatina, esputo) en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y seleccionar, aislar y/o recuperar un péptido o polipéptido que se une a un ligando (p.ej. a un ligando diana). Como se describe aquí, el método también puede comprender incubar la colección o repertorio de péptidos o polipéptidos en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad de una proteasa que es endógena al sistema de presentación, tal como una proteasa bacteriana (en donde el sistema de presentación incluye la expresión en bacterias). Como la colección o el repertorio ha sido expuesto a proteasa en condiciones en las que los péptidos o polipéptidos sensibles a proteasa van a ser digeridos, la actividad proteolítica puede eliminar los polipéptidos menos estables que tienen baja afinidad de unión y que, por lo tanto, producen una colección de péptidos o polipéptidos de unión de alta afinidad. Por ejemplo, el péptido o polipéptido seleccionado se puede unir a

su ligando diana con una afinidad (KD; $KD = K_{\text{asociación}}(kd)/K_{\text{disociación}}(ka)$, como se determina por resonancia de plasmón de superficie) de 1 μM o más fuerte, preferiblemente de aproximadamente 500 nM a aproximadamente 0,5 pM. Por ejemplo, el péptido o polipéptido de alta afinidad se puede unir al ligando diana con una afinidad de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 1 pM o aproximadamente 0,5 pM. Se cree que los péptidos y polipéptidos que son resistentes a proteasas tienen una entropía más baja y/o una energía de estabilización más alta. Por lo tanto, la correlación entre resistencia a proteasa y unión de alta afinidad puede estar relacionada con el grado de compactación y estabilidad de las superficies de los péptidos y polipéptidos seleccionados por el método de la descripción.

La colección o el repertorio de péptidos o polipéptidos se combina con una proteasa (p.ej. una o más proteasas) en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica de la proteasa. Las condiciones que son adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica de proteasa, y preparaciones biológicas o mezclas que contienen actividad proteolítica, son bien conocidas en la técnica o pueden ser determinadas fácilmente por un experto en la técnica. Si se desea, las condiciones adecuadas pueden ser identificadas u optimizadas, por ejemplo, evaluando la actividad proteolítica bajo una serie de condiciones de pH, concentraciones de proteasa, temperaturas y/o variando la cantidad de tiempo que la colección o el repertorio y la proteasa se dejan reaccionar. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la relación (en mol/mol) de proteasa, p.ej. tripsina, a péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable) es proteasa : péptido o polipéptido 800 a 80.000 (p.ej. 8.000 a 80.000), p.ej. cuando se usan 10 microgramos/ml de proteasa, la relación proteasa : péptido o polipéptido es 800 a 80.000; o cuando se usan 100 microgramos/ml de proteasa, la relación proteasa : péptido o polipéptido es 8.000 a 80.000. En una realización, la relación (en peso/peso, p.ej. microgramo/microgramo) de proteasa (p.ej. tripsina) a péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable) es proteasa:péptido o polipéptido 1.600 a 160.000 (p.ej. 16.000 a 160.000) p.ej. cuando se usan 10 microgramos/ml de proteasa, la relación proteasa:péptido o polipéptido es 1.600 a 160.000; o cuando se usan 100 microgramos/ml de proteasa, la relación proteasa : péptido o polipéptido es 16.000 a 160.000. En una realización, la proteasa se usa a una concentración de al menos 100 ó 1000 microgramos/ml y la relación proteasa : péptido (en mol/mol) de proteasa, p.ej. tripsina, a péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable) es proteasa:péptido o polipéptido 8.000 a 80.000. En una realización, la proteasa se usa a una concentración de al menos 10 microgramos/ml y la relación proteasa:péptido (en mol/mol) de proteasa, p.ej. tripsina, a péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable) es proteasa : péptido o polipéptido 800 a 80.000. En una realización la relación (en peso/peso, p.ej. microgramo/microgramo) de proteasa (p.ej. tripsina) a péptido o polipéptido (p.ej. dominio variable) es proteasa : péptido o polipéptido 1600 a 160.000 p.ej. cuando C es 10 microgramos/ml; o cuando C o C' es 100 microgramos/ml, la relación proteasa : péptido o polipéptido es 16.000 a 160.000. En una realización, la concentración (c o c') es al menos 100 o 1000 microgramos/ml de proteasa. Para probar un péptido o polipéptido individual o aislado (p.ej. un dominio variable de inmunoglobulina), p.ej. uno que ya ha sido aislado a partir de un repertorio o colección, puede añadirse una proteasa a una solución de péptido o polipéptido en un tampón adecuado (p.ej. PBS) para producir una solución de péptido o polipéptido / proteasa, tal como una solución de al menos aproximadamente 0,01% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente 0,05% a aproximadamente 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente 0,1% a aproximadamente 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente 0,5% a aproximadamente 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, aproximadamente 1% a aproximadamente 5% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,01% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,02% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,03% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,04% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,05% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,06% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,07% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,08% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,09% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,1% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,2% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,3% (p/p) proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,4% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,5% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,6% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,7% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,8% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 0,9% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 1% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 2% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 3% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, al menos aproximadamente 4% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido, o aproximadamente 5% (p/p) de proteasa/péptido o polipéptido. La mezcla puede incubarse a una temperatura adecuada para que se manifieste la actividad proteolítica (p.ej. temperatura ambiente, aproximadamente 37°C) y las muestras pueden tomarse a intervalos de tiempo (p.ej. a 1 hora, 2 horas, 3 horas, etc.). Las muestras pueden ser analizadas para determinar la degradación de proteína usando cualquier método adecuado, tal como análisis de SDS-PAGE o unión a ligando, y los resultados pueden ser usados para establecer un curso de tiempo de degradación.

Cualesquier proteasa o proteasas deseadas se pueden usar en los métodos descritos aquí. Por ejemplo, se puede usar una sola proteasa, cualquier combinación deseada de diferentes proteasas, o cualquier preparación biológica, extracto biológico, u homogeneizado biológico que contiene actividad proteolítica. No es necesario que se conozca la identidad de la proteasa o proteasas que se usan. Ejemplos adecuados de proteasas que se pueden usar solas o

en cualquier combinación deseada incluyen serina proteasa, cisteína proteasa, aspartato proteasas, tiol proteasas, metaloproteasa de matriz, carboxipeptidasa (p.ej. carboxipeptidasa A, carboxipeptidasa B), tripsina, quimiotripsina, pepsina, papaína, elastasa, leucocima, pancreatina, trombina, plasmina, catepsinas (p.ej. catepsina G), proteinasa (p.ej. proteinasa 1, proteinasa 2, proteinasa 3), termolisina, quimiosina, enteropeptidasa, caspasa (p.ej. caspasa 1, caspasa 2, caspasa 4, caspasa 5, caspasa 9, caspasa 12, caspasa 13), calpaína, ficaína, clostripaína, actinidaína, bromelina, separasa, dipeptidilo aminopeptidasa IV y similares. Extractos biológicos, homogeneizados y preparaciones adecuadas que contienen actividad proteolítica incluyen suero, esputo, moco (p.ej. moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogeneizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas y similares. En una realización, la proteasa es una encontrada en los ojos y/o lágrimas. La proteasa se usa en una cantidad adecuada para que ocurra degradación proteolítica. Por ejemplo, como se describe aquí, la proteasa se puede usar en una proporción de aproximadamente 0,01% a aproximadamente 5% (p/p, proteasa/péptido o polipéptido). Cuando la proteasa se combina con un sistema de presentación que comprende el repertorio de péptidos o polipéptidos (p.ej. un sistema de presentación sobre fagos), por ejemplo, la proteasa se puede usar a una concentración de aproximadamente 10 µg/ml a aproximadamente 3 mg/ml, aproximadamente 10 µg/ml, aproximadamente 20 µg/ml, aproximadamente 30 µg/ml, aproximadamente 40 µg/ml, aproximadamente 50 µg/ml, aproximadamente 60 µg/ml, aproximadamente 70 µg/ml, aproximadamente 80 µg/ml, aproximadamente 90 µg/ml, aproximadamente 100 µg/ml, aproximadamente 200 µg/ml, aproximadamente 300 µg/ml, aproximadamente 400 µg/ml, aproximadamente 500 µg/ml, aproximadamente 600 µg/ml, aproximadamente 700 µg/ml, aproximadamente 800 µg/ml, aproximadamente 900 µg/ml, aproximadamente 1000 µg/ml, aproximadamente 1,5 mg/ml, aproximadamente 2 mg/ml, aproximadamente 2,5 mg/ml o aproximadamente 3 mg/ml. Las concentraciones adecuadas son aproximadamente 10 µg/ml a 1 mg/ml, 10 µg/ml a 100, 90, 80, 70, 60, 50 ó 40 µg/ml, o 10, 20, 30, 40 ó 50 µg/ml a 100, 90, 80, 70, 60 µg/ml.

La proteasa se incuba con la colección de péptidos o polipéptidos (colección o repertorio) a una temperatura que es adecuada para que se manifieste la actividad de la proteasa. Por ejemplo, la proteasa y colección de péptidos o polipéptidos se pueden incubar a una temperatura de aproximadamente 20°C a aproximadamente 40°C (p.ej. a temperatura ambiente, aproximadamente 20°C, aproximadamente 21°C, aproximadamente 22°C, aproximadamente 23°C, aproximadamente 24°C, aproximadamente 25°C, aproximadamente 26°C, aproximadamente 27°C, aproximadamente 28°C, aproximadamente 29°C, aproximadamente 30°C, aproximadamente 31°C, aproximadamente 32°C, aproximadamente 33°C, aproximadamente 34°C, aproximadamente 35°C, aproximadamente 36°C, aproximadamente 37°C, aproximadamente 38°C, aproximadamente 39°C, aproximadamente 40°C). La proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se incuban juntas durante un período suficiente para que ocurra degradación proteolítica. Por ejemplo, la colección de péptidos o polipéptidos puede ser incubada junto con proteasa durante aproximadamente 30 minutos a aproximadamente 24 o aproximadamente 48 horas. En algunos ejemplos, la colección de péptidos o polipéptidos se incuba junto con proteasa durante la noche, o al menos durante aproximadamente 30 minutos, aproximadamente 1 hora, aproximadamente 1,5 horas, aproximadamente 2 horas, aproximadamente 3 horas, aproximadamente 4 horas, aproximadamente 5 horas, aproximadamente 6 horas, aproximadamente 7 horas, aproximadamente 8 horas, aproximadamente 9 horas, aproximadamente 10 horas, aproximadamente 11 horas, aproximadamente 12 horas, aproximadamente 13 horas, aproximadamente 14 horas, aproximadamente 15 horas, aproximadamente 16 horas, aproximadamente 17 horas, aproximadamente 18 horas, aproximadamente 19 horas, aproximadamente 20 horas, aproximadamente 21 horas, aproximadamente 22 horas, aproximadamente 23 horas, aproximadamente 24 horas, aproximadamente 48 horas, o más.

Es generalmente deseable, al menos en las primeras rondas de selección (p.ej. cuando se usa un sistema de presentación), que la proteasa de como resultado una reducción de al menos un orden de magnitud en el número de clones que tienen la actividad biológica deseada que está siendo seleccionada, en comparación con selecciones que no incluyen incubación con proteasa. En ejemplos particulares, la cantidad de proteasa y las condiciones usadas en los métodos son suficientes para reducir el número de clones recuperados al menos por aproximadamente un log (un factor de 10), al menos aproximadamente 2 logs (un factor de 100), al menos aproximadamente 3 logs (un factor de 1000) o al menos aproximadamente 4 logs (un factor de 10.000). Las cantidades adecuadas de proteasa y las condiciones de incubación que darán como resultado la reducción deseada de clones recuperados se pueden determinar fácilmente usando métodos convencionales y/o la guía proporcionada aquí.

La proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar e incubar usando cualquier método adecuado (p.ej. *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*). Por ejemplo, la proteasa y la colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar en un contenedor adecuado y mantener estacionarios, oscilados, agitados, sometidos a acción de remolino o similar, a una temperatura adecuada para que se manifieste la actividad proteolítica. Si se desea, la proteasa y colección de péptidos o polipéptidos se pueden combinar en un sistema *in vivo* o *ex vivo*, tal como introduciendo la colección de polipéptidos (p.ej. una colección o repertorio de presentación sobre fagos) en un animal adecuado (p.ej. un ratón), y después de que ha transcurrido un tiempo suficiente para que se manifieste la actividad proteolítica, recuperar la colección de péptidos o polipéptidos. En otro ejemplo, un órgano o tejido es perfundido con la colección de polipéptidos (p.ej. una colección o un repertorio de presentación sobre fagos), y después de que ha transcurrido un tiempo suficiente para que se manifieste la actividad proteolítica, la colección de polipéptidos es recuperada.

Después de la incubación, se puede seleccionar un péptido o polipéptido resistente a proteasa en función de una actividad biológica deseada, tal como una actividad de unión. Si se desea, puede añadirse un inhibidor de proteasa antes de la selección. Se puede usar cualquier inhibidor de proteasa adecuado (o combinación de dos o más inhibidores de proteasa) que no interfiera sustancialmente con el método de selección. Ejemplos de inhibidores de proteasa adecuados incluyen, α 1-anti-tripsina, α 2-macroglobulina, amastatina, antipapaína, antitrombina III, aprotinina, clorhidrato de fluoruro de 4-(2-Aminoetil)bencensulfonilo (AEBSF), fluoruro de (4-Amidino-fenil)-metan-sulfonilo (APMSF), bestatina, benzamidina, quimiostatina, 3,4-Dicloroisocoumarina, fluorofosfato de diisopropilo (DIFP), E-64, ácido etilenediaminotetraacético (EDTA), elastatinal, leupeptina, N-Etilmaleimida, fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF), pepstatina, 1,10-fenantrolina, fosforamidona, inhibidores de serina proteasa, N-tosil-L-lisina-clorometil cetona (TLCK), Na-Tosil-Phe-clorometilcetona (TPCK) y similares. Además, muchas preparaciones que contienen inhibidores de varias clases de proteasas están comercialmente disponibles (p.ej. Roche Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets™ (Roche Diagnostics Corporation; Indianapolis, IN, E.U.A.), que inhibe la quimiotripsina, termolisina, papaína, pronasa, extracto pancreático y tripsina).

Un péptido o polipéptido resistente a proteasa se puede seleccionar usando un método de selección de actividad biológica deseada, lo que permite que los péptidos y polipéptidos que tienen la actividad biológica deseada se distinguen de y seleccionen sobre péptidos y polipéptidos que no tienen la actividad biológica deseada. Generalmente, los péptidos o polipéptidos que han sido digeridos o cortados por proteasa pierden su actividad biológica, mientras que los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa permanecen funcionales. Por lo tanto, las pruebas adecuadas para que se manifieste la actividad biológica se pueden usar para seleccionar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. Por ejemplo, una función de unión común (p.ej. unión de un ligando general, unión de un ligando específico, o unión de un sustrato) puede ser evaluada usando una prueba de unión adecuada (p.ej. ELISA, reconocimiento y selección). Por ejemplo, los polipéptidos que se unen a un ligando diana o a un ligando genérico, tal como proteína A, proteína L o un anticuerpo, se pueden seleccionar, aislar, y/o recuperar por reconocimiento y selección o usando una matriz de afinidad adecuada. El reconocimiento y selección se pueden lograr añadiendo una solución de ligando (p.ej. ligando genérico, ligando diana) a un recipiente adecuado (p.ej. tubo, caja de petri) y dejando que el ligando se deposite o sea revestido sobre las paredes del recipiente. El exceso de ligando se puede lavar y los polipéptidos (p.ej. una colección de presentación sobre fagos) se puede añadir al recipiente y el recipiente se puede mantener en condiciones adecuadas para que los polipéptidos se unan al ligando inmovilizado. El polipéptido no unido puede ser lavado y los polipéptidos unidos pueden ser recuperados usando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, raspando o bajando el pH.

Cuando se usa un sistema de presentación sobre fagos, la unión puede ser probada en una prueba de ELISA de fagos. La prueba de ELISA de fagos se puede realizar de acuerdo con cualquier procedimiento adecuado. En un ejemplo, poblaciones de fagos producidas en cada ronda de selección se pueden determinar selectivamente para unión por ELISA al ligando diana o ligando genérico seleccionado, para identificar fagos que presentan péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. Si se desea, los péptidos y polipéptidos solubles se pueden ensayar para determinar la unión a ligando diana o ligando genérico, por ejemplo por ELISA usando reactivos, por ejemplo, contra una etiqueta C- o N-terminal (véase, por ejemplo, Winter et al. (1994) *Ann. Rev. Immunology* 12, 433-55 y referencias citadas en el mismo). La diversidad de los fagos seleccionados también se puede evaluar por electroforesis en gel de productos de PCR (Marks et al. 1991, supra; Nissim et al. 1994 supra), sondeo (Tomlinson et al, 1992) *J. Mol. Biol.* 227, 116) o por secuenciación del ADN del vector.

Los péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa también se pueden seleccionar, por ejemplo, en función de su actividad catalítica, que se puede medir usando un ensayo de actividad catalítica (p.ej. ensayo de actividad proteolítica, ensayo de fosfotransferasa, ensayo de fosfohidrolasa, ensayo de actividad de polimerasa).

El péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. dominio variable de anticuerpo sencillo) puede tener especificidad de unión para un ligando genérico o cualquier ligando diana deseado, tal como proteínas humanas o animales, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, receptores de citocina, receptores de factor de crecimiento, enzimas (p.ej. proteasas), co-factores para enzimas, proteínas de unión a ADN, lípidos y carbohidratos. Antígenos diana adecuados, incluyendo citocinas, factores de crecimiento, receptores de citocina, receptores de factor de crecimiento y otras proteínas como se describe aquí. Se apreciará que esta lista de ninguna manera es exhaustiva.

En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido resistente a proteasa se une a un diana en tejido pulmonar, tal como una diana seleccionada del grupo que consiste en TNFR1, IL-1, IL-1R, IL-4, IL-4R, IL-5, IL-6, IL-6R, IL-8, IL-8R, IL-9, IL-9R, IL-10, IL-12 IL-12R, IL-13, IL-13R α 1, IL-13R α 2, IL-15, IL-15R, IL-16, IL-17R, IL-17, IL-18, IL-18R, IL-23 IL-23R, IL-25, CD2, CD4, CD11a, CD23, CD25, CD27, CD28, CD30, CD40, CD40L, CD56, CD138, ALK5, EGFR, FcER1, TGF β , CCL2, CCL18, CEA, CR8, CTGF, CXCL12 (SDF-1), quimasa, FGF, Furina, Endotelina-1, Eotaxinas (p.ej. Eotaxina, Eotaxina-2, Eotaxina-3), GM-CSF, ICAM-1, ICOS, IgE, IFN α , IFN γ , 1-309, integrinas, L-selectina, MIF, MIP4, MDC, MCP-1, MMPs, elastasa de neutrófilos, osteopontina, OX-40, PARC, PD-1, RANTES, SCF, SDF-1, siglec8, TARC, TGF β , Trombina, Tim-1, TNF, TRANCE, Triptasa, VEGF, VLA-4, VCAM, α 4 β 7, CCR2, CCR3, CCR4, CCR5, CCR7, CCR8, alfabeta6, alfabeta8, cMET, CD8, vWF, proteínas amiloides (p.ej. amiloide alfa), MMP12, PDK1, e IgE.

Cuando se usa un sistema de presentación (p.ej. un sistema de presentación que enlaza la función codificante de un ácido nucleico y características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico) en los métodos

descritos aquí, frecuentemente es ventajoso amplificar o incrementar el número de copias de los ácidos nucleicos que codifican los péptidos o polipéptidos seleccionados. Esto proporciona una forma eficiente de obtener cantidades suficientes de ácido nucleicos y/o péptidos o polipéptidos para rondas de selección adicionales, usando los métodos descritos aquí u otros métodos adecuados, o de preparar repertorios adicionales (p.ej. repertorios de maduración de afinidad). Por lo tanto, en algunas realizaciones, los métodos de la descripción comprenden usar un sistema de presentación (p.ej. que enlaza la función codificante de un ácido nucleico y características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico, tal como presentación sobre fagos) y que comprende además amplificar o incrementar el número de copias de un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido seleccionado. Los ácidos nucleicos pueden ser amplificados usando cualesquiera métodos adecuados, tales como por amplificación de fagos, crecimiento celular o reacción en cadena de polimerasa.

Los métodos descritos aquí se pueden usar como parte de un programa para aislar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa que pueden comprender, si se desea, otros métodos de selección adecuados. En estas situaciones, los métodos descritos aquí se pueden emplear en cualquier punto deseado en el programa, tal como antes o después de que se usan otros métodos de selección. Los métodos descritos aquí también se pueden usar para proporcionar dos o más rondas de selección, como se describen y ejemplifican aquí.

En otro aspecto, la descripción es un método de producción de un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. El método comprende proporcionar un repertorio de péptidos o polipéptidos; combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica; y recuperar una pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada, produciéndose así un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa. Preferiblemente, la pluralidad de péptidos o polipéptidos que tienen una actividad biológica deseada son recuperados en función de una actividad de unión, tal como unión a un ligando genérico o un ligando diana. Las proteasas, los sistemas de presentación, las condiciones para que se manifieste la actividad proteolítica, y los métodos para seleccionar péptidos o polipéptidos que son adecuados para usarse en el método se describen aquí con respecto a los otros métodos de la descripción.

En algunas realizaciones, se usa un sistema de presentación (p.ej. un sistema de presentación que enlaza la función codificante de un ácido nucleico y características funcionales del péptido o polipéptido codificado por el ácido nucleico) que comprende un repertorio de péptidos o polipéptidos, y el método comprende además amplificar o incrementar el número de copias de los ácidos nucleicos que codifican la pluralidad de péptidos o polipéptidos seleccionados. Los ácidos nucleicos pueden ser amplificados usando cualquier método adecuado, tal como mediante amplificación de fagos, crecimiento celular o reacción en cadena de polimerasa. En una realización, el sistema de presentación es presentación sobre bacteriófagos y la amplificación es a través de expresión en *E. Coli*. En esta realización, la expresión de proteasa en *E. Coli* puede proporcionar la proteasa para selección de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa.

