



19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA

11 Número de publicación: **2 329 959**

51 Int. Cl.:
G01N 33/536 (2006.01)
C07K 14/00 (2006.01)
C12N 15/00 (2006.01)
C12N 15/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Número de solicitud europea: **99967261 .1**
96 Fecha de presentación : **09.12.1999**
97 Número de publicación de la solicitud: **1137941**
97 Fecha de publicación de la solicitud: **04.10.2001**

54 Título: **Armazones de proteína para miméticos de anticuerpo y otras proteínas de unión.**

30 Prioridad: **10.12.1998 US 111737 P**

45 Fecha de publicación de la mención BOPI:
02.12.2009

45 Fecha de la publicación del folleto de la patente:
02.12.2009

73 Titular/es: **Bristol-Myers Squibb Company**
Route 206 and Province Line Road
Princeton, New Jersey 08543-4000, US

72 Inventor/es: **Lipovsek, Dasa**

74 Agente: **Carpintero López, Mario**

ES 2 329 959 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

Armazones de proteína para miméticos de anticuerpo y otras proteínas de unión.

5 **Antecedentes de la invención**

Esta invención se refiere a armazones proteicos útiles, por ejemplo, para la generación de productos que tienen características de unión novedosas.

10 Las proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, designadas normalmente como armazones proteicos, pueden usarse como reactivos para el diseño de productos modificados por ingeniería genética. Estos armazones contienen típicamente una o más regiones que son susceptibles de variación de secuencia específica o aleatoria, y dicha aleatorización de secuencia se lleva a cabo a menudo para producir colecciones de proteínas de las que pueden seleccionarse los productos deseados. Un área particular en la que son útiles dichos armazones es en el campo del diseño de anticuerpos.

Se han intentado una serie de enfoques anteriores para la manipulación del sistema inmunitario de mamíferos para obtener reactivos o medicamentos. Estos han incluido inyectar a animales antígenos de interés para obtener mezclas de anticuerpos policlonales reactivos frente a antígenos específicos, la producción de anticuerpos monoclonales en cultivo celular de hibridoma (Koehler y Milstein, *Nature* 256: 495, 1975), la modificación de anticuerpos monoclonales existentes para obtener propiedades de reconocimiento nuevas u optimizadas, la creación de fragmentos de anticuerpo novedosos con características de unión deseables y la aleatorización de anticuerpos monocatenarios (creados conectando las regiones variables de las cadenas pesada y ligera de moléculas de anticuerpo con un engarce peptídico flexible), seguido de selección de la unión a antígeno mediante exposición en fago (Clackson *et al.*, *Nature* 352: 624, 1991).

Además, se han propuesto varios armazones proteicos no de inmunoglobulina para obtener proteínas con propiedades de unión novedosas. Por ejemplo, se ha diseñado un armazón de "minicuerpo", que está relacionado con el plegamiento de inmunoglobulina, eliminando tres cadenas beta de un dominio variable de cadena pesada de un anticuerpo monoclonal (Tramontano *et al.*, *J. Mol. Recognit.* 7: 9, 1994). Esta proteína incluye 61 residuos y puede usarse para presentar dos bucles hipervariables. Estos dos bucles se han aleatorizado y los productos se han seleccionado por unión a antígeno, pero hasta ahora la estructura parece tener una utilidad algo limitada debido a problemas de solubilidad. Otra estructura usada para exponer bucles ha sido el tendamistato, un sándwich de láminas beta de 6 cadenas de 74 residuos mantenidas juntas por dos enlaces disulfuro (McConnell y Hoess, *J. Mol. Biol.* 250: 460, 1995). Este armazón incluye tres bucles pero, hasta la fecha, sólo se ha examinado en dos de estos bucles el potencial de aleatorización.

Se han ensayado otras proteínas como marcos estructurales y se han usado para exponer residuos aleatorizados en superficies de hélice alfa (Nord *et al.*, *Nat. Biotechnol.* 15: 772, 1997; Nord *et al.*, *Protein Eng.* 8: 601, 1995), bucles entre hélices alfa en haces de hélices alfa (Ku y Schultz, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 6552, 1995) y bucles limitados por puentes disulfuro, tales como aquellos de inhibidores de proteasa pequeños (Markland *et al.*, *Biochemistry* 35: 8045, 1996; Markland *et al.*, *Biochemistry* 35: 8058, 1996; Rottgen y Collins, *Gene* 164: 243, 1995; Wang *et al.*, *J. Biol. Chem.* 270: 12250, 1995).

45 **Sumario de la invención**

La presente invención proporciona una nueva familia de proteínas capaces de evolucionar para unirse a cualquier compuesto de interés. Estas proteínas, que hacen uso de una fibronectina o armazón similar a fibronectina, funcionan de manera característica de los anticuerpos naturales o modificados por ingeniería genética (es decir, anticuerpos policlonales, monoclonales o monocatenarios) y, además, poseen ventajas estructurales. Específicamente, la estructura de estos miméticos de anticuerpo se ha diseñado para un plegamiento, estabilidad y solubilidad óptimos, incluso en condiciones que normalmente conducen a la pérdida de estructura y función en anticuerpos.