En una realización particular, la descripción es un método de producción de un repertorio de polipéptidos resistentes a proteasa que comprenden dAbs. El método comprende proporcionar un repertorio de polipéptidos que comprenden dAbs; combinar el repertorio de péptidos o polipéptidos y una proteasa (p.ej. tripsina, elastasa, leucocizima) en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica; y recuperar una pluralidad de polipéptidos que comprenden dAbs que tienen especificidad de unión hacia un ligando genérico (p.ej. proteína A, proteína G, proteína L) o un ligando diana. El método se puede usar para producir un repertorio intacto, o un repertorio que es desviado hacia una especificidad de unión deseada, tal como un repertorio de maduración de afinidad en función de un dAb progenitor que tiene especificidad de unión para un ligando diana deseado.

Sistemas de presentación de polipéptido

Preferiblemente, el repertorio o colección de péptidos o polipéptidos provistos para usarse en los métodos de la descripción comprenden un sistema de presentación adecuado. El sistema de presentación preferiblemente resiste la degradación por proteasa (p.ej. una sola proteasa o una combinación de proteasas, y cualquier extracto biológico, homogeneizado o preparación que contenga actividad proteolítica (p.ej. suero, esputo, moco (p.ej. moco gástrico, moco nasal, moco bronquial), lavado broncoalveolar, homogeneizado de pulmón, extracto de pulmón, extracto pancreático, fluido gástrico, saliva, lágrimas y similares). El sistema de presentación y el enlace entre el sistema de presentación y el polipéptido presentado es preferiblemente al menos tan resistente a la proteasa como los péptidos o polipéptidos más estables del repertorio. Esto permite que un ácido nucleico que codifica un polipéptido presentado seleccionado sea fácilmente aislado y/o amplificado.

En un ejemplo, un péptido o polipéptido resistente a proteasa puede ser seleccionado, aislado y/o recuperado de un repertorio de péptidos o polipéptidos que está en solución, o está unido covalentemente o no covalentemente a una superficie adecuada, tal como plástico o vidrio (p.ej. placa de microtitulación, matriz de polipéptidos tal como una micromatriz). Por ejemplo, se puede usar una matriz de péptidos sobre una superficie de manera que coloque cada miembro de la colección distinto (p.ej. secuencia de péptido única) en un lugar discreto, predefinido en la matriz. La identidad de cada miembro de la colección en dicha matriz puede ser determinada por su localización espacial en la matriz. Se pueden determinar las localizaciones en la matriz en donde ocurren interacciones de unión entre un ligando diana, por ejemplo, y miembros de la colección reactivos, identificando así las secuencias de los miembros reactivos en función de su localización espacial (véase, p.ej. patente de E.U.A. No. 5,143,854, WO 90/15070 y WO

92/10092.)

Preferiblemente, los métodos emplean un sistema de presentación que enlaza la función codificante de un ácido nucleico y características físicas, químicas y/o funcionales del polipéptido codificado por el ácido nucleico. Dicho sistema de presentación puede comprender una pluralidad de paquetes genéticos replicables, tales como bacteriófagos o células (bacterias). Preferiblemente, el sistema de presentación comprende una colección, tal como una colección de presentación sobre bacteriófagos. El presentación sobre bacteriófagos es un sistema de presentación particularmente preferido.

Se ha descrito un número de sistemas de presentación sobre bacteriófagos adecuados (p.ej. sistemas de presentación monovalentes y presentación multivalentes) (Véase, p.ej. Griffiths et al., patente de EE.UU. No. 6,555,313 B1; Johnson et al., patente de EE.UU. No. 5,733,743 ; McCafferty et al, patente de EE.UU. No. 5,969,108; Mulligan-Kehoe, patente de EE.UU. No. 5,702,892; Winter, G. et al, *Annu. Rev. Immunol.* 72:433-455 (1994); Soumillion, P. et al, *Appl Biochem. Biotechnol* 47(2-3): 175-189 (1994); Castagnoli, L. et al, *Comb. Chem. High Throughput Screen*, 4(2): 121-133 (2001)). Los péptidos o polipéptidos presentados en un sistema de presentación sobre bacteriófagos pueden ser presentados en cualquier bacteriófago adecuado, tales como, por ejemplo, un fago filamentoso (p.ej. fd, M13, F1), un fago lítico (p.ej. T4, T7, lambda), o un fago de ARN (p.ej. MS2).

Generalmente, se produce o proporciona una colección de fagos que presenta un repertorio de péptidos o polipéptidos de fago, como proteínas de fusión con una proteína de revestimiento de fago adecuada (p.ej. proteína fd pIII). La proteína de fusión puede presentar los péptidos o polipéptidos en la punta de la proteína de revestimiento de fago, o si se desea en una posición interna. Por ejemplo, el péptido o polipéptido presentado puede estar presente en una posición que es amino-terminal al dominio 1 de pIII (el dominio 1 de pIII también se refiere como N1). El polipéptido presentado puede ser directamente fusionado a pIII (p.ej. el N-terminal del dominio 1 de pIII) o fusionado a pIII usando un enlazador. Si se desea, la fusión además puede comprender una etiqueta (p.ej. epitopo myc, etiqueta His). Las colecciones que comprenden un repertorio de péptidos o polipéptidos que son presentados como proteínas de fusión con una proteína de revestimiento de fago puede ser producida usando cualquier método adecuado, tal como introduciendo una colección de vectores de fago o vectores de fagómido que codifican los péptidos o polipéptidos presentados en bacterias anfitrionas adecuadas, y cultivando las bacterias resultantes para producir fagos (p.ej. usando un fago auxiliar adecuado o complementando el plásmido si se desea). Adecuadamente, en una realización de la descripción, se seleccionan las condiciones adecuadas para expresión de proteasa en las bacterias. La colección de fago puede ser recuperada del cultivo usando cualquier método adecuado, tal como precipitación y centrifugación.

El sistema de presentación puede comprender un repertorio de péptidos o polipéptidos que contienen cualquier cantidad deseada de diversidad. Por ejemplo, el repertorio puede contener péptidos o polipéptidos que tienen secuencias de aminoácidos que corresponden a polipéptidos que ocurren naturalmente expresados por un organismo, grupo de organismos, tejido deseado o tipo de célula deseado, o puede contener péptidos o polipéptidos que tengan secuencias de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas. Si se desea, los polipéptidos pueden compartir un núcleo o armazón proteínico común. Por ejemplo, todos los polipéptidos en el repertorio o colección pueden basarse en un armazón proteínico seleccionado de proteína A, proteína L, proteína G, un dominio de fibronectina, una anticalina, CTLA4, una enzima deseada (p.ej. una polimerasa, una celulasa), o un polipéptido de la superfamilia de las inmunoglobulinas, tal como un anticuerpo o fragmento de anticuerpo (p.ej. un dominio variable de anticuerpo). Los polipéptidos en dicho repertorio o colección pueden comprender regiones definidas de secuencias de aminoácidos aleatorias o aleatorizadas y regiones de secuencias de aminoácidos en común. En ciertas realizaciones, todos o sustancialmente todos los polipéptidos en un repertorio son de un tipo deseado, tal como una enzima deseada (p.ej. una polimerasa) o un fragmento de unión a antígeno deseado de un anticuerpo (p.ej. V_H humano o V_L humano). En realizaciones preferidas, el sistema de presentación de polipéptidos comprende un repertorio de polipéptidos en donde cada polipéptido comprende un dominio variable de anticuerpo. Por ejemplo, cada polipéptido en el repertorio puede contener un V_H, un V_L o un Fv (p.ej. un Fv de cadena única). Como se describe aquí, el repertorio puede ser una colección de polipéptidos basada en moléculas progenitoras tales como GLP-1 o sus derivados tales como un derivado resistente a dipeptidil peptidasa IV.

La diversidad de secuencias de aminoácidos puede ser introducida en cualquier región deseada de un péptido o polipéptido o armazón proteínico usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, la diversidad de secuencias de aminoácidos puede ser introducida en una región objetiva, tal como una región determinante de complementariedad de un dominio variable de anticuerpo o un dominio hidrofóbico, preparando una colección de ácidos nucleicos que codifican los polipéptidos diversificados usando cualquier método de mutagénesis adecuado (p.ej. PCR de baja fidelidad, mutagénesis mediada por oligonucleótidos o dirigida al sitio, diversificación usando codones de NNK) o cualquier otro método adecuado. Si se desea, una región de un polipéptido que ha de ser diversificado puede ser aleatorizada.

El tamaño de los polipéptidos que constituyen el repertorio es en gran medida materia de elección y no se requiere un tamaño de polipéptido uniforme. Preferiblemente, los polipéptidos en el repertorio tienen al menos estructura terciaria (forman al menos un dominio).

60

Selección/aislamiento/recuperación

Un péptido o polipéptido resistente a proteasa (p.ej. una población de polipéptidos resistentes a proteasa) puede ser seleccionado, aislado y/o recuperado de un repertorio o colección (p.ej. en un sistema de presentación) usando cualquier método adecuado. Preferiblemente, un polipéptido resistente a proteasa es seleccionado o aislado en función de una característica seleccionable (p.ej. característica física, característica química, característica funcional). Las características funcionales seleccionables adecuadas incluyen actividades biológicas de péptidos o polipéptidos en el repertorio, por ejemplo, unión a un ligando genérico (p.ej. un superantígeno), unión a un ligando diana (p.ej. un antígeno, un epítipo, un sustrato), unión a un anticuerpo (p.ej. a través de un epítipo expresado en un péptido o polipéptido), y actividad catalítica (Véase, p.ej. Tomlinson et al., WO 99/20749; WO 01/57065; WO 99/58655.)

En algunas realizaciones, el péptido o polipéptido resistente a proteasa es seleccionado y/o aislado de una colección o repertorio de péptidos o polipéptidos en los cuales sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa comparten una característica seleccionable común. Por ejemplo, el péptido o polipéptido resistente a proteasa puede ser seleccionado de una colección o repertorio en la cual sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa se unen a un ligando genérico común, se unen a un ligando diana común, se unen a (o son unidos por) un anticuerpo común, o poseen una actividad catalítica común. Este tipo de selección es particularmente útil para preparar un repertorio de péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa que están basados en un péptido o polipéptido progenitor que tiene una actividad biológica deseada, por ejemplo, cuando realiza maduración de afinidad de un dominio variable único de inmunoglobulina.

La selección en función de la unión a un ligando genérico común puede producir una colección o población de péptidos o polipéptidos que contienen todos o sustancialmente todos los péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa que eran componentes de la colección o repertorio original. Por ejemplo, pueden seleccionarse péptidos o polipéptidos que se unen a un ligando diana o un ligando genérico, tal como proteína A, proteína L o un anticuerpo, , aislados y/o recuperados por reconocimiento y selección o usando una matriz de afinidad adecuada. El reconocimiento y la selección se pueden lograr añadiendo una solución de ligando (p.ej. ligando genérico, ligando diana) a un recipiente adecuado (p.ej. tubo, caja de petri) y dejando que el ligando se deposite o cubra las paredes del recipiente. El exceso de ligando se puede separar por lavado y se pueden añadir los péptidos o polipéptidos (p.ej. un repertorio que ha sido incubado con proteasa) al recipiente, y el recipiente se puede mantener en condiciones adecuadas para que los péptidos o polipéptidos se unan al ligando inmovilizado. Los péptidos o polipéptidos no unidos pueden separarse por lavado y los péptidos o polipéptidos unidos pueden ser recuperados usando cualquier método adecuado, tal como, por ejemplo, raspando o provocando un descenso del pH.

Las matrices de afinidad de ligando adecuadas generalmente contienen un soporte sólido o esfera (p.ej. agarosa) a la cual se une covalente o no covalentemente un ligando. La matriz de afinidad puede combinarse con péptidos o polipéptidos (p.ej. un repertorio que ha sido incubado con proteasa) usando un proceso por lotes, un proceso de columna o cualquier otro proceso adecuado en condiciones adecuadas para la unión de péptidos o polipéptidos al ligando sobre la matriz. Los péptidos o polipéptidos que no se unen a la matriz de afinidad pueden separarse por lavado y los péptidos o polipéptidos unidos pueden ser eluidos y recuperados usando cualquier método adecuado, tal como elución con un tampón de pH más bajo, con un agente desnaturizador ligero (p.ej. urea), o con un péptido que compite para unirse al ligando. En un ejemplo, un ligando diana biotinilado se combina con un repertorio en condiciones adecuadas para que los péptidos o polipéptidos del repertorio se unan al ligando diana. Los péptidos o polipéptidos unidos son recuperados usando avidina o estreptavidina inmovilizada (p.ej. en una esfera).

En algunas realizaciones, el ligando genérico o diana es un anticuerpo o fragmento de unión a antígeno del mismo. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno que se unen a características estructurales de los péptidos o polipéptidos que son sustancialmente conservadas en los péptidos o polipéptidos de una colección o repertorio son particularmente útiles como ligandos genéricos. Los anticuerpos o fragmentos de unión a antígeno adecuados para usarse como ligandos para aislar, seleccionar y/o recuperar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa pueden ser monoclonales o policlonales y pueden prepararse usando cualquier método adecuado.

Genotecas/repertorios

En otros aspectos, la descripción se refiere a repertorios de péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa, a colecciones que codifican péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa, y a métodos para producir dichas colecciones y repertorios.

Las colecciones que codifican y/o contienen péptidos y polipéptidos resistentes a proteasa pueden ser preparadas u obtenidas usando cualquier método adecuado. La colección de la descripción puede ser diseñada para codificar péptidos o polipéptidos resistentes a proteasa basados en un péptido o polipéptido de interés (p.ej. un péptido o polipéptido seleccionado de una colección) o pueden seleccionarse a partir de otra colección usando los métodos descritos aquí. Por ejemplo, se puede preparar una colección enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa usando un sistema de presentación de polipéptidos adecuado.

En un ejemplo, una colección de presentación sobre fagos que comprende un repertorio de polipéptidos presentados

que comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina (p.ej. V_H , V_K , V_L) se combina con una proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, como se describe aquí. Los polipéptidos resistentes a proteasa son recuperados en función de una actividad biológica deseada, tal como una actividad de unión (p.ej. ligando genérico de unión, ligando diana de unión) produciendo así una colección de presentación sobre fagos enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa.

En otro ejemplo, primero se determina selectivamente una colección de presentación sobre fagos que comprende un repertorio de polipéptidos presentados que comprenden dominios variables únicos de inmunoglobulina (p.ej. V_H , V_K , V_L) para identificar miembros del repertorio que tienen especificidad de unión para un antígeno diana deseado. Una colección de polipéptidos que tiene la especificidad de unión deseada son recuperados y la colección es combinada con proteasa en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, como se describe aquí. Una colección de polipéptidos resistentes a proteasa que tienen la especificidad de unión diana deseada es recuperada, produciendo una colección enriquecida en polipéptidos resistentes a proteasa y de alta afinidad. Como se describe aquí, la resistencia a la proteasa en este método de selección se correlaciona con unión de alta afinidad.

Las colecciones que codifican un repertorio de un tipo deseado de polipéptidos pueden ser fácilmente producidas usando cualquier método adecuado. Por ejemplo, una secuencia de ácido nucleico que codifica un tipo deseado de polipéptido (p.ej. una polimerasa, un dominio variable de inmunoglobulina), se puede obtener y una colección de ácidos nucleicos que contienen cada uno una o más mutaciones se puede preparar, por ejemplo, mediante amplificación del ácido nucleicos usando un sistema de reacción en cadena de polimerasa (PCR) sujeto a error, por mutagénesis química (Deng *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 269:9533 (1994)) o usando cepas mutantes bacterianas (Low *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 260:359 (1996)).

En otras realizaciones, regiones particulares del ácido nucleico pueden tomarse como dianas para diversificación. Los métodos para mutación de posiciones seleccionadas también son bien conocidos en la técnica e incluyen, por ejemplo, el uso de oligonucleótidos desapareados u oligonucleótidos degenerados, con o sin el uso de PCR. Por ejemplo, se han creado colecciones de anticuerpo sintéticas al dirigir mutaciones a los bucles de unión de antígeno. Regiones de anticuerpo H3 y L3 aleatorias o semialeatorias han sido anexadas a segmentos de gen de inmunoglobulina V de línea germinal para producir colecciones grandes con regiones de armazón no mutadas (Hoogenboom y Winter (1992), *supra*; Nissim *et al.* (1994), *supra*; Griffiths *et al.* (1994) *supra*; DeKruif *et al.* (1995), *supra*). Dicha diversificación se ha extendido para incluir algunos o todos los otros bucles de unión (Cramer *et al.* (1996) *Nature Med.*, 2:100; Riechmann *et al.* (1995) *Bio/Technology*, 13:475; Morphosys, WO 97/08320, *supra*). En otras realizaciones, regiones particulares del ácido nucleico pueden ser dirigidas para diversificación, por ejemplo, por una estrategia de PCR de dos pasos que emplea el producto de la primera PCR como "mega-iniciador". (Véase, p.ej. Landt, O. *et al.*, *Gene* 96:125-128 (1990)). La diversificación dirigida también se puede lograr, por ejemplo, por SOE PCR. (Véase, p.ej. Horton, RM *et al.*, *Gene* 77:61-68 (1989)).

La diversidad de secuencia en posiciones seleccionadas se puede lograr alterando la secuencia codificante que especifica la secuencia del polipéptido de tal manera que el número de aminoácidos posibles (p.ej. todos los 20 o un subconjunto de los mismos) se pueda incorporar en esa posición. Usando la nomenclatura de IUPAC, el codón más versátil es NNK, que codifica todos los aminoácidos así como el codón de detención TAG. El codón NNK preferiblemente se usa para introducir la diversidad requerida. Se usan otros codones que logran los mismos fines también, incluyendo el codón NNN, que conduce a la producción de los codones de detención TGA y TAA. Dicho enfoque dirigido también permite que el espacio de secuencia completo en un área diana sea explorado.

Las colecciones preferidas comprenden polipéptidos resistentes a proteasa que son miembros de la superfamilia de inmunoglobulinas (p.ej. anticuerpos o porciones de los mismos). Por ejemplo, las colecciones pueden comprender polipéptidos de anticuerpo resistentes a proteasa que tengan una conformación de cadena principal conocida. (Véase, p.ej. Tomlinson *et al.*, WO 99/20749). Las colecciones se pueden preparar en un plásmido o vector adecuado. Como se usa aquí, vector se refiere a un elemento discreto que es usado para introducir ADN heterólogo en células para la expresión y/o replicación de las mismas. Cualquier vector adecuado se puede usar, incluyendo plásmidos (p.ej. plásmidos bacterianos), vectores virales o bacteriófagos, cromosomas artificiales y vectores episomales. Dichos vectores se pueden usar para clonación y mutagénesis simple, o un vector de expresión se puede usar para expresión de la colección. Vectores y plásmidos usualmente contienen uno o más sitios de clonación (p.ej. un polienlazador), un origen de replicación y al menos un gen marcador seleccionable. Los vectores de expresión además pueden contener elementos para impulsar la transcripción y traducción de un polipéptido, tales como un elemento incrementador, promotor, señal de terminación de transcripción, secuencias de señales y similares. Estos elementos pueden estar dispuestos de una manera tal que sean operablemente enlazados a un inserto clonado que codifica un polipéptido, de tal manera que el polipéptido sea expresado y producido cuando dicho vector de expresión se mantenga en condiciones adecuadas para expresión (p.ej. en una célula hospedera adecuada).

Los vectores de clonación y expresión generalmente contienen secuencias de ácido nucleico que permiten que el vector se replique en una o más células anfitrionas. Típicamente en vectores de clonación, esta secuencia es una que permite que el vector se replique independiente del ADN cromosómico del anfitrión e incluye orígenes de replicación o secuencias autónomamente replicantes. Dichas secuencias son bien conocidas para una variedad de bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las

bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido de 2 micras es adecuado para levadura y varios orígenes virales (p.ej. SV40, adenovirus) son útiles para vectores de clonación en células de mamífero. Generalmente, el origen de replicación no es necesario para vectores de expresión en mamíferos, a menos que estos se usen en células de mamíferos capaces replicar altos niveles de ADN, tales como células COS.

5 Los vectores de clonación o expresión pueden contener un gen de selección también referido como marcador seleccionable. Dichos genes marcadores codifican una proteína necesaria para la supervivencia o crecimiento de células anfitrionas transformadas que crecen en un medio de cultivo selectivo. Las células anfitrionas no transformadas con el vector que contiene el gen de selección por lo tanto no sobrevivirán en el medio de cultivo. Los genes de selección típicos codifican proteínas que confieren resistencia a antibióticos y otras toxinas, p.ej. ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina, deficiencias auxotróficas de complemento, o nutrientes críticos de suministro no disponibles en el medio de crecimiento.

10 Los vectores de expresión adecuados pueden contener un número de componentes, por ejemplo, un origen de replicación, un gen marcador seleccionable, uno o más elementos de control de expresión, tales como un elemento de control de transcripción (p.ej. promotor, incrementador, terminador) y/o una o más señales de traducción, una secuencia de señal o secuencia líder, y similares. Los elementos de control de expresión y una secuencia de señal o líder, si está presente, pueden ser provistos por el vector u otra fuente. Por ejemplo, las secuencias de control transcripcionales y/o traducionales de un ácido nucleico clonado que codifica una cadena de anticuerpo se pueden usar para dirigir la expresión.

15 Se puede proporcionar un promotor para expresión en una célula anfitriona deseada. Los promotores pueden ser constitutivos o inducibles. Por ejemplo, un promotor puede ser operablemente enlazado a un ácido nucleico que codifica un anticuerpo, cadena de anticuerpo o porción de la misma, de tal manera que dirige la transcripción del ácido nucleico. Una variedad de promotores adecuados para anfitriones procarióticos (p.ej. los sistemas de promotor de β -lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, el sistema de promotor de triptófano (*trp*), promotores lac, tac, T3, T7 para *E. coli*) y eucarióticos (p.ej. promotor temprano o tardío de virus simiano 40, promotor de repetición de terminal largo de virus del sarcoma de Rous, promotor de citomegalovirus, promotor tardío de adenovirus, promotor de EG-1a) están disponibles.

20 Además, los vectores de expresión típicamente comprenden un marcador seleccionable para selección de células anfitrionas que portan el vector, y en el caso de un vector de expresión replicable, un origen de replicación. Los genes que codifican productos que confieren resistencia a antibióticos o fármacos son marcadores seleccionables comunes y se pueden usar en células procarióticas (p.ej. gen de β -lactamasa (resistencia a ampicilina), gen *Tet* para resistencia a tetraciclina) y células eucarióticas (p.ej. genes de resistencia a neomicina (G418 o geneticina), gpt (ácido micofenólico), ampicilina, o higromicina). Los genes marcadores de dihidrofolato reductasa permiten la selección con metotrexato en una variedad de anfitriones. Los genes que codifican el producto de gen de marcadores auxotróficos del anfitrión (p.ej. *LEU2*, *URA3*, *HIS3*) a menudo se usan como marcadores seleccionables en levaduras. El uso de vectores virales (p.ej. baculovirus) o fagos, y vectores que son capaces de integrarse en el genoma de la célula anfitriona, tales como vectores retrovirales, también son contemplados.

25 Los vectores de expresión adecuados para la expresión en células procarióticas (p.ej. células bacterianas tales como *E. coli*) o células de mamífero incluyen, por ejemplo un vector pET (p.ej. pET-12a, pET-36, pET-37, pET-39, pET-40, Novagen y otros), un vector de fago (p.ej. pCANTAB 5 E, Pharmacia), pRIT2T (vector de fusión de proteína A, Pharmacia), pCDM8, pCDNA1.1/amp, pcDNA3.1, pRc/RSV, pEF-1 (Invitrogen, Carlsbad, CA), pCMV-SCRIPT, pFB, pSG5, pXT1 (Stratagene, La Jolla, CA), pCDEF3 (Goldman, L.A., *et al*, *Biotechniques*, 21:1013-1015 (1996)), pSVSPORT (GibcoBRL, Rockville, MD), pEF-Bos (Mizushima, S., *et al*, *Nucleic Acids Res.*, 18:5322 (1990)) y similares. Los vectores de expresión que son adecuados para usarse en varios anfitriones de expresión, tales como células procarióticas (*E. coli*), células de insecto (células S2 Schneider de *Drosophila*, Sf9), levaduras (*P. methanolicus*, *P. pastoris*, *S. cerevisiae*) y células de mamífero (p.ej. células COS) están disponibles.

30 Los vectores preferidos son vectores de expresión que permiten la expresión de una secuencia de nucleótidos correspondiente a un miembro de colección de polipéptido. Por lo tanto, la selección con ligandos genéricos y/u dianas se pueden realizar mediante propagación o expresión separada de un solo clon que expresa un miembro de colección de polipéptido. Como se describió antes, el sistema de presentación de selección preferido es presentación sobre bacteriófagos. Por lo tanto, vectores de fago o fagémico se pueden usar. Los vectores preferidos son vectores de fagómido que tienen un origen de replicación de *E. coli* (para replicación de doble cadena), y también un origen de replicación de fago (para producción de ADN de una sola cadena). La manipulación y expresión de dichos vectores es bien conocida en el técnica (Hoogenboom y Winter (1992), *supra*; Nissim *et al*. (1994), *supra*). En resumen, el vector puede contener un gen de β -lactamasa para conferir selectividad al fagómido y un promotor lac hacia el extremo 5' de un casete de expresión que puede contener una secuencia líder adecuada, un sitio de clonación múltiple, una o más etiquetas de péptido, uno o más codones de detención TAG y la proteína de fago pIII. Por lo tanto, el uso de varias cepas supresoras y no supresoras de *E. coli* y con la adición de glucosa, iso-propil tio- β -D-galactósido (IPTG) o un fago auxiliar, tal como VCS M13, el vector es capaz de replicarse como un plásmido sin expresión, producir grandes cantidades del miembro de colección de polipéptido únicamente o fago de producto, algunos de los cuales contienen al menos una copia de la fusión de polipéptido-pIII sobre su superficie.

- Las colecciones y repertorios de la descripción pueden contener formatos de anticuerpo. Por ejemplo, el polipéptido contenido dentro de las colecciones y repertorios pueden ser anticuerpos enteros o fragmentos de los mismos, tales como fragmentos Fab, F(ab')₂, Fv o scFv, dominios de V_H o V_L separados, cualquiera de las cuales son ya sea modificadas o no modificadas. Los fragmentos scFv, así como otros polipéptidos de anticuerpo, pueden ser producidos fácilmente usando cualquier método adecuado. Un número de métodos de ingeniería genética para anticuerpos adecuados son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, un scFv se puede formar enlazando ácidos nucleicos que codifican dos dominios variables con un oligonucleótido adecuado que codifica un péptido enlazador apropiado, tal como (Gly-Gly-Gly-Gly-Ser)₃ u otros péptidos enlazadores adecuados. El enlazador forma puente entre el extremo C-terminal de la primera región V y el extremo N-terminal de la segunda región V. Se pueden usar técnicas similares para la construcción de otros formatos de anticuerpo, tales como fragmentos Fv, Fab y F(ab')₂. Para fragmentos de formato Fab y F(ab')₂, los polipéptidos V_H y V_L se pueden combinar con segmentos de región constante que se pueden aislar de genes reordenados, genes C de línea germinal o sintetizados a partir de datos de secuencia de anticuerpos. Una colección o repertorio de acuerdo con la descripción puede ser una colección o repertorio de V_H o V_L.
- Los polipéptidos que comprenden un dominio variable resistente a proteasa preferiblemente comprenden un sitio de unión a ligando diana y/o un sitio de unión a ligando genérico. En ciertas realizaciones, el sitio de unión a ligando genérico es un sitio de unión para un superantígeno, tal como proteína A, proteína L o proteína G. Los dominios variables se puede basar en cualquier dominio variable deseado, por ejemplo, un V_H humano (p.ej. V_H 1a, V_H1b, V_H2, V_H3, V_H4, V_H5, V_H6), un V_λ humano (p.ej. V_λI, V_λII, V_λIII, V_λIV, V_λV, V_λVI o V_κ1) o un V_κ humano (p.ej. V_κ2, V_κ3, V_κ4, V_κ5, V_H6, V_κ7, V_κ8, V_κ9 o V_κ10).

Ácidos nucleicos, células anfitrionas y métodos para producir polipéptidos resistentes a proteasa

- La descripción también se refiere a ácidos nucleicos aislados y/o recombinantes que codifican péptido o polipéptido resistente a proteasa, p.ej. que son seleccionables o seleccionados por los métodos descritos en la presente.
- Los ácidos nucleicos referidos aquí como "aislados" son ácidos nucleicos que han sido separados de otro material (p.ej. otros ácidos nucleicos tales como ADN genómico, ADNc y/o ARN) en su ambiente original (p.ej. en células o en una mezcla de ácidos nucleicos tales como una colección). Un ácido nucleico aislado puede ser aislado como parte de un vector (p.ej. un plásmido).
- Los ácidos nucleicos referidos aquí como "recombinantes" son ácidos nucleicos que han sido producidos por metodología de ADN recombinante, incluyendo métodos que se basan en recombinación artificial, tal como clonación en un vector o cromosoma usando, por ejemplo, enzimas de restricción, recombinación homóloga, virus y similares, y ácidos nucleicos preparados usando la reacción en cadena de polimerasa (PCR).
- La presente descripción también se refiere a una célula anfitriona recombinante que comprende un ácido nucleico recombinante (uno o más) o constructo de expresión que comprende un ácido nucleico que codifica un péptido o polipéptido resistente a proteasa, p.ej. un péptido o polipéptido seleccionable o seleccionado por los métodos descritos en la presente. La descripción también incluye un método para preparar un péptido o polipéptido resistente a proteasa, que comprende mantener una célula anfitriona recombinante de la descripción en condiciones apropiadas para la expresión de un péptido o polipéptido resistente a proteasa. El método puede comprender además el paso de aislar o recuperar el péptido o polipéptido resistente a proteasa, si se desea.
- Por ejemplo, una molécula de ácido nucleico (es decir, una o más moléculas de ácido nucleico) que codifican un péptido o polipéptido resistente a proteasa, o un constructo de expresión (es decir, uno o más constructos) que comprende molécula(s) de ácido nucleico, puede ser introducido en una célula anfitriona adecuada para crear una célula anfitriona recombinante usando cualquier método apropiado para la célula anfitriona seleccionada (p.ej. transformación, transfección, electroporación, infección), por lo que la molécula(s) de ácido nucleico son operablemente enlazadas a uno o más elementos de control de expresión (p.ej. en un vector, en un constructo creado por procedimientos en la célula, integrados al genoma de la célula anfitriona). La célula anfitriona recombinante resultante se puede mantener en condiciones adecuadas para expresión (p.ej. en presencia de un inductor, en un animal adecuado, en un medio de cultivo adecuado complementado con sales, factores de crecimiento, antibióticos, complementos nutricionales apropiados, etc.), por lo que el péptido o polipéptido es producido. Si se desea, el péptido o polipéptido codificado puede ser aislado o recuperado (p.ej. de animal, la célula anfitriona, medio, leche). Este procedimiento abarca expresión en una célula anfitriona de un animal transgénico (véase, p.ej. WO 92/03918, GenPharm International).

El péptido o polipéptido resistente a proteasa seleccionado por el método descrito en la presente también se puede producir en un sistema de expresión *in vitro* adecuado, por síntesis química o por cualquier otro método adecuado.

Polipéptidos, dAbs, agonistas y antagonistas

- Como se describe y se ejemplifica aquí, los péptidos, polipéptidos o dAbs resistentes a proteasa de la invención generalmente se unen a su ligando diana con alta afinidad. Por lo tanto, en otro aspecto, se da a conocer un método para seleccionar, aislar, y/o recuperar un polipéptido o dAb de la invención que se una a antígeno diana con alta afinidad. Generalmente, el método comprende proporcionar una colección o repertorio de péptidos o polipéptidos

(p.ej. dAbs), combinar la colección o repertorio con una proteasa (p.ej. tripsina, elastasa, leucosima, pancreatina, esputo) en condiciones adecuadas para que se manifieste la actividad proteolítica, y seleccionar, aislar o recuperar un péptido o polipéptido que se une a un ligando (p.ej. ligando diana). Debido a que la colección o repertorio ha sido expuesta a proteasa en condiciones en que los péptidos o polipéptidos sensibles a proteasa serán digeridos, la actividad de la proteasa puede eliminar los polipéptidos menos estables que tienen baja afinidad de unión, y por lo tanto producir una colección de péptidos o polipéptidos de unión de alta afinidad. Por ejemplo, el polipéptido o dAb de la invención se puede unir a antígeno diana con una afinidad (K_D ; $K_D = K_{\text{disociación}}(kd)/K_{\text{asociación}}(ka)$) como se determina mediante resonancia de plasmón de superficie) de 1 μM o más fuerte, o aproximadamente 500 nM a aproximadamente 0,5 pM. Por ejemplo, el polipéptido de dAb de la invención puede unir antígeno diana (p.ej. TNFR1) con una afinidad de aproximadamente 500 nM, aproximadamente 100 nM, aproximadamente 10 nM, aproximadamente 1 nM, aproximadamente 500 pM, aproximadamente 100 pM, aproximadamente 10 pM, aproximadamente 1 pM o aproximadamente 0,5 pM. Aunque no nos limitamos a ninguna teoría en particular, los péptidos y polipéptidos que son resistentes a proteasas se cree que tienen una entropía más baja y/o energía de estabilización más alta. Por lo tanto, la correlación entre la resistencia a la proteasa y unión de alta afinidad se pueden relacionar con el grado de compactación y estabilidad de las superficies de los péptidos y polipéptidos y dAbs seleccionados por los métodos descritos en la presente.

El polipéptido, dAb, agonista o antagonista puede ser expresado en *E. coli* o en especies de *Pichia* (p.ej. *P. pastoris*). En una realización, el ligando o monómero de dAb es secretado en una cantidad de al menos aproximadamente 0,5 mg/L cuando se expresa en *E. coli* o en especies de *Pichia* (p.ej. *P. pastoris*). Aunque los ligandos y monómeros de dAb descritos aquí pueden ser secretados cuando se expresan en *E. coli* o en especies de *Pichia* (p.ej. *P. pastoris*). Pueden ser producidos usando cualquier método adecuado, tal como, métodos de química sintética o métodos de producción biológica que no emplean *E. coli* o en especies de *Pichia*.

En algunas realizaciones, el polipéptido, dAb, agonista o antagonista no comprende un dominio variable de inmunoglobulina de *Camelid*, o uno o más aminoácidos de armazón que son únicos para dominios variables de inmunoglobulina codificados por segmentos de gen de anticuerpo de línea germinal de *Camelid*, p.ej. en la posición 108, 37, 44, 45 y/o 47.

Agonistas o antagonistas de acuerdo con la descripción pueden ser monovalentes o multivalentes. En algunas realizaciones, el agonista o antagonista es monovalente y contiene un sitio de unión que interactúa con antígeno diana, el sitio de unión proporcionado por un polipéptido o dAb de la invención. Los agonistas o antagonistas monovalentes se unen a un antígeno diana y pueden no inducir entrelazamiento o agregación de antígeno diana (p.ej. antígenos de receptor) sobre la superficie de células que pueden conducir a la activación del receptor y transducción de señal.

En otras realizaciones, el agonista o antagonista de la descripción es multivalente. Los agonistas o antagonistas multivalentes pueden contener dos o más copias de un sitio de unión particular para antígeno diana o contener dos o más sitios de unión diferentes que se unen a antígeno diana, al menos uno de los sitios de unión siendo proporcionados por un polipéptido o dAb de la invención. Por ejemplo, como se describe aquí, el agonista o antagonista puede ser un dímero, trímero o multímero que comprende dos o más copias de un polipéptido o dAb particular de la invención que se une a antígeno diana, o dos o más polipéptidos o dAbs diferentes de la invención que se unen a antígeno diana. En una realización, un antagonista multivalente se une a un antígeno de receptor de superficie celular y no es agonista sustancial del antígeno (actúa como un agonista del antígeno) en una prueba de células estándar.

En ciertas realizaciones, el agonista o antagonista multivalente contiene dos o más sitios de unión para un epítipo o dominio deseado de antígeno diana.

En otras realizaciones, el polipéptido puede ser un agente insulínico tal como un péptido derivado de GLP-1. Los métodos adecuados para determinar la potencia de un agente insulínico, resistencia a proteasas tales como DPP-IV, vida media después de administración y efectos *in vivo* se describen, por ejemplo, en el documento WO 2006/059106.

En otras realizaciones, el agonista o antagonista multivalente contiene dos o más sitios de unión proporcionados por polipéptidos o dAbs de la invención que se unen a epítopos o dominios diferentes de antígeno diana.

En ciertas realizaciones, el polipéptido, dAb, agonista o antagonista de la descripción son eficaces en modelos de enfermedades inflamatorias crónicas cuando una cantidad efectiva es administrada. Generalmente, una cantidad efectiva es aproximadamente 1 mg/kg a aproximadamente 10 mg/kg (p.ej. aproximadamente 1 mg/kg, aproximadamente 2 mg/kg, aproximadamente 3 mg/kg, aproximadamente 4 mg/kg, aproximadamente 5 mg/kg, aproximadamente 6 mg/kg, aproximadamente 7 mg/kg, aproximadamente 8 mg/kg, aproximadamente 9 mg/kg, o aproximadamente 10 mg/kg). Los modelos de enfermedad inflamatoria (véase aquellos descritos en WO2006038027) son reconocidos por los expertos en la técnica como siendo predictivos en eficacia terapéutica en humanos.

Generalmente, los presentes ligandos (p.ej. agonistas, antagonistas) serán empleados en forma purificada junto con

vehículos farmacológicamente apropiados. Típicamente, estos vehículos incluyen soluciones, emulsiones o suspensiones acuosas o alcohólicas/acuosas, cualquiera incluyendo solución salina y/o medio regulado en su pH. Los vehículos parenterales incluyen solución de cloruro de sodio, dextrosa de Ringer, dextrosa y cloruro de sodio y solución de Ringer lactada. Los adyuvantes fisiológicamente aceptables adecuados, si es necesario para mantener un complejo de polipéptido en suspensión, se pueden escoger de espesantes tales como carboximetilcelulosa, polivinilpirrolidona, gelatina y alginatos.

Los vehículos intravenosos incluyen rellenos fluidos y de nutrientes y rellenos de electrolitos, tales como aquellos basados en dextrosa de Ringer. Los conservadores y otros aditivos, tales como antimicrobianos, antioxidantes, agentes quelatadores y gases inertes, también pueden estar presentes (Mack (1982) *Remington's Pharmaceutical Sciences*, 16a Edición). Se pueden usar diversas de formulaciones adecuadas, incluyendo formulaciones de liberación prolongada.

Los ligandos (p.ej. antagonistas) de la presente descripción se pueden usar como composiciones administradas por separado o junto con otros agentes. Estos pueden incluir varios fármacos inmunoterapéuticos tales como ciclosporina, metotraxato, adriamicina o cisplatino, e inmunotoxinas. Las composiciones farmacéuticas pueden incluir "cócteles" de varios citotóxicos u otros agentes junto con los ligandos de la presente descripción, o incluso combinaciones de ligandos de acuerdo con la presente descripción que tienen especificidades diferentes, tales como ligandos seleccionados usando diferentes antígenos o epitopos dianas, ya sea que estén o no en acervo antes de la administración.

La vía de administración de composiciones farmacéuticas de acuerdo con la descripción puede ser cualquiera de aquellas comúnmente conocidas por los expertos en la técnica. Para terapia, incluyendo sin limitación inmunoterapia, los ligandos seleccionados de los mismos de la invención se pueden administrar a cualquier paciente de acuerdo con técnicas estándares.

La administración puede ser cualquier modo apropiado, incluyendo vía parenteral intravenosa, intramuscular, intraperitoneal, transdérmica, pulmonar, o también, de manera apropiada, por infusión directa con un catéter. La dosis y frecuencia de administración dependerán de la edad, sexo y condición del paciente, administración concurrente de otros fármacos, contraindicaciones y otros parámetros que han de ser tomados en cuenta por el médico. La administración puede ser local (p.ej. suministro local al pulmón por administración pulmonar, p.ej. administración intranasal) o sistémica como se indica.

Los ligandos de esta descripción pueden ser liofilizados para su almacenamiento y reconstituidos en un vehículo adecuado antes de usarse. Esta técnica se ha mostrado que es efectiva con inmunoglobulinas convencionales y se pueden emplear técnicas de liofilización y reconstitución conocidas en la técnica. Los expertos en la técnica apreciarán que la liofilización y reconstitución pueden conducir a grados variables de pérdida de actividad de anticuerpos (p.ej. con inmunoglobulinas convencionales, los anticuerpos IgM tienden a tener mayor pérdida de actividad que los anticuerpos IgG) y que los niveles de uso pueden tener que ser ajustados ascendentemente para compensación.

Las composiciones que contienen los presentes ligandos (p.ej. agonistas, antagonistas) o un cóctel de los mismos de pueden administrar para tratamientos profilácticos y/o terapéuticos. En ciertas aplicaciones terapéuticas, una cantidad adecuada para lograr al menos inhibición parcial, supresión, modulación, muerte o algunos otros parámetros medibles, de la población de células seleccionadas se define como "dosis terapéuticamente efectiva", las cantidades necesarias para lograr esta dosis dependerán de la severidad de la enfermedad y el estado general del sistema inmunológico propio del paciente, pero generalmente varían de 0.005 a 5.0 mg del ligando, p.ej. dAb, agonista o antagonista por kilogramo de peso corporal, con dosis de 0.05 a 2.0 mg/kg/dosis siendo más comúnmente usadas. Para aplicaciones profilácticas, composiciones que contienen los presentes ligandos o cócteles de los mismos pueden ser administrados también en dosis similares o ligeramente más bajas, para prevenir, inhibir o retardar el inicio de la enfermedad (p.ej. para sostener remisión o quiescencia, o para prevenir fase aguda). El médico clínico podrá determinar el intervalo de dosis apropiado para tratar, suprimir o prevenir enfermedad. El tratamiento o terapia puede ser empleado usando las composiciones descritas en la presente se considera "efectivo" si uno o más síntomas son reducidos (p.ej. al menos por 10% o al menos un punto en una escala de evaluación clínica), en relación con dichos síntomas presentes antes del tratamiento, o en relación con dichos síntomas en un individuo (humano o modelo animal) no tratado con dicha composición u otro control adecuado. Los síntomas obviamente varían dependiendo de la enfermedad o trastorno diana, pero lo puede medir un clínico o técnico experto en la técnica. Esos síntomas se pueden medir, por ejemplo, monitoreando el nivel de uno o más indicadores bioquímicos de la enfermedad o trastorno (p.ej. niveles de una enzima o metabolito correlacionado con la enfermedad, números de células afectadas, etc.), al monitorear manifestaciones físicas (p.ej. inflamación, tamaño de tumor, etc.), o por una escala de evaluación clínica aceptada, por ejemplo, la escala de estado de incapacidad expandida (para esclerosis múltiple), el cuestionario de enfermedad intestinal inflamatoria de Irvine (evaluación de 32 puntos que evalúan la calidad de vida con respecto a función intestinal, síntomas sistémicos, función social y estado emocional-las puntuaciones varían de 32 a 224, en donde las puntuaciones más altas indican una mejor calidad de vida), la escala de calidad de vida en artritis reumatoide, u otra escala de evaluación clínica aceptada son conocidas en el campo. Una reducción sostenida (p.ej. un día o más largo) en síntomas de enfermedad o trastorno al menos por 10% o por uno o más puntos en una escala clínica dada es

indicativo de tratamiento “efectivo”. De manera similar, la profilaxis realizada usando una composición como se describe en la presente es “efectiva” si el inicio o severidad de uno o más síntomas es retardado, reducido o anulado en relación con los síntomas en un individuo similar (humano o modelo animal) no tratado con la composición.

5 Una composición que contiene un ligando (p.ej. agonista, antagonista) o cóctel del mismo de acuerdo con la presente descripción se puede emplear en situaciones profiláctica y terapéutica para ayudar a la alteración, inactivación, muerte o remoción de una población de células diana seleccionadas en un mamífero. Además, los repertorios seleccionados de polipéptidos descritos en la presente se pueden usar extracorporalmente o *in vitro* selectivamente para matar, agotar o de otra manera remover de manera efectiva una población de células diana de una colección heterogénea de células. Sangre de un mamífero se puede combinar extracorporalmente con los
10 ligandos, por lo que las células no deseadas son muertas o removidas de otra manera de la sangre para ser regresadas al mamífero de acuerdo con técnicas estándares.