Estos miméticos de anticuerpo pueden utilizarse con el fin de diseñar proteínas que sean capaces de unirse virtualmente a cualquier compuesto (por ejemplo, cualquier proteína) de interés. En particular, las moléculas basadas en fibronectina descritas en la presente memoria pueden usarse como armazones que se someten a una evolución dirigida diseñada para aleatorizar uno o más de los tres bucles de fibronectina que son análogos de las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de una región variable de anticuerpo. Dicho enfoque de evolución dirigida da como resultado la producción de moléculas similares a anticuerpo con altas afinidades por los antígenos de interés. Además, los armazones descritos en la presente memoria pueden usarse para exponer bucles expuestos definidos (por ejemplo, bucles previamente aleatorizados y seleccionados basándose en la unión a antígeno) para dirigir la evolución de moléculas que se unen a dichos bucles introducidos. Puede llevarse a cabo una selección de este tipo para identificar a moléculas de reconocimiento de cualquier bucle similar a CDR individual o, como alternativa, para el reconocimiento de dos o los tres bucles similares a CDR combinados en un epítopo no lineal.

En consecuencia, la presente invención se refiere a una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una más alteraciones

ES 2 329 959 T3

de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno. Más específicamente, la presente invención se refiere a una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) en el que la secuencia de aminoácidos de cada uno del bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

Las proteínas de la invención se caracterizan por su capacidad de unirse a un compuesto que no se une a la fibronectina correspondiente de origen natural.

En dichas proteínas, la unión a compuesto está preferiblemente mediada por uno, dos o los tres bucles de ¹⁰F_n3. En otras realizaciones preferidas, el segundo bucle de ¹⁰F_n3 puede extenderse en longitud respecto al módulo de origen natural.

En consecuencia, la presente invención se refiere también a una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, y en la que el bucle DE de dicho ¹⁰F_n3 se extiende en longitud respecto del ¹⁰F_n3 humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

En otras realizaciones preferidas, el ¹⁰F_n3 puede carecer de un motivo de unión a integrina. En estas moléculas, el motivo de unión a integrina puede reemplazarse por una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia de aminoácido básico-aminoácido neutro-aminoácido ácido (en la dirección N-terminal a C-terminal) reemplaza al motivo de unión a integrina; es una secuencia preferida la serina-glicina-glutamato. Particularmente, si carecen de un dominio de unión a integrina, las proteínas de la invención pueden formularse en un vehículo fisiológicamente aceptable. En otra realización preferida, las proteínas de la invención carecen de puentes disulfuro.

Cualquiera de las proteínas descritas en la presente memoria puede formularse como parte de una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión que incluye adicionalmente un dominio Fc de inmunoglobulina, una proteína de complemento, una proteína toxina o una proteína albúmina).

En consecuencia, la presente invención se refiere también a una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, una proteína de complemento, una proteína toxina o una proteína albúmina y una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

Además, cualquiera de las proteínas de la invención puede estar unida covalentemente a un ácido nucleico (por ejemplo, un ARN), y el ácido nucleico puede codificar la proteína.

En consecuencia, la presente invención se refiere también a una proteína de fusión que comprende un ácido nucleico unido covalentemente a una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

Además, la proteína puede ser un dímero o un multímero.

En consecuencia, la presente invención se refiere también a un dímero o multímero de una proteína similar a anticuerpo en el que la proteína similar a anticuerpo comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando caracterizada dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

La presente invención caracteriza también proteínas que incluyen un dominio de fibronectina de tipo III que tiene al menos una mutación en una secuencia de lámina β que cambia la estructura del armazón. De nuevo, estas proteínas se caracterizan por su capacidad de unirse a compuestos que no se unen a la fibronectina de origen natural correspondiente.

En un aspecto relacionado, la invención caracteriza adicionalmente ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las proteínas de la invención. En realizaciones preferidas, el ácido nucleico es ADN o ARN.

ES 2 329 959 T3

En otro aspecto relacionado, la invención caracteriza también un procedimiento para generar una proteína de la invención que es farmacéuticamente aceptable para un mamífero, que implica retirar el dominio de unión a integrina de dicho dominio de fibronectina de tipo III. Este procedimiento puede aplicarse a cualquiera de las proteínas descritas anteriormente y es particularmente útil para generar proteínas para aplicaciones terapéuticas humanas. La invención
5 caracteriza también dichas proteínas que carecen de dominios de unión a integrina.