Una composición que contiene un ligando (p.ej. agonistas o antagonista) de acuerdo con la presente descripción se puede emplear en situaciones profiláctica y terapéutica para ayudar en alteración, inactivación, muerte o remoción de una población de células diana seleccionadas en un mamífero.

15 Los ligandos (p.ej. antagonistas anti-antígeno diana, agonistas, monómeros de dAb) se pueden administrar y/o formular junto con uno o más agentes terapéuticos o activos adicionales. Cuando un ligando (p.ej. un dAb) se administra con un agente terapéutico adicional, el ligando se puede administrar antes, simultáneamente con o después de la administración del agente adicional. Generalmente, el ligando y agente adicional se administran de una manera que proporcione un solapamiento de efecto terapéutico.

20 En una realización preferida de la descripción, las composiciones farmacéuticas que contienen un fármaco GLP-1 o un análogo o derivado de GLP-1 de acuerdo con el presente descripción se pueden administrar parenteralmente a pacientes que necesitan dicho tratamiento. La administración parenteral se puede realizar por inyección subcutánea, intramuscular o intravenosa por medio de una jeringa, opcionalmente una jeringa en forma de pluma. Alternativamente, la administración parenteral se puede realizar por medio de una bomba de infusión. Una opción
25 adicional es una composición que puede ser potenciada o un líquido para la administración del fármaco GLP-1 o análogo o derivado de GLP-1 en forma de una aspersión nasal o pulmonar. Como una opción adicional, el fármaco GLP-1 o análogo o derivado de GLP-1 de la descripción también se puede administrar por vía transdérmica, p.ej. desde un parche, opcionalmente un parche iontoforético o por vía transmucosa, p.ej. vía bucal. En otras realizaciones, las composiciones se administran por vía oral, p.ej. una píldora, cápsula, bebida (p.ej. comercializada como una bebida de pérdida de peso para tratamiento de obesidad).
30

Una composición para administración parenteral de compuestos de GLP-1, por ejemplo, se puede preparar como se describe en el documento WO 03/002136 (US2003119734).

En otra realización, la presente descripción se refiere al uso de un compuesto de acuerdo con la descripción para la preparación de un medicamento para el tratamiento de hiperglucemia, diabetes de tipo 1, diabetes de tipo 2 o
35 deficiencia de células β . En realizaciones específicas para estas indicaciones, el fármacos se selecciona de un agente insulínico, e incretina, un péptido similar a glucagón 1, un péptido GLP-1, un análogo de GLP-1, un derivado de GLP-1, PYY, un péptido de PYY, un análogo de PYY, un derivado de PYY, Exendina-3, un péptido de Exendina-3, un análogo de Exendina-3, un derivado de Exendina-3, Exendina-4, un péptido de Exendina-4, un análogo de Exendina-4, un derivado de Exendina-4 o una combinación de dos o más de estos (p.ej. péptido de GLP-1 y un péptido de PYY).
40

El tratamiento con un compuesto de acuerdo con la presente descripción también se puede combinar con una segunda o más sustancias farmacológicamente activas, que pueden o no ser parte del conjugado de fármaco o fusión. Por ejemplo, un activo seleccionado de agentes antidiabéticos, agentes antiobesidad, agentes reguladores del apetito, agentes antihipertensivos, agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones que resultan de
45 o asociadas con diabetes y agentes para el tratamiento y/o prevención de complicaciones y trastornos que resultan de o asociados con obesidad. En el presente contexto, la expresión “agente antidiabético” incluye compuestos para el tratamiento y/o profilaxis de resistencia a la insulina y enfermedades en donde la resistencia a la insulina es un mecanismo patofisiológico.

Formatos

50 La vida media incrementada es útil en aplicaciones *in vivo* de inmunoglobulinas, especialmente anticuerpos y muy especialmente fragmentos de anticuerpo de tamaño pequeño. Dichos fragmentos (Fvs, Fvs, Fabs, scFvs, dAbs unidos a disulfuro) padecen de aclaramiento rápido del cuerpo; por lo tanto, mientras que son capaces de alcanzar la mayor parte del cuerpo rápidamente, son rápidos de producir y fáciles de manejar, sus aplicaciones *in vivo* han sido limitadas sólo por su persistencia breve *in vivo*. Una realización de la descripción resuelve este problema al
55 proporcionar vida media incrementada de los ligandos *in vivo* y consecuentemente tiempos de persistencia más largos en el cuerpo de la actividad funcional del ligando.

Los métodos para análisis farmacocinético y determinación de la vida media del ligando serán familiares para los expertos en la técnica. Se pueden encontrar detalles en *Kenneth, A et al. Chemical Stability of Pharmaceuticals: A*

Handbook for Pharmacists y en *Peters et al*, Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M Gibaldi & D Perron, publicada por Marcel Dekker, 2a. Rev. ex edición (1982), que describe parámetros farmacocinéticos tales como vidas media de alfa t y beta t y están bajo la curva (AUC).

5 Las vidas medias ($t_{1/2}$ alfa y $t_{1/2}$ beta) y AUC se puede determinar a partir de una curva de concentración de ligando en el suero contra el tiempo. El paquete de análisis WinNonlin (disponible de Pharsight Corp., Mountain View, CA94040, EE.UU.) se puede usar, por ejemplo, para modelar la curva. En una primera fase (la fase alfa) el ligando está principalmente bajo distribución en el paciente con alguna eliminación. Una segunda fase (fase beta) es la fase terminal cuando el ligando ha sido distribuido y la concentración en el suero está disminuyendo a medida que el
10 ligando es aclarado del paciente. La vida media alfa t es la vida media de la primera fase y la vida media beta t es la vida media de la segunda fase. Por lo tanto, en una realización, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una vida media de t_{α} en el intervalo de 15 minutos o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 30 minutos, 45 minutos, 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, un ligando o
15 composición de acuerdo con la invención tendrá una vida media t_{α} en el intervalo de hasta y que incluye 12 horas. En una realización, el extremo superior del intervalo es 11, 10, 9, 8, 7, 6 ó 5 horas. Un ejemplo de un intervalo adecuado es 1 a 6 horas, 2 a 5 horas o 3 a 4 horas.

En una realización, la presente invención proporciona un ligando (polipéptido, dAb, agonista o antagonista) o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene una vida media t_{β} en el intervalo de
20 2,5 horas o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 3 horas, 4 horas, 5 horas, 6 horas, 7 horas, 10 horas, 11 horas o 12 horas. Además, o alternativamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene una vida media t_{β} en el intervalo de hasta y que incluye 21 días. En una realización, el extremo superior del intervalo es 12 horas, 24 horas, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días o 20 días. En una realización, un ligando o
25 composición de acuerdo con la invención tendrá una vida media t_{β} en el intervalo de 12 a 60 horas. En una realización adicional, estará en el intervalo de 12 a 48 horas. En una realización adicional más, estará en el intervalo 12 a 26 horas.

Además, o alternativamente a los criterios anteriores, la presente invención proporciona un ligando o una composición que comprende un ligando de acuerdo con la invención que tiene un valor de AUC (área bajo la curva) en el intervalo de 1 mg.min/ml o más. En una realización, el extremo inferior del intervalo es 5, 10, 15, 20, 30, 100,
30 200 ó 300 mg.min/ml. Además, o alternativamente, un ligando o composición de acuerdo con la invención tiene una AUC en el intervalo de hasta 600 mg.min/ml. En una realización, el extremo superior del intervalo es 500, 400, 300, 200, 150, 100, 75 ó 50 mg.min/ml. En una realización, un ligando de acuerdo con la invención tendrá una AUC en el intervalo seleccionado del grupo que consiste de los siguientes: 15 a 150 mg.min/ml, 15 a 100 mg.min/ml, 15 a 75 mg.min/ml y 15 a 50 mg.min/ml.

35 Los polipéptidos y dAbs de la invención y los agonistas o antagonistas que comprenden estos se pueden formular para tener un tamaño hidrodinámico más grande, por ejemplo, al unir un grupo PEG, albúmina de suero, transferrina, receptor de transferrina o al menos una porción de unión a transferrina del mismo, una región Fc de anticuerpo, o mediante conjugación a un dominio de anticuerpo. Por ejemplo, polipéptidos dAbs, agonistas y antagonistas formateados como un fragmento de unión a antígeno más grande de un anticuerpo o como un
40 anticuerpo (p.ej. formateados como Fab, Fab', F(ab)₂, F(ab')₂, IgG, scFv).

El tamaño hidrodinámico de los ligandos (p.ej. monómeros y multímeros de dAb) de la invención se puede determinar usando métodos que son bien conocidos en la técnica. Por ejemplo, cromatografía de filtración en gel se puede usar para determinar el tamaño hidrodinámico de un ligando. Matrices de filtración en gel adecuadas para determinar los tamaños hidrodinámicos de ligandos, tales como matrices de agarosa entrelazadas, son bien
45 conocidas y están fácilmente disponibles.

El tamaño de un formato de ligando (p.ej. el tamaño de una porción de PEG unida a un monómero de dAb), se puede variar dependiendo de la aplicación deseada. Por ejemplo, en donde el ligando está diseñado para dejar la circulación y entrar al tejido periférico, es deseable mantener el tamaño hidrodinámico de un ligando bajo para facilitar la extravasación desde el torrente sanguíneo. Alternativamente, en donde se desea tener el ligando
50 permaneciendo en la circulación sistémica durante un periodo más largo de tiempo, el tamaño de ligando se puede incrementar, por ejemplo formateando como una proteína similar a Ig.

Extensión de la semivida al dirigir un antígeno o epitopo que incrementa la semivida *in vivo*

El tamaño hidrodinámico de un ligando y su semivida en el suero también se puede incrementar conjugando o asociando un polipéptido de unión a antígeno diana, dAb, agonista o antagonista de la invención a un dominio de
55 unión (p.ej. anticuerpo o fragmento de anticuerpo) que se une a un antígeno o epitopo que incrementa la semivida *in vivo*, como se describe aquí. Por ejemplo, el agente de unión a antígeno diana (p.ej. polipéptidos) se puede conjugar a o enlazar a una albúmina de antisuero o anticuerpo de receptor Fc anti-neonatal o fragmento de anticuerpo, p.ej. un receptor Fc anti-SA o anti-neonatal dAb, Fab, Fab' o scFv, o a un anticuerpo anti-SA o anticuerpo de receptor Fc anti-neonatal o un anticuerpo avimero anti-SA, o un dominio de unión anti-SA que comprende un armazón proteínico

seleccionado de, pero preferiblemente no limitado al grupo que consiste de CTLA-4, lipocalina, SpA, un aficuerpo, un avímero, GroEl y fibronectina (véase documento PCT/GB2008/000453 presentado el 8 de febrero de 2008 (WO2008096158; US2009259026) para descripción de estos dominios de unión). Conjugación se refiere a una composición que comprende polipéptido, dAb, agonista o antagonista de la invención que se une (covalente o no covalentemente) a un dominio de unión que se une a albúmina de suero.

Los polipéptidos adecuados que incrementan la semivida en el suero *in vivo* incluyen, por ejemplo, proteínas de fusión de agente neurofarmacéutico de ligando específico de receptor de transferrina (véase patente de EE.UU. No 5,977,307), receptor de células endoteliales capilares de cerebro, transferrina, receptor de transferrina (p.ej. receptor de transferrina soluble), insulina, receptor de factor de crecimiento similar a insulina 1 (IGF-1), receptor de factor de crecimiento similar a la insulina 2 (IGF-2), receptor de insulina, factor de coagulación de la sangre X, α 1-antitripsina y HNF 1 α . Los polipéptidos adecuados que incrementan la semivida en el suero también incluyen alfa-1 glicoproteína (orosomucoide; AAG), alfa-1 antiqumiotripsina (ACT), alfa-1 microglobulina (proteína HC; AIM), antitrombina III (AT III), apolipoproteínas A-1 (Apo A-1), apolipoproteína B (Apo B), ceruloplasmina (Cp), componente de complemento C3 (C3), componente de complemento C4 (C4), inhibidor de esterasa de C1 (C1 INH), proteína de C-reactivo (CRP), ferritina (FER), hemopexina (HPX), lipoproteína(a) (Lp(a)), proteína de unión a manosa (MBP), mioglobina (Myo), prealbúmina (transtiretina; PAL), proteína de unión a retinol (RBP), y factor reumatoide (RF).

Proteínas adecuadas de matriz extracelular incluyen, por ejemplo, colágenos, lamininas, integrinas y fibronectina. Los colágenos son las principales proteínas de la matriz extracelular. Aproximadamente 15 tipos de moléculas de colágeno son actualmente conocidas, encontradas en diferentes partes del cuerpo, p.ej. colágeno tipo I (que representa el 90% del colágeno del cuerpo) encontrado en hueso, piel, tendón, ligamentos, córnea, órganos internos o colágeno de tipo II encontrado en cartílago, disco vertebral, notocorda y humor vítreo del ojo.

Las proteínas adecuadas de la sangre incluyen, por ejemplo, proteínas del plasma (p.ej. fibrina, α -2 macroglobulina, albúmina de suero, fibrinógeno (p.ej. fibrinógeno A, fibrinógeno B), proteína amiloide A del suero, haptoglobina, profilina, ubiquitina, uteroglobulina y β -2-microglobulina), enzimas e inhibidores de enzima (p.ej. plasminógeno, lisozima, cistatina C, alfa-1-antitripsina e inhibidor de tripsina pancreática), proteínas del sistema inmunológico, tales como proteínas de inmunoglobulina (p.ej. IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, cadenas ligeras de inmunoglobulina (κ / λ)), proteínas transportadoras (p.ej. proteína de unión a retinol, α -1 microglobulina), defensinas (p.ej. beta-defensina 1, defensina 1 de neutrófilo, defensina 2 de neutrófilo y defensina 3 de neutrófilo) y similares.

Las proteínas adecuadas encontradas en la barrera hematoencefálica o en un tejido neural incluyen, por ejemplo, receptor de melanocortina, mielina, transportador de ascorbato y similares.

Los polipéptidos adecuados que incrementan la semivida en el suero *in vivo* también incluyen proteínas localizadas en el riñón (p.ej. policistina, colágeno de tipo IV, transportador de anión orgánico K1, antígeno de Heymann), proteínas localizadas en el hígado (p.ej. alcohol deshidrogenasa, G250), proteínas localizadas en el pulmón (p.ej. componente secretor, que se une a IgA), proteínas localizadas en el corazón (p.ej. HSP 27, que está asociado con cardiomiopatía dilatada), proteínas localizadas en la piel (p.ej. queratina), proteína específicas de hueso tales como proteínas morfogénicas (BMPs), que son un subconjunto de la superfamilia de proteínas de factor de crecimiento transformante β que demuestran actividad osteogénica (p.ej. BMP-2, BMP-4, BMP-5, BMP-6, BMP-7, BMP-8), proteínas específicas del tumor (p.ej. antígeno de trofoblasto, receptor de herceptina, receptor de estrógeno, catepsinas (p.ej. catepsina B, que se puede encontrar en el hígado y el bazo)).

Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas incluyen, por ejemplo, antígenos expresados sólo sobre células T activadas, incluyendo LAG-3 (gen de activación de linfocitos), ligando de osteoprotegerina (OPGL; véase *Nature* 402, 304-309 (1999)), OX40 (un miembro de la familia del receptor de TNF, expresado sobre células T activadas y específicamente no regulado en células productoras de virus de leucemia de células T humanas de tipo I (HTLV-I); véase *Immunol.* 165 (1):263-70 (2000)). Las proteínas específicas de enfermedad adecuadas también incluyen, por ejemplo, metaloproteasas (asociadas con artritis/cánceres) incluyendo *Drosophila* CG6512, paraplegina humana, FtsH humana, AFG3L2 humana, ftsH de murino; y factores de crecimiento angiogénicos, incluyendo factor de crecimiento de fibroblastos ácido (FGF-1), factor de crecimiento de fibroblastos básico (FGF-2), factor de crecimiento endotelial vascular/factor de permeabilidad vascular (VEGF/VPF), factor de crecimiento transformante α (TGF α), factor de necrosis tumoral alfa (TNF- α), angiogenina, interleucina-3 (IL-3), interleucina-8 (IL-8), factor de crecimiento endotelial derivado de plaquetas (PD-ECGF), factor de crecimiento placentario (P1GF), factor de crecimiento derivado de plaquetas de midkine-BB (PDGF) y fractalkine.

Los polipéptidos adecuados que incrementan la semivida en el suero *in vivo* también incluyen proteínas de estrés tales como proteínas de choque térmico (HSPs). Las HSPs normalmente se encuentran intracelularmente. Cuando se encuentran extracelularmente, es un indicador de que una célula ha muerto y derramado su contenido. Esta muerte celular no programada (necrosis) ocurre cuando, como resultado de trauma, enfermedad o lesión, las HSPs extracelulares desencadenan una respuesta del sistema inmunológico. La unión a HSP extracelular puede ocasionar la localización de las composiciones de la invención a un sitio de enfermedad.

Las proteínas adecuadas implicadas en transporte de Fc incluyen, por ejemplo, receptor de Brambell (también conocido como FcRB). Este receptor de Fc tiene dos funciones, ambas de las cuales son potencialmente útiles para

suministro. Las funciones son (1) transporte de IgG de madre a hijo a través de la placenta, (2) protección de IgG contra degradación prolongando así su semivida en el suero. Se piensa que el receptor recicla IgG de endosomas. (Véase, Holliger et al, *Nat Biotechnol* 15(7):632-6 (1997)).

dAbs que se une a albúmina de suero (AlbudAbs™)

5 La invención en una realización proporciona un polipéptido, agonista o antagonista (p.ej. ligando específico doble que comprende un dAb anti-antígeno diana (un primer dAb)) que se une a un antígeno diana y un segundo dAb que se une a albúmina de suero (SA), el segundo dAb que se une a SA con una K_D como se determina por resonancia de plasmón de superficie de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 ó 500 μ M (es decir, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), o 100 nM a 10 μ M, o 1 a 5 μ M o 3 a 70 nM o 10 nM a 1, 2, 3, 4 ó 5 μ M. Por ejemplo 30 a 70 nM como se determina por resonancia de plasmón de superficie. En una realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a SA (p.ej. HSA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmón de superficie de aproximadamente 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 nM o 1, 2 ó 3 μ M. En una realización, para un ligando específico doble que comprende un primer dAb anti-SA y un segundo dAb a antígeno diana, la afinidad (p.ej. K_D y/o $K_{disociación}$) como se mide por resonancia de plasmón de superficie, p.ej. usando BiaCore) del segundo dAb para su diana es de 1 a 100000 veces (p.ej. 100 a 100000, o 1000 a 100000, o 10000 a 100000 veces) la afinidad del primer dAb para SA. En una realización, la albúmina en el suero es albúmina de suero humana (HSA). Por ejemplo, el primer dAb se une a SA con una afinidad de aproximadamente 10 μ M, mientras el segundo dAb se une a su diana con una afinidad de 100 pM. En una realización, la albúmina en el suero es albúmina de suero humana (HSA). En una realización, el primer dAb se une a SA (p.ej. HSA) con una K_D de aproximadamente 50, por ejemplo 70, 100, 150 ó 200 nM. Detalles de ligando específico dobles se encuentran en los documentos WO03002609, WO04003019 y WO04058821.

Los ligandos de la invención en una realización pueden comprender un dAb que se une a albúmina en el suero (SA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmón de superficie de 1 nM a 1, 2, 3, 4, 5, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 100, 200, 300, 400 ó 500 μ M (es decir, $\times 10^{-9}$ a 5×10^{-4}), o 100 nM a 10 μ M, o 1 a 5 μ M o 3 a 70 nM o 10 nM a 1, 2, 3, 4 ó 5 μ M. Por ejemplo 30 a 70 nM como se determina por resonancia de plasmón de superficie. En una realización, el primer dAb (o un monómero de dAb) se une a SA (p.ej. HSA) con una K_D como se determina por resonancia de plasmón de superficie de aproximadamente 1, 50, 70, 100, 150, 200, 300 nM o 1, 2 ó 3 μ M. En una realización, el primer y segundo dAbs son enlazados por un enlazador, por ejemplo un enlazador de 1 a 4 aminoácidos o de 1 a 3 aminoácidos, o más de 3 aminoácidos o más de 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 15 ó 20 aminoácidos. En una realización, un enlazador más largo (más de 3 aminoácidos) se usa para incrementar potencia (K_D de uno o ambos dAbs en el agonista o antagonista). En una realización, el enlazador es un enlazador helicoidal.

En realizaciones particulares de los ligandos, agonistas y antagonistas, el dAb se une a albúmina de suero humana y compete para unirse a albúmina con un dAb seleccionado del grupo que consiste de MSA-16, MSA-26 (véase el documento WO04003019 para descripción de estas secuencias), DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (Véase el documento WO2007080392; las SEQ ID No's en este párrafo son aquellas que aparecen en el documento WO2007080392),

dAb8 (dAb10), dAb 10, dAb36, dAb7r20 (DOM7r20), dAb7r21 (DOM7r21), dAb7r22 (DOM7r22), dAb7r23 (DOM7r23), dAb7r24 (DOM7r24), dAb7r25 (DOM7r25), dAb7r26 (DOM7r26), dAb7r27 (DOM7r27), dAb7r28 (DOM7r28), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r29 (DOM7r29), dAb7r31 (DOM7r31), dAb7r32 (DOM7r32), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7r33 (DOM7r33), dAb7h22 (DOM7h22), dAb7h23 (DOM7h23), dAb7h24 (DOM7h24), dAb7h25 (DOM7h25), dAb7h26 (DOM7h26), dAb7h27 (DOM7h27), dAb7h30 (DOM7h30), dAb7h31 (DOM7h31), dAb2 (dAbs 4,7,41), dAb4, dAb7, dAb11, dAb12 (dAb7m12), dAb13 (dAb 15), dAb15, dAb 16 (dAb21, dAb7m16), dAb 17, dAb 18, dAb 19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25 (dAb26, dAb7m26), dAb27, dAb30 (dAb35), dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38 (dAb54), dAb41, dAb46 (dAbs 47, 52 y 56), dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1 (DOM7r1), dAb7r3 (DOM7r3), dAb7r4 (DOM7r4), dAb7r5 (DOM7r5), dAb7r7 (DOM7r7), dAb7r8 (DOM7r8), dAb7r13 (DOM7r13), dAb7r14 (DOM7r14), dAb7r15 (DOM7r15), dAb7r16 (DOM7r16), dAb7r17 (DOM7r17), dAb7r18 (DOM7r18), dAb7r19 (DOM7r19), dAb7h1 (DOM7h1), dAb7h2 (DOM7h2), dAb7h6 (DOM7h6), dAb7h7 (DOM7h7), dAb7h8 (DOM7h8), dAb7h9 (DOM7h9), dAb7h10 (DOM7M0), dAb7h1 1 (DOM7h1 I), dAb7h12 (DOM7M2), dAb7h13 (DOM7h13), dAb7h14 (DOM7h14), dAb7p1 (DOM7p1), y dAb7p2 (DOM7p2) (véase el documento WO2008096158). Los nombres alternativos se muestran entre corchetes después de que el dAb, p.ej. dAb8 tiene un nombre alternativo que es dAb10 es decir dAb8 (dAb10).

En ciertas realizaciones, el dAb se une a albúmina de suero humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un dAb seleccionado del grupo que consiste de

MSA-16, MSA-26,

DOM7m-16 (SEQ ID NO: 473), DOM7m-12 (SEQ ID NO: 474), DOM7m-26 (SEQ ID NO: 475), DOM7r-1 (SEQ ID NO: 476), DOM7r-3 (SEQ ID NO: 477), DOM7r-4 (SEQ ID NO: 478), DOM7r-5 (SEQ ID NO: 479), DOM7r-7 (SEQ ID NO: 480), DOM7r-8 (SEQ ID NO: 481), DOM7h-2 (SEQ ID NO: 482), DOM7h-3 (SEQ ID NO: 483), DOM7h-4 (SEQ ID NO: 484), DOM7h-6 (SEQ ID NO: 485), DOM7h-1 (SEQ ID NO: 486), DOM7h-7 (SEQ ID NO: 487), DOM7h-22 (SEQ ID NO: 489), DOM7h-23 (SEQ ID NO: 490), DOM7h-24 (SEQ ID NO: 491), DOM7h-25 (SEQ ID NO: 492), DOM7h-26 (SEQ ID NO: 493), DOM7h-21 (SEQ ID NO: 494), DOM7h-27 (SEQ ID NO: 495), DOM7h-8 (SEQ ID NO: 496), DOM7r-13 (SEQ ID NO: 497), DOM7r-14 (SEQ ID NO: 498), DOM7r-15 (SEQ ID NO: 499), DOM7r-16 (SEQ ID NO: 500), DOM7r-17 (SEQ ID NO: 501), DOM7r-18 (SEQ ID NO: 502), DOM7r-19 (SEQ ID NO: 503), DOM7r-20 (SEQ ID NO: 504), DOM7r-21 (SEQ ID NO: 505), DOM7r-22 (SEQ ID NO: 506), DOM7r-23 (SEQ ID NO: 507), DOM7r-24 (SEQ ID NO: 508), DOM7r-25 (SEQ ID NO: 509), DOM7r-26 (SEQ ID NO: 510), DOM7r-27 (SEQ ID NO: 511), DOM7r-28 (SEQ ID NO: 512), DOM7r-29 (SEQ ID NO: 513), DOM7r-30 (SEQ ID NO: 514), DOM7r-31 (SEQ ID NO: 515), DOM7r-32 (SEQ ID NO: 516), DOM7r-33 (SEQ ID NO: 517) (las SEQ ID No's en este párrafo son aquellas que aparecen en el documento WO2007080392 ((US20070003549)),

dAb8, dAb10, dAb36, dAb7r20, dAb7r21, dAb7r22, dAb7r23, dAb7r24, dAb7r25, dAb7r26, dAb7r27, dAb7r28, dAb7r29, dAb7r30, dAb7r31, dAb7r32, dAb7r33, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7m12, dAb7m16, dAb7m26, dAb7r1, dAb7r3, dAb7r4, dAb7r5, dAb7r7, dAb7r8, dAb7r13, dAb7r14, dAb7r15, dAb7r16, dAb7r17, dAb7r18, dAb7r19, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13, dAb7h14, dAb7p1, y dAb7p2.

Por ejemplo, el dAb que se une a albúmina de suero humana puede comprender una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-3 (SEQ ID NO:483), DOM7h-4 (SEQ ID NO:484), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7r-13 (SEQ ID NO:497), DOM7r-14 (SEQ ID NO:498), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494), DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (las SEQ ID No's en este párrafo son aquellas que aparecen en el documento WO2007080392 (US20070003549)),

dAb8, dAb 10, dAb36, dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb11, dAb12, dAb13, dAb15, dAb16, dAb17, dAb18, dAb19, dAb21, dAb22, dAb23, dAb24, dAb25, dAb26, dAb27, dAb30, dAb31, dAb33, dAb34, dAb35, dAb38, dAb41, dAb46, dAb47, dAb52, dAb53, dAb54, dAb55, dAb56, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En ciertas realizaciones, el dAb se une a albúmina de suero humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con la secuencia de aminoácidos de un dAb seleccionado del grupo que consiste de

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496), DOM7h-22 (SEQ ID NO:489), DOM7h-23 (SEQ ID NO:490), DOM7h-24 (SEQ ID NO:491), DOM7h-25 (SEQ ID NO:492), DOM7h-26 (SEQ ID NO:493), DOM7h-21 (SEQ ID NO:494), DOM7h-27 (SEQ ID NO:495) (las SEQ ID No's en este párrafo son aquellas que aparecen en el documento WO2007080392 (US20070003549)),

dAb7h21, dAb7h22, dAb7h23, dAb7h24, dAb7h25, dAb7h26, dAb7h27, dAb7h30, dAb7h31, dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En realizaciones muy particulares, el dAb es un V_k dAb que se une a albúmina de suero humana y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de

DOM7h-2 (SEQ ID NO:482), DOM7h-6 (SEQ ID NO:485), DOM7h-1 (SEQ ID NO:486), DOM7h-7 (SEQ ID NO:487), DOM7h-8 (SEQ ID NO:496) (la SEQ ID No's en este párrafo son aquellas que aparecen en el documento WO2007080392 (US20070003549)),

dAb2, dAb4, dAb7, dAb38, dAMI, dAb54, dAb7h1, dAb7h2, dAb7h6, dAb7h7, dAb7h8, dAb7h9, dAb7h10, dAb7h11, dAb7h12, dAb7h13 y dAb7h14.

En realizaciones muy particulares, el dAb es un Vg dAb que se une a albúmina de suero humana y tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada de dAb7h30 y dAb7h31.

- 5 En realizaciones muy particulares, el dAb es dAb7h11 o dAb7h14. En otras realizaciones, el dAb, ligando, agonista o antagonista se une a albúmina de suero humana y comprende una, dos o tres de las CDRs de cualquiera de las secuencias de aminoácidos anteriores, p.ej. una, dos o tres de las CDRs de dAb7h11 o dAb7h14.

V_{HH} de camélido adecuado que se une a albúmina en el suero incluye aquellos descritos en el documento WO 2004/041862 (Ablynx N.V.) (US2009238829) y en el documento WO2007080392 ((US20070003549) , tal como
10 Secuencia A (SEQ ID NO:518), Secuencia B (SEQ ID NO:519), Secuencia C (SEQ ID NO:520), Secuencia D (SEQ ID NO:521), Secuencia E (SEQ ID NO:522), Secuencia F (SEQ ID NO:523), Secuencia G (SEQ ID NO:524), Secuencia H (SEQ ID NO:525), Secuencia I (SEQ ID NO:526), Secuencia J (SEQ ID NO:527), Secuencia K (SEQ ID NO:528), Secuencia L (SEQ ID NO:529), Secuencia M (SEQ ID NO:530), Secuencia N (SEQ ID NO:531), Secuencia O (SEQ ID NO:532), Secuencia P (SEQ ID NO:533), Secuencia Q (SEQ ID NO:534), estos números de secuencia
15 correspondientes a aquellos citados en el documento WO2007080392 o WO 2004/041862 (Ablynx N.V.). En ciertas realizaciones, el V_{HH} de camélido se une a albúmina de suero humana y comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos aproximadamente 80%, o al menos aproximadamente 85%, o al menos aproximadamente 90%, o al menos aproximadamente 95%, o al menos aproximadamente 96%, o al menos aproximadamente 97%, o al menos aproximadamente 98%, o al menos aproximadamente 99% de identidad de secuencia de aminoácidos con
20 ALB1 descrita en el documento WO2007080392 o cualquiera de SEQ ID NOS:518-534, estos números de secuencia correspondientes a aquellos citados en el documento WO2007080392 o WO 2004/041862.

En algunas realizaciones, el ligando, agonista o antagonista comprende una anti-albúmina en el suero dAb que compite con cualquier anti-albúmina en el suero dAb descrita en la presente para unirse a albúmina en el suero (p.ej. albúmina de suero humana).

- 25 En una realización alternativa, el agonista, antagonista o ligando comprende una porción de unión específica para antígeno diana (p.ej. TNFR1 humano), en donde la porción comprende secuencias que no son inmunoglobulina como describe en la solicitud co-pendiente PCT/GB2008/000453 presentada el 8 de febrero de 2008, la descripción de estas porciones de unión, sus métodos de producción y selección (p.ej. de diversas colecciones) .

Conjugación a una porción de extensión de semivida (p.ej. albúmina)

- 30 En una realización, una (una o más) porción de extensión de semivida (p.ej. albúmina, transferrina y fragmentos y análogos de los mismos) es conjugada o asociada con el polipéptido de unión a antígeno diana, dAb, agonista o antagonista de la invención. Ejemplos de albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina adecuados para usarse en un formato de unión a antígeno diana se describen en el documento WO 2005077042. En particular, la siguiente albúmina, fragmentos de albúmina o variantes de albúmina se pueden usar en la presente invención:

- 35 • SEQ ID NO: 1 (como se describe en el documento WO 2005077042);
- Fragmento o variante de albúmina que comprende o que consiste de aminoácidos 1-387 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042;
- Albúmina, o fragmento o variante de la misma, que comprende una secuencia de aminoácidos seleccionados del grupo que consiste de: (a) aminoácidos 54 a 61 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (b)
40 aminoácidos 76 a 89 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (c) aminoácidos 92 a 100 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042; (d) aminoácidos 170 a 176 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (e) aminoácidos 247 a 252 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042; (f) aminoácidos 266 a 277 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042; (g) aminoácidos 280 a 288 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (h) aminoácidos 362 a 368 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (i) aminoácidos 439 a
45 447 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042 (j) aminoácidos 462 a 475 de SEQ ID NO:1 en el documento WO 2005077042; (k) aminoácidos 478 a 486 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042; y (1) aminoácidos 560 a 566 de SEQ ID NO: 1 en el documento WO 2005077042.

Ejemplos adicionales de albúmina, fragmentos y análogos adecuados para usarse en un formato de unión a antígeno diana se describen en el documento WO 03076567. En particular, la siguiente albúmina, fragmentos o
50 variantes se pueden usar en la presente invención:

- Albúmina humana en el suero como se describe en el documento WO 03076567, p.ej. en la figura 3;
- Albúmina humana en el suero (HA) que consiste de una cadena única de polipéptido no glicosilado de 585 aminoácidos con una fórmula molecular peso de 66,500 (Véase, Meloun, et al, *FEBS Letters* 55: 136 (1975); Behrens, et al, *Fed. Proc.* 34:591 (1975); Lawn, et al, *Nucleic Acids Research* 9:6102-6114 (1981); Minghetti, et al.,
55 *J. Biol. Chem.* 261:6747 (1986));

• Una variante polimórfica o análogo o fragmento de albúmina como se describe en Weitkamp, et al, *Ann. Hum. Genet.* 37:219 (1973);

• Un fragmento o variante de albúmina como se describe en EP 322094, p.ej. HA(1-373), HA(1-388), HA(1-389), HA(1-369), y HA(1-419) y fragmentos entre 1- 369 y 1-419;

5 • Un fragmento o variante de albúmina como se describe en EP 399666, p.ej. HA(1-177) y HA(1-200) y fragmentos entre HA(1-X), en donde X es cualquier número de 178 a 199.

En donde una porción que extiende la semivida (una o más) (p.ej. albúmina, transferrina y fragmentos de análogos de las mismas) se usa para dar formato a los polipéptidos de unión de antígeno dianas, dAbs, agonistas y antagonistas de la invención, se puede conjugar usando cualquier método adecuado, tal como por infusión directa a una porción de unión a antígeno diana (p.ej. anti-TNFR1 dAb), por ejemplo usando un solo constructo de nucleótido que codifica una proteína de fusión, en donde la proteína de fusión es codificada como una cadena de polipéptidos única con la porción de extensión de semivida localizada N- o C-terminal a la porción de unión a antígeno diana. Alternativamente, la conjugación se puede lograr usando un enlazador de péptido entre las porciones, p.ej. un enlazador de péptido como se describe en el documento WO 03076567 o WO 2004003019 (. En una realización, la conjugación puede ser a través de un enlazador helicoidal tal como el enlazador helicoidal como se describe aquí. También se debe apreciar que otros enlazadores que pueden ser útiles para este propósito incluyen aquellos tales como enlazadores ricos en glicina-serina. En una realización, el enlazador puede ser un enlazador resistente a proteasa. Típicamente, un polipéptido que codifica semivida en el suero *in vivo* es un polipéptido que ocurre naturalmente *in vivo* y que resiste la degradación o remoción por mecanismos endógenos que remueven material no deseado del organismo (p.ej. humano). Por ejemplo, un polipéptido que incrementa la semivida del suero *in vivo* se puede seleccionar de proteínas de la matriz extracelular, proteínas encontradas en la sangre, proteínas encontradas en la barrera hematoencefálica o en tejido neural, proteínas localizadas en el riñón, hígado, pulmón, corazón, piel o hueso, proteínas de estrés, proteínas específicas de enfermedad, o proteínas implicadas en transporte de Fc.

En realizaciones de la invención descritas a lo largo de esta descripción, en lugar del uso de un antígeno anti-diana "dAb" en un agonista, antagonista o ligando de la invención, se contempla que el experto en la técnica puede usar un polipéptido o dominio que comprenda una o más de todas las tres CDRs de un dAb de la invención que se une a antígeno diana (p.ej. CDRs injertada sobre un armazón proteínico de proteína adecuado o esqueleto, p.ej. un anticuerpo, un armazón proteínico de SpA, un dominio de clase A de receptor de LDL o un dominio de EGF). La descripción como un todo debe considerarse de para proporcionar una descripción de agonistas o antagonistas usando dichos dominios en lugar de dAb. A este respecto, véase el documento WO2008096158.

En una realización, por lo tanto, un agonista o antagonista de la invención comprende un dominio variable único de inmunoglobulina o un anticuerpo de dominio (dAb) que tiene especificidad de unión para antígeno diana o las regiones determinantes de complementariedad de dicho dAb en un formato adecuado. El agonista o antagonista puede ser un polipéptido que consista de dicho dAb, o que consista esencialmente de dicho dAb. El agonista o antagonista puede ser un polipéptido que comprenda un dAb (o las CDRs de un dAb) en un formato adecuado, tal como un formato de anticuerpo (p.ej. formato similar a IgG, scFv, Fab, Fab', F(ab')₂), o un ligando específico doble que comprenda un dAb que se una a antígeno diana y un segundo dAb que se una a otra proteína diana, antígeno o epitopo (p.ej. albúmina de suero).

Los polipéptidos, dAds, agonistas y antagonistas de acuerdo con la invención pueden ser formateados como una variedad de formatos de anticuerpo adecuados que son conocidos en la técnica, tales como formatos similares a IgG, anticuerpos quiméricos, anticuerpos humanizados, anticuerpos humanos, anticuerpos de cadena única, anticuerpos biespecíficos, cadenas pesadas de anticuerpo, cadenas ligeras de anticuerpos, homodímeros y heterodímeros de cadenas pesadas y/o cadenas ligeras de anticuerpo, fragmentos de unión a antígeno de cualquiera de los anteriores (p.ej. un fragmento Fv (p.ej. Fv de cadena única (scFv), un Fv unido a disulfuro), un fragmento de Fab, un fragmento de Fab', un fragmento de F(ab')₂), un dominio variable único (p.ej. V_H, V_L), un dAb, y versiones modificadas de cualquiera de los anteriores (p.ej. modificado por la unión covalente de polialquilenglicol (p.ej. polietilenglicol, polipropilenglicol, polibutilenglicol) u otro polímero adecuado).

En algunas realizaciones, la descripción proporciona un ligando (un antagonista anti-TNFR1) que se un formato similar a IgG. Dichos formatos tienen la estructura de cuatro cadenas convencional de una molécula de IgG (dos cadenas pesadas y dos cadenas ligeras) en la cual una o más de las regiones variables (V_H y/o V_L) ha sido remplazado por un dAb de la invención. En una realización, cada una de las regiones variables (regiones 2 V_H y regiones 2 V_L) es remplazada por un dAb o un dominio variable único. Al menos uno de los cuales es un dAb de antígeno anti-diana de acuerdo con la invención. Los dAbs o dominios de variable sencillos que son incluidos en el formato similar a IgG pueden tener la misma especificidad o diferentes especificidades. En algunas realizaciones, el formato similar a IgG es tetravalente y puede tener uno (antígeno anti-diana únicamente) dos (p.ej. antígeno anti-diana y anti-SA), tres o cuatro especificidades. Por ejemplo, el formato similar a IgG puede ser mono específico y comprende 4 dAbs que tienen la misma especificidad; biespecífico y comprende 3 dAbs que tienen la misma especificidad y otro dAb que tiene una especificidad diferente; biespecífico y comprenden dos dAbs que comprenden especificidad y dos dAbs que tienen una especificidad común pero diferente; trispecífico y comprende primer y segundo dAbs que tienen la misma especificidad, un tercer dAb con una especificidad diferente y un cuarto dAb con

una especificidad diferente del primer, segundo y tercer dAbs; o tetraespecífico y comprende cuatro dAbs que tienen cada uno una especificidad diferente. Fragmentos de unión a antígeno de formatos similares a IgG (p.ej. Fab, F(ab')₂, Fab', Fv, scF_v) pueden ser preparados. En una realización, los formatos similares a IgG o fragmentos de unión a antígeno de los mismos no entrelazan antígeno diana, por ejemplo, el formato puede ser monovalente para antígeno diana. Si la activación de complemento y/o función de citotoxicidad de unión dependiente de anticuerpo (ADCC) se desea, el ligando puede ser un formato similar a IgG1. Si se desea, el formato similar a IgG puede comprender una región constante mutada (región constante de cadena pesada de IgG variante) para reducir al mínimo la unión para receptores a Fc y/o capacidad para fijar complemento (véase, p.ej. Winter *et al.*, GB 2,209,757 B; Morrison *et al.*, WO 89/07142; Morgan *et al.*, WO 94/29351, 22 de diciembre de 1994).

Los ligandos de la invención (polipéptidos, dAbs, agonistas y antagonistas) pueden ser formateados como una proteína de fusión que contiene un primer dominio variable único de inmunoglobulina que es fusionado directamente a un segundo dominio variable único de inmunoglobulina. Si se desea dicho formato, además puede comprender una porción de extensión de semivida. Por ejemplo, el ligando puede comprender un primer dominio variable único de inmunoglobulina que es fusionado directamente a un segundo dominio variable único de inmunoglobulina que es fusionado directamente a un dominio variable único de inmunoglobulina que se une a albúmina de suero.

Generalmente, la orientación de los dominios de polipéptido que tienen un sitio de unión con especificidades de unión para una diana, y si el ligando comprende un enlazador, es asunto de elección de diseño. Sin embargo, algunas orientaciones, con o sin enlazadores, pueden proporcionar mejores características de unión que otras orientaciones. Todas las orientaciones (p.ej. dAb1-enlazador-dAb2; dAb2-enlazador-dAb1) son abarcadas por la descripción son ligandos que contienen una orientación que proporcionan características de unión deseadas pueden ser fácilmente identificadas por determinación selectiva.

Los polipéptidos y dAbs de acuerdo con la invención, incluyendo monómeros dímeros y trímeros de dAb, pueden ser enlazados a región de Fc de anticuerpo, que comprenden uno o ambos de los dominios de C_{H2} y C_{H3} y opcionalmente una región de gozne. Por ejemplo, vectores que codifican ligandos enlazados como una secuencia de nucleótidos única a una región de Fc se pueden usar para preparar dichos polipéptidos. La invención además proporciona dímeros, trímeros y polímeros de los monómeros de dAb antes mencionados.

Ejemplos

Ejemplo 1

Propósito del estudio

El propósito del estudio fue obtener variantes resistentes a proteasa de fusiones de GLP-1 AlbuAb™ al realizar selección de fagos en una colección derivada de variante de GLP-1 que comprende GLP-1 resistente a DPP IV (referido aquí como *GLP-1) en combinación con tratamiento de fago con varias proteasas (incluyendo aquellas que ocurren naturalmente en el anfitrión de expresión). Como se describe aquí, un AlbuAb™ es un dominio variable único de inmunoglobulina que se une específicamente a albúmina de suero.

Receptor de GLP-1

El receptor de péptido-1 similar a glucagón (GLP-1R) pertenece a la familia B1 de siete receptores acoplados a proteína G de transmembrana. Las interacciones de unión entre el receptor y su ligando agonista natural GLP-1 es iniciado por unión del ligando a dominio N-terminal extracelular del receptor (ECD GLP-1R) y seguido por interacción con el núcleo de la porción de transmembrana (Al-Sabah *et al.*, 2003; FEBS Lett; 553(3): 342-6). Se ha mostrado que la unión de GLP-1 al dominio N-terminal aislado es retenida si el núcleo de transmembrana es retirado, aunque la afinidad es reducida (Lopez de Maturana *et al.*, 2003; J. Biol. Chem; 278(12): 10195-200). Puesto que el uso del receptor entero no es deseable para selección de fagos en solución, debido a la solubilidad de solución deficiente de receptores con dominio de transmembrana en solución acuosa sin detergentes solubilizantes, el dominio extracelular aislado se usó para captura de fagos para simplificar el experimento y enriquecer moléculas de presentación sobre fagos con afinidad a ECD GLP-1R.

Las secuencias de nucleótidos y aminoácidos para el monómero Fc con etiqueta His de ECD GLP-1R son como sigue:

Secuencia de nucleótidos (SEQ ID NO:1):

ATGGCCGGCG CCCCCGGCCC GCTGCGCCTT GCGCTGCTGC TGCTCGGGAT
 GGTGGGCAGG GCCGGCCCCC GCCCCCAGGG TGCCACTGTG TCCCTCTGGG
 AGACGGTGCA GAAATGGCGA GAATACCGAC GCCAGTGCCA GCGCTCCCTG
 ACTGAGGATC CACCTCCTGC CACAGACTTG TTCTGCAACC GGACCTTCGA
 TGAATACGCC TGCTGGCCAG ATGGGGAGCC AGGCTCGTTC GTGAATGTCA
 GCTGCCCTG GTACCTGCCC TGGGCCAGCA GTGTGCCGCA GGGCCACGTG
 TACCGTTTCT GCACAGCTGA AGGCCTCTGG CTGCAGAAGG ACAACTCCAG
 CCTGCCCTGG AGGGACTTGT CGGAGTGCGA GGAGTCCAAG CGAGGGGAGA
 GAAGCTCCCC GGAGGAGCAG CTCCTGTTCC TCAAGCTTGA GCCCAAATCG
 GCCGACAAAA CTCACACATC ACCACCGTCA CCAGCACCTG AACTCTGGG
 GGGACCGTCA GTCTTCCTCT TCCCCCAA ACCCAAGGAC ACCCTCATGA
 TCTCCCGGAC CCCTGAGGTC ACATGCGTGG TGGTGGACGT GAGCCACGAA
 GACCCTGAGG TCAAGTTCAA CTGGTACGTG GACGGCGTGG AGGTGCATAA
 TGCCAAGACA AAGCCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCACG TACCGGGTGG
 TCAGCGTCCT CACCGTCCTG CACCAGGACT GGCTGAATGG CAAGGAGTAC
 AAGTGCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCA GCCCCCATCG AGAAAACCAT
 CTCAAAGCC AAAGGGCAGC CCCGAGAACC ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC
 CATCCCGGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCCTGGTC
 AAAGGCTTCT ATCCAGCGA CATCGCCGTG GAGTGGGAGA GCAATGGGCA
 GCCGGAGAAC AACTACAAGA CCACGCCTCC CGTGCTGGAC TCCGACGGCT
 CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTGG ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG
 GGGAACGTCT TCTCATGCTC CGTGATGCAT GAGGCTCTGC ACAACCACTA
 CACGCAGAAG AGCCTCTCCC TGTCTCCGGG TAAACATCAC CATCATCATC
 ACTGA

Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO:2):

MAGAPGPLRL ALLLLGMVGR AGPRPQGATV SLWETVQKWR EYRRQCQRSL
 TEDPPATDL FCNRTFDEYA CWPDGEPGSF VNVSCPWYLP WASSVPQGHV
 YRFCTAEGLW LQKDNSSLPW RDLSECEESK RGERSSPEEQ LLFLKLEPKS
 ADKTHSPPS PAPELLGGPS VLFPPKPKD TLMISRTPEV TCVVVDVSHE
 DPEVKFNWYV DGVEVHNAKT KPREEQYNST YRVVSVLTVL HQDWLNGKEY
 KCKVSNKALP APIEKTISKA KGQPREPVY TLPPSRDEL TKNQVSLTCLV
 KGFYPSDIAV EWESNGQPEN NYKTTTPVLD SDGSFFLYSK LTVDKSRWQQ
 GNVFSCSVMH EALHNHYTQK SLSLSPGKHH HHHH

- 5 El GLP-1R ECD también se expresó con una etiqueta IgG Fc, que permitió la purificación inicial de la proteína agarosa de proteína A. durante selecciones de fago, el receptor soluble entonces puede ser capturado usando esferas revestidas con proteína A.

Selecciones de fago de prueba

- 10 Se realizaron pruebas para verificar que el dominio extracelular de receptor de GLP-1 se puede usar para selecciones de colección de presentación sobre fagos.

Vector de fago

- 15 Un vector de presentación de fago filamentoso (fd), pDOM34 (que es un derivado de pDOM34) se usa, el cual se basa en vector fd con una myc tag y en donde una secuencia de proteína puede ser clonada entre sitios de restricción para proporcionar una fusión de proteína-gen III (pDOM3, como se describe en el documento WO 2007/085815, es un derivado del vector de fago Fd en el cual la secuencia de péptido de señal del gen III es remplazada por el péptido de señal de proteína de superficie anclada a glicolípido de levadura (GAS) (WO 2005/093074). También contiene una etiqueta *c-myc* entre la secuencia líder y el gen III, que pone al gen III de regreso en el armazón).

Modificaciones de pDOM4 que conducen a pDOM34 incluyen:

- 20 1) desactivación del sitio NcoI en la posición 7476nt de pDOM4

Secuencia de nucleótidos:

AAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAG
 AATTGGCCGCAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAGAAGCG
 GCGGCGAAAGAATTGGCCGCA (SEQ ID NO: 8)

Para cubrir la secuencia entera del *GLP-1 (excluyendo sitios que se sabe que son importantes para unión a receptor (como se describe, por ejemplo, en Sarrauste de Menthiere et al. Eur J Med Chem. 2004 Jun;39(6):473-80; Neidigh et al. Biochemistry. 2001 Nov 6;40(44): 13188-200; Hjorth et al. J Biol Chem. 1994 Dec 2;269(48):30121-4 y Gallwitz et al. Regul Pept. 7 de mayo de 1996; 63(l):17-22)), se construyeron 17 repertorios usando un protocolo de PCR de ensamble mediante el uso de polimerasa de alta fidelidad Phusion (NEB) en un volumen de reacción de 50 microlitros. Cuatro nucleótidos distribuidos aleatoriamente por colección fueron introducidos por iniciadores en PCRs primarios y después el ensamble se realizó con iniciadores biotinilados. PCR sujeto a error usando Kit Mutazyme II kit (Stratagene), iniciadores biotinilados y 5-50 pg de plantilla para una reacción de 50 µl introdujo mutaciones aleatorias dentro de *GLP-1. Debido a la longitud corta de la secuencia de nucleótido de *GLP-1, la PCR sujeta a error se revisó dos veces, para incrementar la tasa de mutación.

Después de la digestión con *NcoI* y *NotI*, los insertos fueron purificados a partir de productos no digeridos con esferas revestidas con estreptavidina. La ligación de prueba se realizó en donde productos digeridos fueron ligados en pDOM34 en los sitios correspondientes.

La secuenciación de los clones de ligación de prueba confirmó la diversificación esperada en todas las colecciones después de lo cual siguió la ligación a escala completa y transformación de las colecciones. La ligación se realizó en un volumen total de 500 microlitros, con 1 microgramo del vector digerido e inserto en la relación 1:2 con ADN ligasa de T4 (NEB). Cada colección fue transformada en dos pasos, 10 microlitros por 100 microlitros de células TB1 de *E. coli* electrocompetentes y después de la recuperación, 100 ml de medio durante 1 hr a 37°C con agitación, las colecciones se colocaron en placas cuadradas grandes (22 cm) que contenían agar 2XTY Tet. Las placas se hicieron crecer durante la noche y después se rasparon en 5 ml de 2xTY con 15% de glicerol para preparación de abastecimiento. Los tamaños de colección estaban en el intervalo de 10⁷-10⁸ transformantes.

Para preparación de colección de fagos, un cultivo de colección se inició mediante la inoculación de 100 microlitros de abastecimiento de glicerol en 200 mililitros de medio 2xTY que contenía antibiótico de tal manera que la densidad final del cultivo inmediatamente después de la inoculación no excedió DO₆₀₀ = 0.1. Las colecciones se cultivaron durante la noche a aproximadamente 18 horas a 37°C con agitación. Se formaron pastillas con el cultivo por centrifugación y se prepararon colecciones de fagos por precipitación doble con PEG y se resuspendieron en PBS.

Varios clones de colecciones no seleccionadas se escogieron aleatoriamente para secuenciación, para confirmar la construcción de colecciones exitosa y la primera ronda de reconocimiento y selección seguida después de la preparación de la colección de fagos.

Los métodos de reconocimiento y selección, preparación de abastecimiento de glicerol y amplificación de fagos son como se describe más adelante a menos que se indique otra cosa.

El dominio extracelular del receptor de GLP-1 se usó para reconocimiento y selección. 100 microlitros de las colecciones de fagos se incubaron con 2% de Marvell PBS que contenía 100nM GLP-1R. La incubación se llevó a cabo durante 1 hr a temperatura ambiente y después los fagos se combinaron con dinaesferas de proteína A pre-bloqueadas (2% Marvell PBS, 1 hr, T.A.) (Dynal). Después de una hora de incubación sobre una rueda giratoria a T.A. las esferas se lavaron en el sistema de purificación KingFisher (Thermo Electron Corporation) ocho veces con 0,1% de Tween PBS (el robot KingFisher automatiza el proceso de lavado usando una sonda magnética para transferir las esferas de solución de lavado a solución de lavado) y fagos específicos fueron recuperados por elución en 500 microlitros de glicina 0.1M pH 2.0. Después de la neutralización con 100 microlitros de Tris-Cl 1M, pH 8.0 se usaron fagos para infección de las células TG1 de *E. coli* en fase log durante 45 minutos a 37°C. Las células infectadas se colocaron sobre placas de agar Tet que se hicieron crecer durante la noche a 37°C. Los títulos de colecciones, entrada, salida y tamaño de colecciones se presentan en la siguiente tabla.

Colección	Tamaño de la colección	1ª selección; fago φ/ml	
		Entrada	Salida
1	2,8 x 10 ⁸	3,9 x 10 ¹⁰	3,2 x 10 ⁷
2	1,2 x 10 ⁸	1,0 x 10 ¹¹	1,0 x 10 ⁶
3	2,4 x 10 ⁷	4,6 x 10 ¹⁰	7,0 x 10 ⁵
4	8,0 x 10 ⁷	1,0 x 10 ¹¹	8,0 x 10 ⁶

Colección	Tamaño de la colección	1ª selección; fago ϕ /ml	
		Entrada	Salida
5	$4,0 \times 10^7$	$2,6 \times 10^9$	$1,0 \times 10^7$
6	$8,0 \times 10^7$	$7,3 \times 10^{10}$	$6,0 \times 10^6$
7	$4,0 \times 10^7$	$8,0 \times 10^9$	$6,0 \times 10^6$
8	$2,8 \times 10^7$	$5,4 \times 10^9$	$1,0 \times 10^7$
9	$6,8 \times 10^7$	$9,4 \times 10^9$	$5,0 \times 10^6$
10	$2,0 \times 10^8$	$5,7 \times 10^8$	$1,5 \times 10^6$
11	$8,8 \times 10^8$	$4,5 \times 10^9$	$2,0 \times 10^6$
12	$6,6 \times 10^8$	$4,0 \times 10^9$	$1,6 \times 10^6$
13	$1,8 \times 10^8$	$6,7 \times 10^{10}$	$2,0 \times 10^5$
14	$4,8 \times 10^7$	$6,0 \times 10^9$	$3,0 \times 10^5$
15	$6,0 \times 10^7$	$4,2 \times 10^{10}$	$1,0 \times 10^6$
16	$2,4 \times 10^8$	$1,6 \times 10^{10}$	$4,8 \times 10^5$
17	$4,2 \times 10^8$	$1,3 \times 10^{10}$	$1,4 \times 10^6$
18 sujeto a error	$1,5 \times 10^8$	$2,5 \times 10^9$	$6,0 \times 10^5$
Auto-ligación	$4,0 \times 10^5$		
DAT-X control	-	$4,0 \times 10^9$	$1,8 \times 10^7$

La primera ronda de selección produjo una salida razonable para todas las colecciones.

Los abastecimientos de glicerol se prepararon raspando las colonias de placa de agar con 2 ml de medio 2XTY que contenía 15% de glicerol y se puso en alícuotados en tubos criogénicos.

- 5 Las siguientes selecciones se realizaron en el fago en acervo. El fago amplificado se obtuvo combinando el cultivo de los gliceroles de *E. coli* que contenían salidas de la primera selección de todas las 18 colecciones. El cultivo se inició mediante la inoculación de 50 microlitros de cada abastecimiento de glicerol de colección reconocida y seleccionada en 1 litro de medio 2xTY con antibiótico. El cultivo se dividió en 21 matraces con agitador, medio litro en cada uno y cultivados durante la noche a 37°C con agitación, 250 rpm. El fago se preparó después del 18-20 hr del cultivo mediante precipitación individual con PEG y resuspensión en PBS.

10 Selección de colecciones de presentación de fagos DAT-X con proteasa

- 15 El fago amplificado de la salida de la 1ª. selección se usó para las selecciones posteriores con concentración constante de GLP-1R, 100 nM. Además, antes de la selección con tripsina, un lote de fago de la salida de la primera selección se subclonó con la mutación R108W en la secuencia AlbuAb. Esta mutación hace al clon ν kappa AlbuAb más resistente para tratamiento con tripsina cuando se presenta en fagos. Esto es debido a que el residuo de arginina en el carboxi terminal del dAb que enlaza el anticuerpo de dominio a la proteína pIII es sensible a la tripsina. La mutación en este sitio remueve el sitio de digestión de tripsina, y mejora la dirección de selecciones de proteasa a la región deseada del péptido diana. Por lo tanto, dos lotes de fago, con o sin la mutación R108W en AlbuAb, se usaron fácilmente en la segunda ronda de selección.

- 20 El fago se trató con las proteasas tripsina o quimiotripsina a diferentes concentraciones o se dejó sin tratar antes de la incubación con receptor de 1 hr a temperatura ambiente. Los títulos de la 2ª. selección (ϕ /ml) se presentan en la siguiente tabla.

Φ	Proteasa	Entrada	Sin proteasa	1 μ g/ml	10 μ g/ml
DAT-X c+	α -quimiotripsina	2×10^{10}	7×10^6	4×10^5	$< 1 \times 10^4$
R108W c+	tripsina	2×10^{10}	6×10^7	3×10^6	4×10^4
Lib 1-18	α -quimiotripsina	2×10^{11}	3×10^8	2×10^6	3×10^4
R108W	tripsina	1×10^{12}	1×10^8	1×10^7	3×10^6

Las salidas de fago de cada selección (0 µg/ml-10 µg/ml) fueron amplificadas por inoculación de 50 microlitros de abastecimiento de glicerol en 50 mililitros de 2xTY con Tet y cultivo durante la noche, 20 hr a 37°C con agitación. El fago purificado se usó para la tercera ronda de selección, con las mismas condiciones de incubación.

5 Los títulos de la 3ª. selección (ϕ/ml) se presentan en las siguientes tablas.

Φ 2ª. con concentración	Entrada	α-quimiotripsina		
		Sin proteasa	1 µg/ml	10 µg/ml
Lib 1-18_Sin proteasa	1x10 ¹⁰	7x10 ⁸	5x10 ⁴	~1x10 ²
Lib 1-18_1 µg/ml	1x10 ¹⁰	8x10 ⁷	5x10 ⁴	~1x10 ³
Lib 1-18_10 µg/ml	1x10 ¹⁰	2x10 ⁸	1x10 ⁶	1x10 ⁴
Control DAT-X	1x10 ¹⁰	5x10 ⁶	6x10 ⁴	ND

Φ 2ª. con concentración	Entrada	Tripsina		
		Sin proteasa	1 µg/ml	10 µg/ml
Lib 1-18 R108W_Sin proteasa	2x10 ¹¹	2x10 ⁹	1x10 ⁷	1x10 ⁶
Lib 1-18 R108W_1 µg/ml	1x10 ¹¹	5x10 ⁸	1x10 ⁷	2x10 ⁵
Lib 1-18 R108W_10 µg/ml	1x10 ¹¹	7x10 ⁷	1x10 ⁷	1x10 ⁶
Control DAT-X R108W	3x10 ¹⁰	1x10 ⁷	1x10 ⁷	3x10 ⁴

10 Debido a que la diversidad de clones ya ha disminuido después de la 3ª ronda, como se verificó por secuenciación de colonia de un conjunto de clones representativos, unos cuantos clones de salidas de selección se expresaron como proteínas solubles como se detalla más adelante.

Salidas de selección de colecciones de presentación de fagos DAT-X

15 Varias variantes de *GLP-1 se escogieron para ser clonadas como una fusión con AlbuAb pero con enlazadores alternativos como se describe más adelante, expresados, purificados y probados en la prueba de receptor de GLP-1. Sus secuencias de aminoácidos se exponen como secuencias de 1-10 (véase figura 1). Una variante de secuencia de *GLP-1 (secuencia 7) estuvo presente abundantemente en salidas de selecciones con tratamiento tanto de quimotripsina como de tripsina y como una fusión es denominada DMS7149, dos estaban presentes en salidas cuando la quimotripsina se usó (DMS7150 (secuencia 8) y 51 (secuencia 9)), una se observó en las salidas en donde sólo proteasas naturales actuaron en las células durante la expresión y secreción de fagos y no se usó pre-tratamiento con tripsina o quimotripsina (DMS7148 (secuencia 6)) y una se clonó para crear una desactivación de 20 sitios de digestión de tripsina (DMS7152 (secuencia 10)).

Las proteínas con las secuencias de aminoácidos 1-4 (véase figura 1) se probaron y mostraron baja potencia en relación con GLP-1 y variante DAT-X de control. La secuenciación de Edman sugirió que las proteínas fueron erróneamente procesadas.

25 La clonación se realizó al introducir mutaciones en el clon DAT-Y que comprendía *GLP-1 enlazado a DOM7h-14 por un enlazador alternativo que tenía la secuencia de aminoácidos: PSS (SEQ ID NO: 9) y secuencia de nucleótidos: CCAAGCTCG (SEQ ID NO: 10).

Se introdujeron mutaciones escogidas a la secuencia de *GLP-1 por iniciadores en PCR primaria y en la PCR de ensamble los sitios de digestión NcoI y BamHI se introdujeron en los extremos 5' y 3' respectivamente de la secuencia de fusión.

30 La PCR de ensamble fue digerida con endonucleasas de restricción en NcoI y BamHI.

El vector de expresión pDOM35 se preparó para clonación.

El vector pDOM35 es un derivado de pET12a con modificaciones:

- Los últimos tres residuos de péptido de señal OmpT se cambiaron de SFA a AWA, que mejora el procesamiento en el sitio correcto por la peptidasa de señal de *E. coli*.

- El sitio NcoI fue introducido para facilitar la clonación directa después del péptido de señal.
- Una “secuencia de relleno” está presente entre el sitio NcoI y BamHI.

5 pDOM35 fue digerido con NcoI y BamHI y las PCRs de ensamble de corte fueron ligadas en el vector con el uso del kit Quick Ligation Kit (NEB). 2 microlitros de ligación se usaron para transformación de células MachI y después de la recuperación de células se colocaron sobre placas de agar que contenían carbenicilina y se hicieron crecer durante la noche. Las colonias fueron secuenciadas y las que contenían secuencias correctas se usaron para propagación de plásmido y su aislamiento (Plasmid Mini Prep kit, Qiagen). Células BL21 (DE3) fueron transformadas con ADN de plásmido y las colonias resultantes se usaron para inoculación de cultivo de expresión.

10 La expresión se realizó por inoculación de un cultivo de 50 mililitros de medio 2xTY complementado con soluciones de autoinducción Overnight Express™ (1 mililitro de solución 1 (Cat. No. 71298), 2,5 mililitros de solución 2 (Cat. No. 71299), 50 microlitros de solución 3 (Cat.No 71304), Novagen) y 100 microgramos por mililitro de carbenicilina. El cultivo se llevó a cabo durante la noche a 37°C, y después el sobrenadante de cultivo se aclaró por centrifugación a 3700xg durante 45 minutos. La proteína expresada fue después purificada del sobrenadante aclarado usando línea de flujo de proteína L (GE Healthcare, Cat.No. 28-4058-03, proteína L acoplada), y se eluyó a partir de la proteína L usando glicina 0.1M, pH 2.0, después se neutralizó usando 0.2 volúmenes de Tris 1M pH 8.0.

15 La porción de variante *GLP-1 de DMS7148 se clonó después como DMS7161 de fusión (secuencia 11) con albudab de afinidad más alta, DOM7h-14-10, y se conectó por el enlazador de PSS alternativo, en el pDOM35 como se describió anteriormente.

DOM7h-14-10

20 Secuencia de aminoácidos (SEQ ID NO: 22):

DIQMTQSPSSLSASVGDRVITICRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

Secuencia de nucleótidos (SEQ. ID NO:23):

GACATCCAGATGACCCAGTCTCCATCCTCCCTGTCTGCATCTGTAGGAGACC
GTGTCACCATCACTTGCCGGGCAAGTCAGTGGATTGGGTCTCAGTTATCTTG
GTACCAGCAGAAACCAGGGAAAGCCCCTAAGCTCCTGATCATGTGGCGTTC
CTCGTTGCAAAGTGGGGTCCCATCACGTTTCAGTGGCAGTGGATCTGGGAC
AGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTCTGCAACCTGAAGATTTTGCTACGTAC
TACTGTGCTCAGGGTTTGAGGCATCCTAAGACGTTTCGGCCAAGGGACCAAG
GTGGAAATCAAACGG

25 Después de que el ADN del plásmido pDOM35 que comprende la secuencia de DMS7161 fue transformado en BL21(DE3), el abastecimiento de glicerol se preparó a partir de colonias de crecimiento, raspando colonias en un medio mínimo con glucosa y mediante la adición de glicerol, concentración final de aproximadamente 15%. La expresión de DMS7161 se inicio por inoculación del glicerol de medio mínimo (DMS7161 A) complementado en extracto de levadura para concentración final de 10 g/litro (DMS7161 B) para obtener la densidad de cultivo inicial de DO600=0.024. El cultivo se hizo crecer a DO600 de aproximadamente 1.4 a 30°C, después fue inducido por la adición de 0.1 mM isopropil-beta-d-tiogalactósido. El cultivo se continuó durante 24 horas adicionales a 23°C y después el sobrenadante de cultivo fue aclarado por centrifugación a 3700xg por 45 minutos. La proteína expresada fue purificada después a partir del sobrenadante aclarado usando proteína L, y se eluyó de la proteína L (GE Healthcare, Cat.No. 28-4058-03, acoplada a la proteína L) usando 0.1M de glicina pH 2.0, después neutralizado usando 2.0 volúmenes de Tris 1M, pH 8.0.

35 Control de calidad de DMS7148-52

40 Las proteínas DMS7148-52 fueron expresadas y visualizadas sobre SDS-PAGE no reductor, los clones DMS7148 y DMS7161 fueron expresados en *E. coli* con la mayor parte del material migrando al tamaño esperado (figuras 2, 3 y 4). La espectroscopía de masa (figuras 5A-5F) y análisis de secuenciación de Edman confirmaron la integridad de la secuencia. Todas las otras proteínas fueron degradadas en el sitio de amino y carboxilo de 25-triptofano (productos 24-142 y 26-142, respectivamente) en donde DMS7148 contenía mutación de W25-D y el ácido aspártico no creo un sitio de digestión para la proteasa natural que actúa en células de *E. coli* (figuras 5A a 5F). El producto de degradación 28-142 también se observó en los clones restantes.

La proteína DMS7148 se probó en actividad por una prueba de unión a receptor de GLP-1 de acuerdo con el siguiente protocolo:

5 Antecedentes: GLP-1R es un receptor acoplado a proteína G de 7TM que se expresa en células CHO. La activación del receptor por GLP-1 o dichos análogos, conduce a la conversión de ATP a AMPc por adenilato ciclasa que es acoplada al receptor. Células CHO son establemente transfectadas con gen reportero de 6CRE/luc. Durante la producción de AMPc después de activación de GLP-1 del receptor, el gen promotor (que contenía seis copias del elemento de respuesta a AMPc -6CRE) impulsa la expresión del gen reportero de luciferasa. Este después cataliza una reacción con luciferina para producir luz que se puede medir en un luminómetro.

10 Protocolo: células CHO 6CRE GLP-1R (células CHO KI establemente transfectadas con seis elementos de respuesta a AMPc que impulsa un gen reportero de luciferasa y también con receptor de GLP-1 humano) se sembraron a 2×10^5 células/ml en medio de suspensión. El cultivo de suspensión se mantuvo durante 48 horas. Las células después se diluyeron en 15mM de HEPES, 2 mM de L glutamina ($2,5 \times 10^5$ células/ml) y se suministraron a placas de 384 pozos que contenían 10 ul/pozo del compuesto para ser analizados. Después de la adición de controles de prueba, las placas regresaron a la incubadora durante 3 horas a 37°C y 5% de CO₂. Después de la incubación, el sustrato de luciferasa constante (Promega) se añadió a los pozos como se describe en el Kit y las placas se sellaron con sellos de placa autoadhesivos (Weber Marking Systems Inc. Cat. No. 607780). Las placas se colocaron en el lector (Packard TopCount) y se pre-incubaron durante 5 minutos antes de leer la fluorescencia y graficar los resultados. El compuesto se probó a un intervalo de curva de concentraciones-respuesta para ser ajustada a partir de la cual se calcularon pC50s.

20 Se encontró que la proteína DMS7148 era activa, sin embargo menos activa que el péptido GLP-1 (figura 6 y resumido a continuación):

Molécula	pEC50	% de respuesta máxima
DMS 7148	9.45	107
GLP 7-36	11.92	97

DMS7161 se probó para que se manifieste la actividad en una prueba de GLP-1 de acuerdo con el siguiente protocolo:

25 Método

Células CHO 6CRE GLP-1R fueron descongeladas rápidamente por inmersión a la mitad de los frascos en un baño de agua a 37°C, y los contenidos de los frascos fueron transferidos a un tubo falcon de 50 ml y 10 ml de medio de prueba RPMI (libre de rojo de fenol) (Sigma, cat# RI 509) + 2mM L-glutamina (Gibco, cat # 25030) + 15 mM de HEPES (Sigma, cat # H0887) añadido por frasco. Después de contar y centrifugar a 1200 rpm por 5 minutos las células se resuspendieron en un volumen apropiado de medio de prueba RPMI para dar 1×10^6 células por ml y 50 µl suministradas en cada pozo de una placa de cultivo de tejido de fondo plano de 96 pozos (placa de cultivo de tejido de 96 pozos Costar, estéril blanca, cat # 3917). Las células se incubaron durante la noche a 37C/5%CO₂. El día siguiente las células fueron removidas de la incubadora y 50 µl de control/muestra previamente preparados se añadió a los pozos y la placa se regresó a la incubadora durante 3 horas a 37°C y 5% CO₂.

35 Preparación de control de GLP-1 (7-36) (Sigma, cat # G814)

En una placa de 96 pozos con fondo en V y 2 µl de 1 mg/ml GLP-1 (7-36) a 18 µl de medio de prueba RPMI para dar una solución 30 µM. Se añadieron 2 µl de la solución 30 µM a 298 µl de medio de prueba RPMI para dar una solución 200 nM (para una concentración final en la prueba de 100 nM). Se diluyó en serie el control 1:10 a la placa (15 µl de control + 135 µl de medio de prueba RPMI) para generar curva de 8 puntos.

40 Preparación de control de Exendina-4 (Sigma, cat #E7144)

En una placa de 96 pozos con fondo en V se añaden 2 µl de 1 mg/ml Exedina-4 a 188 µl a medio de prueba RPMI para dar una solución 2.39 µM. Se añadieron 2 µl de la solución 2.39 µM a 237 µl de medio de prueba RPMI para dar una solución 20 nM (para una concentración final en la prueba de 10 nM). Se diluye en serie el control 1:10 a la placa (15 µl de control + 135 µl de medio de prueba RPMI) para generar curva de 8 puntos.

45 Preparación de muestras desconocidas

Se usan los mismos lineamientos para la preparación de los controles para la preparación de las muestras desconocidas. Se hacen concentraciones superiores a dos veces la concentración de prueba final requerida y se diluyen 1:10 en la placa.

Preparación de luciferasa (Promega, cat # E2620)

50 Se remueve el número requerido de alícuotas de luciferasa Bright-Glo del congelador y se dejan descongelar hasta temperatura ambiente en la oscuridad. Un frasco de 5 ml es suficiente para una placa de prueba.

5 Después del tiempo de incubación, 50 µl de reactivo de luciferasa Bright-Glo se añadió a los pozos y la placa se incubó a temperatura ambiente durante tres minutos para permitir que ocurriera la lisis de células. La luminiscencia (conteos por segundo) se leyó usando el lector de microplaca M5e registrando cada pozo durante 0.1 segundos. CPS de los pozos de fondo que contenían células únicamente, se sustrajo de los otros pozos. Los pozos de control (GLP- 1(7-36) o Exendina-4) deben presentar estimulación máxima a las concentraciones más altas. Las curvas de efecto de concentración de la muestra desconocida se ajustan a partir de las cuales EC50 se calcula con el uso de software GraphPad Prism o ExcelFit.

DMS7161 es potente con EC50 entre 1.6 y 3.4 nM como se muestra en la figura 7 y como se resume a continuación.

Ex-4	EC50 (M)	pEC50
DMS7161 A	3.6E-09	8.45
DMS7161 B	3.4E-09	8.47
	1.6E-09	8.79

Se encontró que DMS7161 es tan activo como DMS7148.

10 Exposición

La selección de fagos de fusión de péptidos diversificadas que fue naturalmente muy sensible a proteasas y se degrada durante la expresión en *E. coli* les permitió a los inventores de la presente identificar la fusión de variante de *GLP-1 que es resistente a proteasas bacterianas naturales y lo mismo es expresable en *E. coli*. Los sitios de proteasa que fueron privados en este clon son similares a estos reconocidos por tripsina y quimiotripsina, sin embargo esta secuencia no estuvo presente en las salidas de las selecciones con tratamiento con tripsina y quimiotripsina adicional.

15

Secuencia	SEQ. ID NO:
Secuencia de nucleótidos de monómero de Fc etiquetado con His de ECD GLP-1R	1
Secuencia de aminoácido de monómero de Fc etiquetado con His de ECD GLP-1R	2
Secuencia de aminoácidos de *GLP-1 (7-37)	3
Secuencia de nucleótido de *GLP-1 (7-37)	4
Secuencia de aminoácidos de DOM7h-14:	5
Secuencia de nucleótido de DOM7h-14:	6
Secuencia de aminoácidos de enlazador helicoidal:	7
Secuencia de nucleótidos de enlazador helicoidal:	8
PSS	9
Secuencia de nucleótidos de PSS:	10
DMS7190	11
DMS7191	12
DMS7192	13
DMS7193	14
DMS7194	15
DMS7148	16
DMS7149	17
DMS7150	18
DMS7151	19
DMS7152	20
DMS7161	21
Secuencia de aminoácidos de DOM7h-14-10	22
Secuencia de nucleótidos de DOM7h-14-10	23

Listado de secuencias

<110> GLAXO GROUP LIMITED
 ENEVER, Carolyn
 JESPER, Laurent
 5 PUPECKA, Malgorzata
 TOMLINSON, Ian M.

<120> Métodos para seleccionar polipéptidos resistentes a proteasa
 <130> DB00064WO

10 <150> 61/120,135
 <151>: 2008-12-05

<160> 23

15 <170> FastSEQ para Windows Versión 4.0

<210> 1
 <211> 1155
 20 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial

<400> 1

```

atggcgggcg cccccggccc gctgcgctt gcgctgctgc tgctcgggat ggtgggcagg 60
gccggcccc gcccccaggg tgccactgtg tccctctggg agacgggtgca gaaatggcga 120
gaataccgac gccagtgcca gcgctccctg actgaggatc cacctcctgc cacagacttg 180
ttctgcaacc ggaccttcga tgaatacgcc tgctggccag atggggagcc aggctcgttc 240
gtgaatgtca gctgcccctg gtacctgccc tgggccagca gtgtgccgca gggccacgtg 300
taccggttct gcacagctga aggcctctgg ctgcagaagg acaactccag cctgccctgg 360
agggacttgt cggagtgcga ggagtccaag cgaggggaga gaagctcccc ggaggagcag 420
ctcctgttcc tcaagcttga gcccaaactg gccgacaaaa ctcacacatc accaccgtca 480
ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac 540
accctcatga tctcccggac ccctgaggtc acatgcgtgg tgggtggact gagccacgaa 600
gaccctgagg tcaagttcaa ctgggtacgtg gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca 660
aagccgcggg aggagcagta caacagcagc taccgggtgg tcagcgtcct caccgtcctg 720
caccaggact ggctgaatgg caaggagtac aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca 780
gcccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac 840
accctgcccc catcccggga tgagctgacc aagaaccagg tcagcctgac ctgcctggtc 900
aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg gagtgggaga gcaatgggca gccggagaac 960
aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac tccgacggct ccttcttctc ctacagcaag 1020
ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag gggaaactct tctcatgctc cgtgatgcat 1080
gaggctctgc acaaccacta cacgcagaag agcctctccc tgtctccggg taaacatcac 1140
catcatcatc actga 1155
  
```

25 <210> 2
 <211> 384
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>

30 <400> 2

```

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

ES 2 688 621 T3

65					70					75					80
Val	Asn	Val	Ser	Cys	Pro	Trp	Tyr	Leu	Pro	Trp	Ala	Ser	Ser	Val	Pro
				85					90					95	
Gln	Gly	His	Val	Tyr	Arg	Phe	Cys	Thr	Ala	Glu	Gly	Leu	Trp	Leu	Gln
			100					105					110		
Lys	Asp	Asn	Ser	Ser	Leu	Pro	Trp	Arg	Asp	Leu	Ser	Glu	Cys	Glu	Glu
		115					120					125			
Ser	Lys	Arg	Gly	Glu	Arg	Ser	Ser	Pro	Glu	Glu	Gln	Leu	Leu	Phe	Leu
	130					135						140			
Lys	Leu	Glu	Pro	Lys	Ser	Ala	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Ser	Pro	Pro	Ser
145					150					155					160
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro
			165					170						175	
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys
			180					185						190	
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp
			195				200					205			
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu
	210					215					220				
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu
225					230					235					240
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn
				245					250					255	
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly
			260					265					270		
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu
		275					280					285			
Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr
	290					295					300				
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn
305					310					315					320
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe
				325					330					335	
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn
			340				345						350		
Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr
		355				360						365			
Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly	Lys	His	His	His	His	His	His
	370					375					380				

<210> 3

<211> 31

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<400> 3

His	Gly	Glu	Gly	Thr	Phe	Thr	Ser	Asp	Val	Ser	Ser	Tyr	Leu	Glu	Gly
1				5					10					15	
Gln	Ala	Ala	Lys	Glu	Phe	Ile	Ala	Trp	Leu	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	
			20					25					30		

<210> 4

10 <211> 93

<212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 4

catggtgaag	ggacctttac	cagtgatgta	agttcttatt	tggaaggcca	agctgccaag	60
gaattcattg	cttggctggt	gaaaggccga	gga			93

<210> 5

<211> 108

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

ES 2 688 621 T3

<400> 5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1      5      10      15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln
 20      25      30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35      40      45
Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50      55      60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65      70      75      80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg
 85      90      95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100      105

```

<210> 6

<211> 324

5 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 6

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat cttggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagattttg ctacgtacta ctgtgctcag ggtgcggcgt tgcctaggac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324

```

10 <210> 7

<211> 40

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <400> 7

```

Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys
 1      5      10      15
Glu Leu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu Ala Ala Ala Lys Glu
 20      25      30
Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala
 35      40

```

<210> 8

<211> 120

<212> ADN

20 <213> Secuencia artificial

<220>

<400> 8

```

aaagaagcgg cggcgaaaga agcggcggcg aaagaagcgg cggcgaaaga attggccgca 60
aaagaagcgg cggcgaaaga agcggcggcg aaagaagcgg cggcgaaaga attggccgca 120

```

25 <210> 9

<211> 3

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

30 <400> 9

Pro Ser Ser

1

<210> 10

<211> 9

<212> ADN

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<400> 10

ccaagctcg 9

<210> 11

10 <211> 149

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 11

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Ser Glu Glu
 1          5          10          15
Ala Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
 20          25          30
Glu Ala Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 35          40          45
Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 50          55          60
Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
 65          70          75          80
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln
 85          90          95
Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 100          105          110
Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 115          120          125
Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 130          135          140
Val Glu Ile Lys Trp
 145

```

15

<210> 12

<211> 149

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

20 <220>

<400> 12

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Gly Ala Asp Leu Leu Glu Gly
 1          5          10          15

```

ES 2 688 621 T3

Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
 20 25 30
 Glu Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 35 40 45
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 50 55 60
 Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys
 65 70 75 80
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln
 85 90 95
 Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 100 105 110
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 115 120 125
 Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys
 130 135 140
 Val Glu Ile Lys Arg
 145

<210> 13

<211> 159

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<220>

<400> 13

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ala Thr Ala Cys Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Cys Leu Val Lys Gly Arg Gly Lys
 20 25 30
 Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu
 35 40 45
 Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala
 50 55 60
 Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile
 65 70 75 80
 Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys
 85 90 95
 Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg
 100 105 110
 Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser
 115 120 125
 Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala
 130 135 140
 Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 145 150 155

<210> 14

10 <211> 154

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<400> 14

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Thr Gly Leu Glu Arg
 20 25 30
 Glu Ala Ala Lys Glu Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile
 35 40 45
 Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg

15

ES 2 688 621 T3

50 55 60
 Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser
 65 70 75 80
 Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp
 85 90 95
 Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly
 100 105 110
 Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp
 115 120 125
 Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe
 130 135 140
 Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 145 150

<210> 15
 <211> 147
 <212> PRT
 5 <213> Secuencia artificial

<220>
 <400> 15

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Phe Val Thr Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Lys Glu Ala
 20 25 30
 Ala Ala Lys Glu Leu Ala Ala Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser
 35 40 45
 Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala
 50 55 60
 Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
 65 70 75 80
 Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly
 85 90 95
 Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 100 105 110
 Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala
 115 120 125
 Gln Gly Ala Ala Leu Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
 130 135 140
 Ile Lys Trp
 145

10 <210> 16
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
 <400> 16

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Asp Leu Val Glu Gly Arg Gly Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
 115 120 125
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

15

<210> 17
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5 <220>

<400> 17

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Glu Phe Val Thr Tyr Leu Glu Gly
 1      5      10      15
Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro
      20      25      30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
      35      40      45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
      50      55      60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
      65      70      75      80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
      85      90      95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
      100      105      110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
      115      120      125
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      130      135      140
    
```

<210> 18
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10

<400> 18

```

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1      5      10      15
Met Thr Ser Arg Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Lys Gly Arg Gly Pro
      20      25      30
Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
      35      40      45
Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
      50      55      60
Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
      65      70      75      80
Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
      85      90      95
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
      100      105      110
Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
      115      120      125
Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
      130      135      140
    
```

<210> 19
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<400> 19

ES 2 688 621 T3

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Thr Gly Leu Glu Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
 115 120 125
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

<210> 20

<211> 142

<212> PRT

5 <213> Secuencia artificial

<400> 20

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Ser Glu Phe Ile Ala Trp Leu Val Val Asp Gly Gly Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Ala Ala Leu
 115 120 125
 Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

<210> 21

<211> 142

<212> PRT

10 <213> Secuencia artificial

<400> 21

His Gly Glu Gly Thr Phe Thr Ser Asp Val Ser Ser Tyr Leu Glu Gly
 1 5 10 15
 Gln Ala Ala Lys Glu Phe Ile Ala Asp Leu Val Glu Gly Arg Gly Pro
 20 25 30
 Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser
 35 40 45
 Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly
 50 55 60
 Ser Gln Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu
 65 70 75 80
 Leu Ile Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe
 85 90 95
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
 100 105 110
 Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Leu Arg His
 115 120 125
 Pro Lys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
 130 135 140

15 <210> 22

ES 2 688 621 T3

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<400> 22

5

```

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1           5           10           15
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Trp Ile Gly Ser Gln
           20           25           30
Leu Ser Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
           35           40           45
Met Trp Arg Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
           50           55           60
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
           65           70           75           80
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Gln Gly Leu Arg His Pro Lys
           85           90           95
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
           100           105
  
```

<210> 23
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Secuencia artificial

10

<400> 23

```

gacatccaga tgaccagtc tccatcctcc ctgtctgcat ctgtaggaga ccgtgtcacc 60
atcacttgcc gggcaagtca gtggattggg tctcagttat ctgggtacca gcagaaacca 120
gggaaagccc ctaagctcct gatcatgtgg cgttcctcgt tgcaaagtgg ggtcccatca 180
cgtttcagtg gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcagcag tctgcaacct 240
gaagatittg ctacgtacta ctgtgctcag ggtttgaggg atcctaagac gttcggccaa 300
gggaccaagg tggaaatcaa acgg                                     324
  
```

REIVINDICACIONES

1. Un dominio variable único de inmunoglobulina aislado que tiene la secuencia de aminoácidos expuesta en la SEQ ID NO: 22.
2. Un dominio variable único de inmunoglobulina según la reivindicación 1 para uso en medicina.
- 5 3. Una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante que codifica un dominio variable único de inmunoglobulina según la reivindicación 1.
4. Una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante según la reivindicación 3, que comprende la secuencia de ácido nucleico expuesta en la SEQ ID NO: 23.
- 10 5. Un vector que comprende una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante según la reivindicación 3 o la reivindicación 4.
6. Una célula anfitriona que comprende una molécula de ácido nucleico aislada o recombinante según la reivindicación 3 o la reivindicación 4, o un vector según la reivindicación 5.
7. Una célula anfitriona según la reivindicación 6, en la que dicha célula anfitriona es una especie de *Pichia*.

Figura 1 **FIGURE 1**

Secuencia 1 (SEQ ID NO: 11); Q ID NO: 11);

DMS7190
HGEFTFTSDVSSYSEEAAAKEFIAWLVKGRGKEAAAKELAADIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKW

Secuencia 2 (SEQ ID NO: 12); EQ ID NO: 12);

DMS7191
HGEFTFTSDGADLLEGQAAKEFIAWLVKGRGKEAAAKELAADIQMTQSPS
SLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVP
SRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR

Secuencia 3 (SEQ ID NO: 13); EQ ID NO: 13);

DMS7192
HGEFTFTSDVATACEGQAAKEFIAVLVKGRGKEAAAKEAAAKEAAAKELA
ADIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIM
WRSSLQSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFG
QGTKVEIKR

Secuencia 4 (SEQ ID NO: 14); EQ ID NO: 14);

DMS7193
HGEFTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVTGLEREAAAKEAAAKELAADIQM
TQSPSSLSASVGDRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSL
QSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKV
EIKR

Figura 1 (continuación)

Secuencia 5 (SEQ ID NO: 15);

Sequence 5 (SEQ ID NO: 15);

DMS7194

HGEGTFTSEFVTYLEGQAAKEFIAWLVKGKEAAAKELAADIQMTQSPSSL
SASVGDRTTTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSR
FSGSGSGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKW

Secuencia 6 (SEQ ID NO: 16);

Sequence 6 (SEQ ID NO: 16);

DMS7148

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIADLVEGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Secuencia 7 (SEQ ID NO: 17);

Sequence 7 (SEQ ID NO: 17);

DMS7149

HGEGTFTSEFVTYLEGQAAKEFIAWLVKGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Secuencia 8 (SEQ ID NO: 18);

Sequence 8 (SEQ ID NO: 18);

DMS7150

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIADLVEGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Secuencia 9 (SEQ ID NO: 19);

Sequence 9 (SEQ ID NO: 19);

DMS7151

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIAWLVGLEPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVTITCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFSGSG
SGTDFLTISLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Figura 1 (continuación)

Secuencia 10 (SEQ ID NO: 10);

sequence 10 (SEQ ID NO: 20);

DMS7152

HGEGTFTSDVSSYLEGQAASEFIAWLVDGGPSSDIQMTQSPSSLSASVG
DRVITTCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFGSG
SGTDFLTISSLQPEDFATYYCAQGAALPRTFGQGTKVEIKR1

Secuencia 11 (SEQ ID NO: 21);

Sequence 11 (SEQ ID NO: 21);

DMS7161

HGEGTFTSDVSSYLEGQAAKEFIADLVEGRGPSSDIQMTQSPSSLSASVGDRVIT
TCRASQWIGSQLSWYQQKPGKAPKLLIMWRSSLQSGVPSRFGSGSGTDFLTISS
LQPEDFATYYCAQGLRHPKTFGQGTKVEIKR

Figura 2

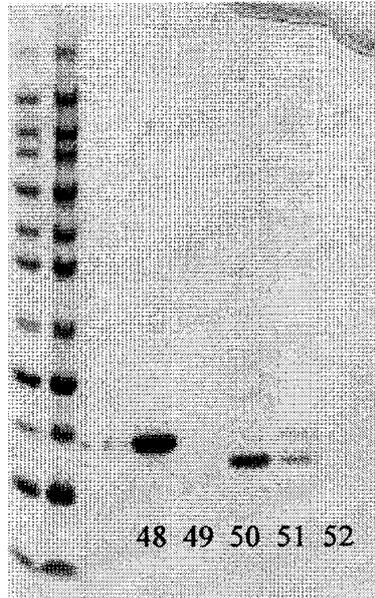


Figura 3

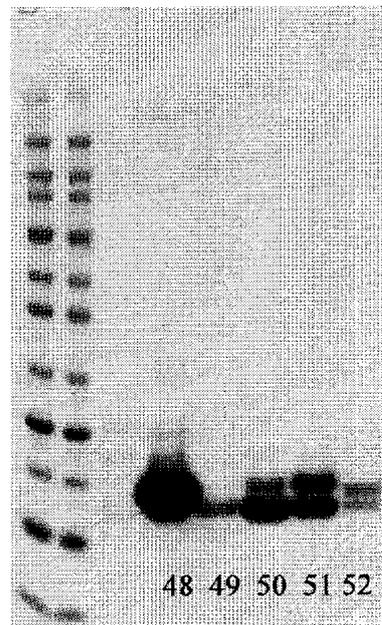


Figura 4

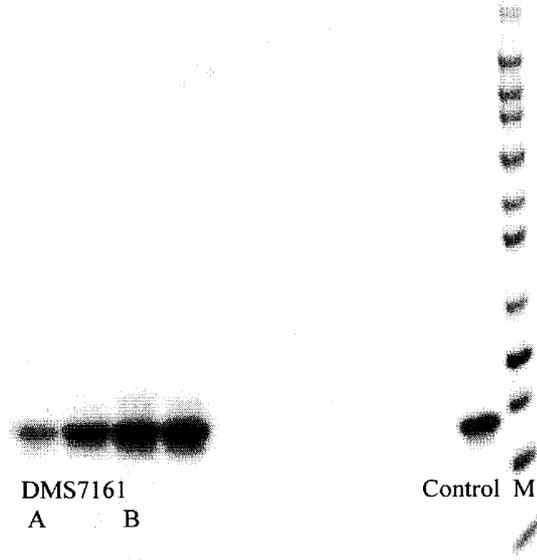


Figura 5

a) DMS7148 (Variante 6)

ID pico	Compuesto encontrado	Tiempo encontrado	Masa Encontrada
1		4.27	15246.00

Se integra (Ht); MaxEnt 1; Se combina (250:268)

1: TOF MS ES+
2.6e+004

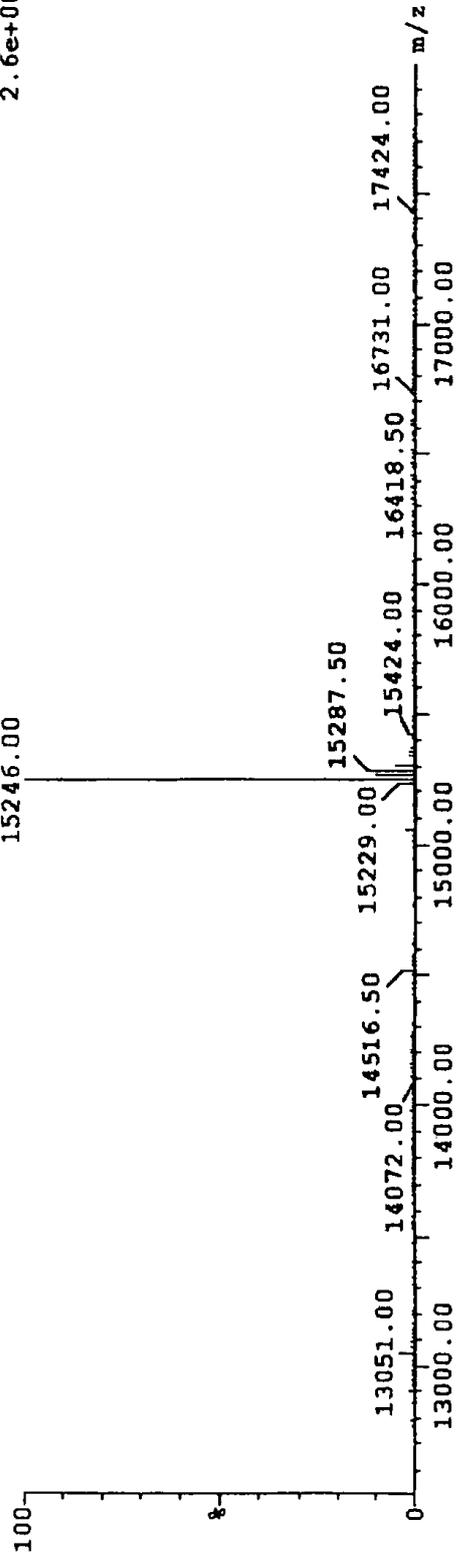


Figura 5 cont.

b) DMS7149 (Variante 7)
ID pico Compuesto Tiempo Masa Encontrada
1 encontrado 4.07 12391.00

Se integra (Ht); MaxEnt 1; Se combina (238:256)

1: TOF MS ES+
1.0e+004

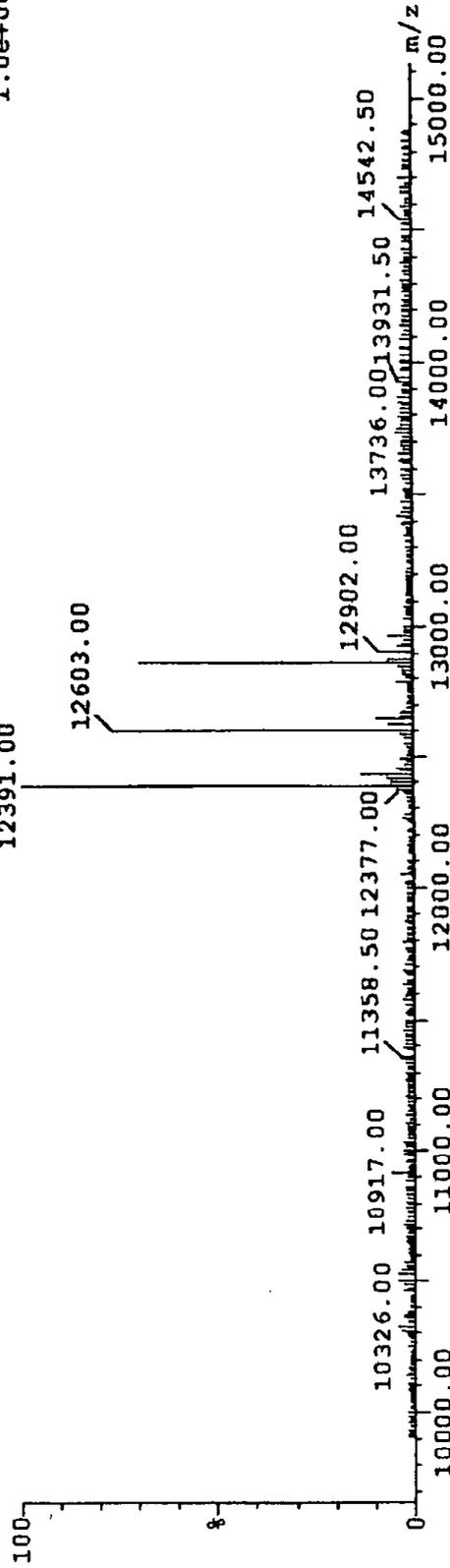


Figura 5 cont.

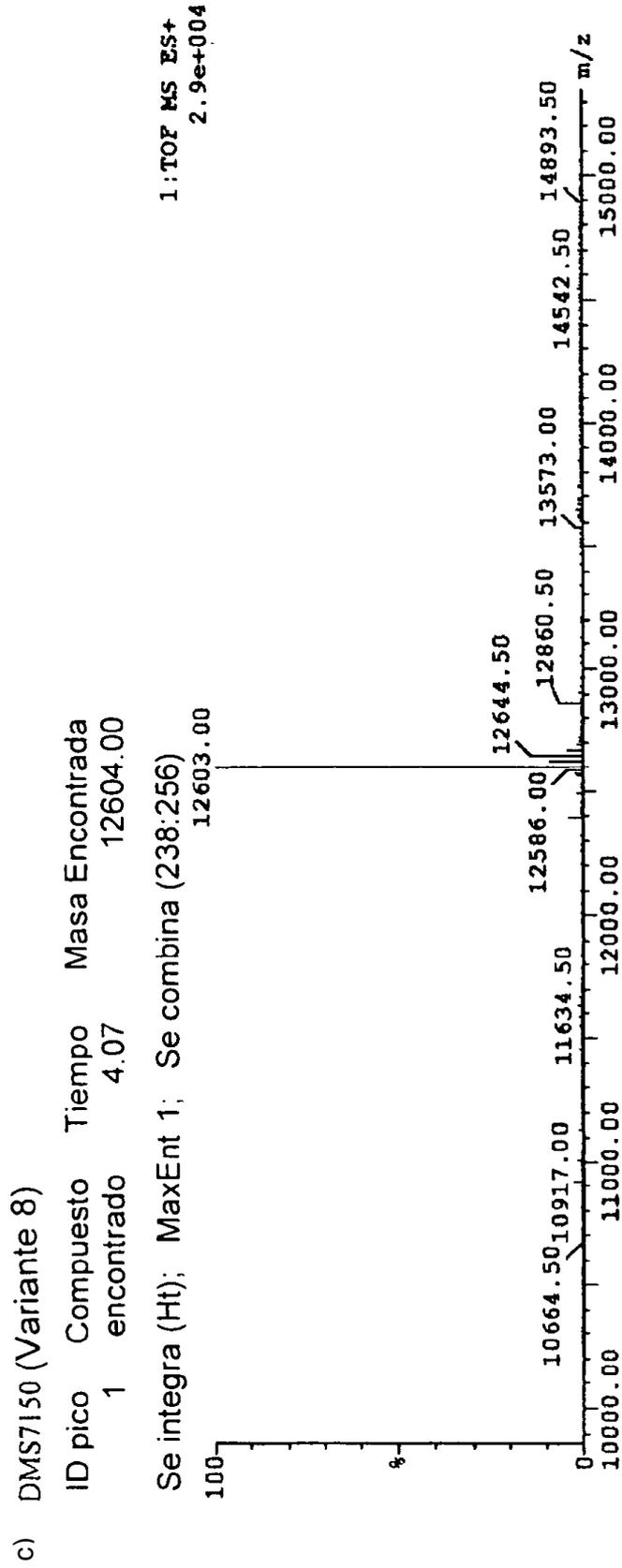


Figura 5 cont.

d) DMS7151 (Variante 9)

ID pico	Compuesto encontrado	Tiempo encontrado	Masa Encontrada
1	encontrado	4.08	12604.00

Se integra (Ht); MaxEnt 1; Se combina (239:257)

1:TOF MS ES+
1.8e+004

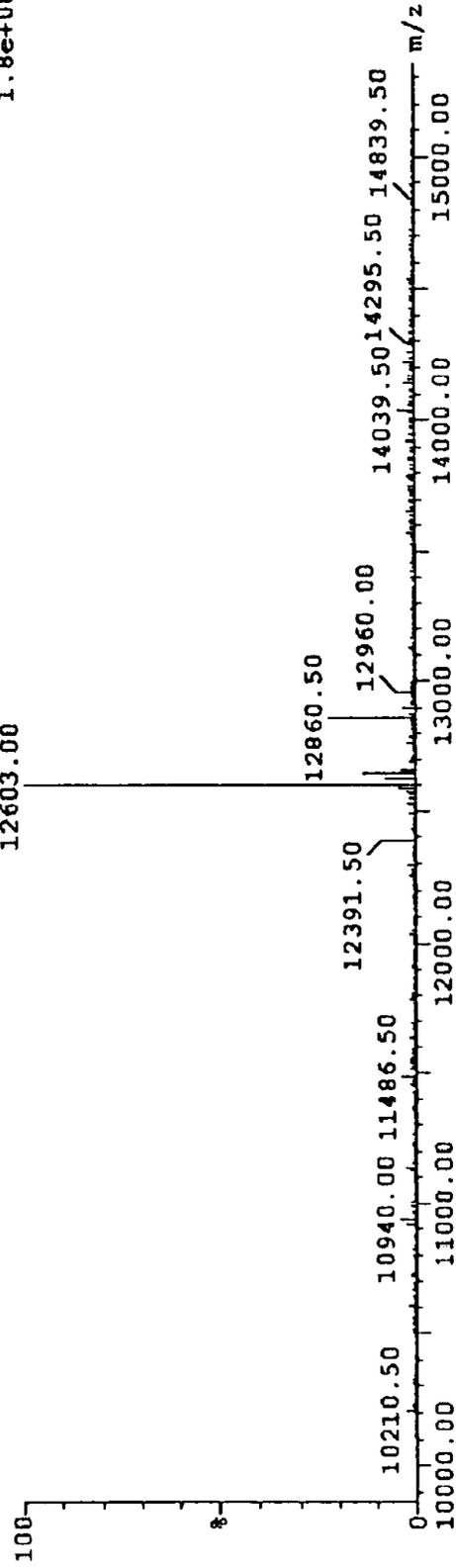


Figura 5 cont.

e) DMS7152 (Variante 10)

ID pico	Compuesto	Tiempo encontrado	Masa Encontrada
1		4.18	12321.00

Se integra (Ht); MaxEnt 1; Se combina (245:253)

1: TOP MS ES+
9.8e+003

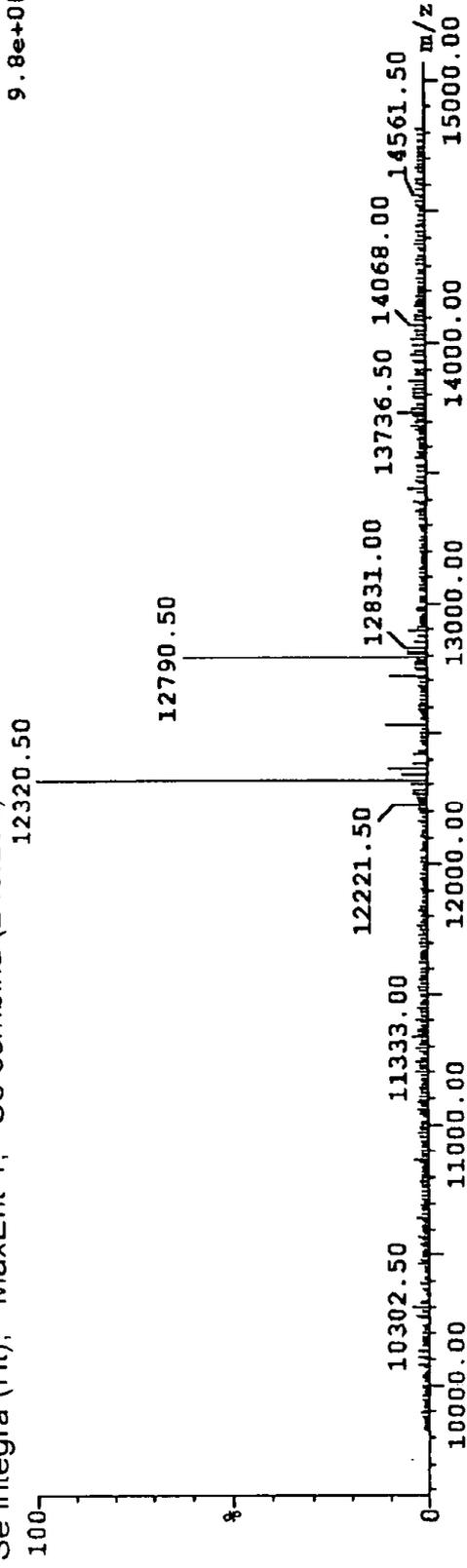


Figura 5 cont.

f) DMS7161 (Variante 11)

ID pico	Compuesto encontrado	Tiempo encontrado	Masa Encontrada
1	1 encontrado	4.08	15368.00

Se integra (Ht): MaxEnt 1; Se combina (239:257)

1:TOF MS ES+
1.3e+004

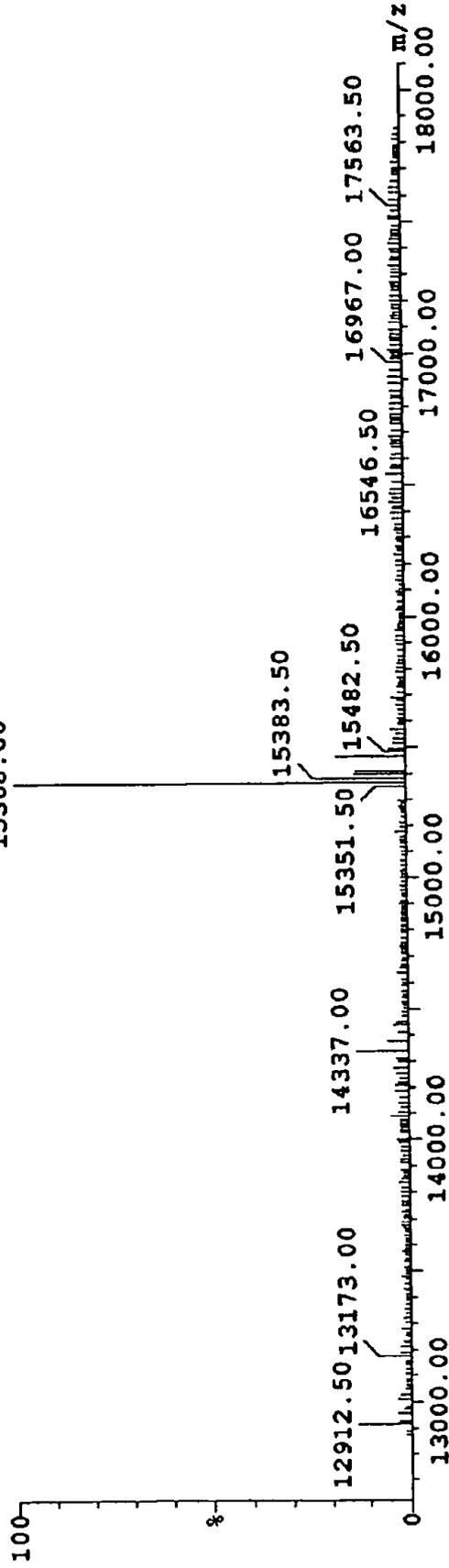


Figura 6

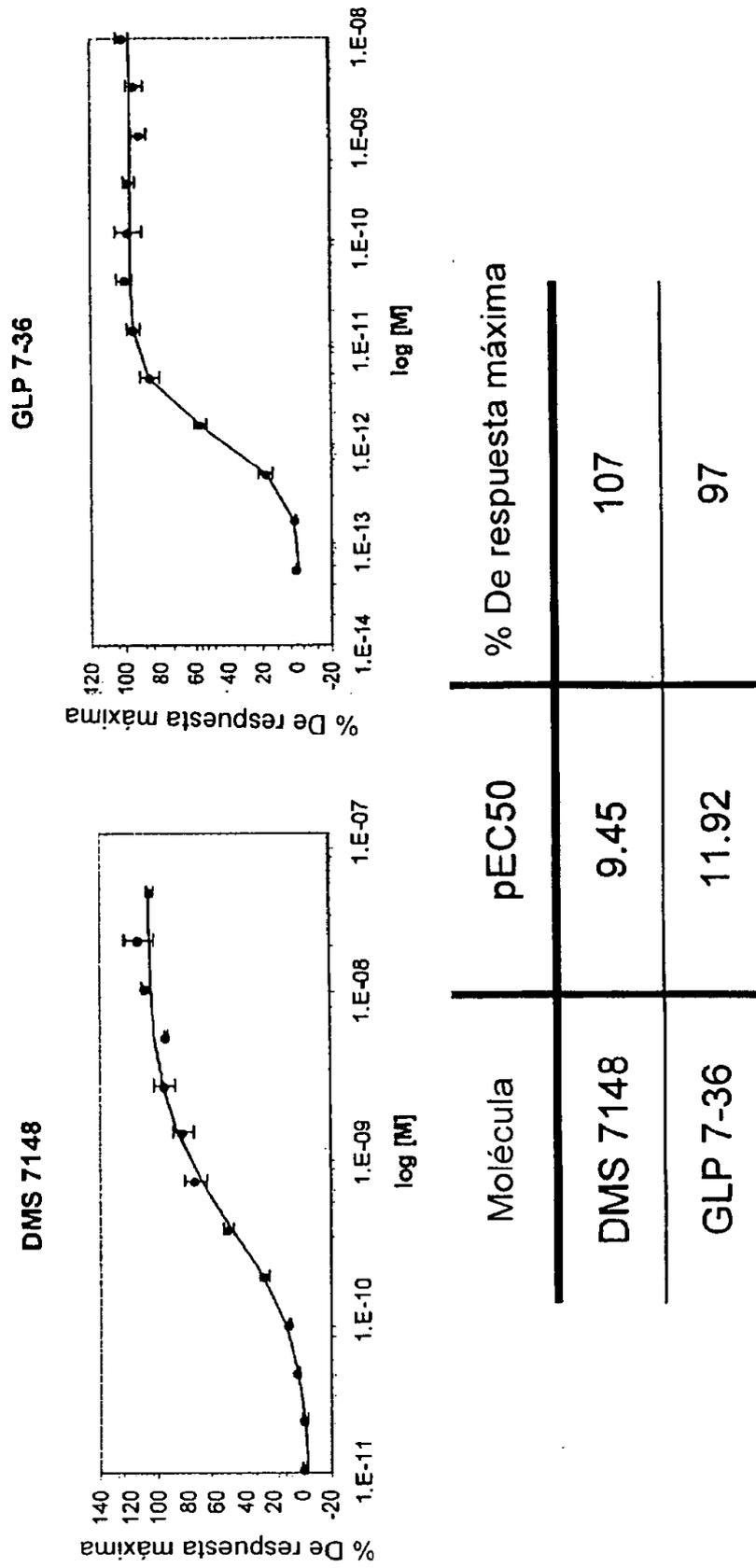


Fig. 7

Estimulación de GLP-1/Ex-4 en células CHO
prueba de unión de DAT01 -081128RDP