En aún otros aspectos relacionados, la invención caracteriza procedimientos de cribado que pueden usarse para obtener o hacer evolucionar proteínas de fibronectina de tipo III aleatorizadas capaces de unirse a compuestos de interés, o para obtener o hacer evolucionar compuestos (por ejemplo proteínas) capaces de unirse a una proteína particular que contiene un motivo de fibronectina de tipo III aleatorizado. Además, la invención caracteriza procedimientos de cribado que combinan estos dos procedimientos, en cualquier orden, para obtener compuestos o proteínas de interés.
10

En particular, el primer procedimiento de cribado útil para el aislamiento o la identificación de proteínas aleatorizadas de interés implica: (a) poner en contacto el compuesto con una proteína candidata, incluyendo la proteína candidata un dominio de fibronectina de tipo III que tiene al menos un bucle aleatorizado, llevándose a cabo el contacto en condiciones que permitan la formación de un complejo de compuesto-proteína; y (b) obtener, a partir del complejo, la proteína que se une al compuesto.
15

En consecuencia, la presente invención se refiere también a un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo como se define anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento:
20

(a) aleatorizar al menos un bucle seleccionado del grupo compuesto por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos del bucle comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural;
25

(b) poner en contacto un antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;
30

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.
35

Más específicamente, la presente invención se refiere también a un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo como se define anteriormente, comprendiendo dicho procedimiento:
40

(a) aleatorizar el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos de cada uno de los bucles comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural;
45

(b) poner en contacto un antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.
50

Como alternativa, dicho procedimiento comprende:

(a) aleatorizar al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG y extender el bucle DE en longitud de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos de cada uno de los bucles comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural y en el que el bucle DE de dicho ¹⁰F_n3 está extendido en longitud respecto del ¹⁰F_n3 de origen natural;
55

(b) poner en contacto un antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;
60

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.
65

ES 2 329 959 T3

En una realización particular, la presente invención comprende un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo que se une a un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento:

- 5 (a) aleatorizar al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos del bucle comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, en el que cada proteína está unida covalentemente a un ácido nucleico que codifica la proteína;
- 10 (b) poner en contacto dicho antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;
- (c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y
- 15 (d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.

El segundo procedimiento de cribado, para aislar o identificar un compuesto que se une a una proteína de la invención, implica: (a) poner en contacto la proteína con un compuesto candidato, llevándose a cabo el contacto en condiciones que permitan la formación de un complejo de compuesto-proteína; y (b) obtener, a partir del complejo, el compuesto que se une a la proteína.

En realizaciones preferidas, los procedimientos implican adicionalmente aleatorizar al menos un bucle del dominio de fibronectina de tipo III de la proteína obtenida en la etapa (b) y repetir las etapas (a) y (b) usando la proteína aleatorizada adicionalmente, o modificar el compuesto obtenido en la etapa (b) y repetir las etapas (a) y (b) usando el compuesto modificado adicionalmente. Además, el compuesto es preferiblemente una proteína. En otras realizaciones preferidas, la proteína incluye el décimo módulo del dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), y la unión está mediada por uno, dos o tres bucles de ¹⁰F_n3. Además, el segundo bucle de ¹⁰F_n3 puede extenderse en longitud respecto al módulo de origen natural, o el ¹⁰F_n3 puede carecer de un motivo de unión a integrina. De nuevo, como se describe anteriormente, el motivo de unión a integrina puede reemplazarse por una secuencia de aminoácidos en la que una secuencia de aminoácidos de aminoácido básico-aminoácido neutro-aminoácido ácido (en la dirección N-terminal a C-terminal) reemplaza al motivo de unión a integrina; es una secuencia preferida la serina-glicina-glutamato.

Los procedimientos de selección descritos en la presente memoria pueden llevarse a cabo usando cualquier proteína que contiene un dominio de fibronectina de tipo III. Por ejemplo, la proteína que contiene un dominio de fibronectina de tipo III puede carecer de enlaces disulfuro, o puede formularse como parte de una proteína de fusión (por ejemplo, una proteína de fusión que incluye adicionalmente un dominio Fc de inmunoglobulina, una proteína de complemento, una proteína toxina o una proteína albúmina). Además, pueden llevarse a cabo selecciones usando las proteínas con dominio de fibronectina de tipo III unidas covalentemente a ácidos nucleicos (por ejemplo, ARN o cualquier ácido nucleico que codifique la proteína). Además, las selecciones pueden llevarse a cabo usando multímeros de proteína que contienen un dominio de fibronectina.

Preferiblemente, las selecciones implican la inmovilización de la diana de unión sobre un soporte sólido. Los soportes sólidos preferidos incluyen columnas (por ejemplo, columnas de afinidad tales como columnas de agarosa) o microchips.

Como se usa en la presente memoria, se entiende por “dominio de fibronectina de tipo III” un dominio que tiene 7 u 8 cadenas beta que están distribuidas entre dos láminas beta, que se empaquetan entre sí formando el núcleo de la proteína, y que contienen adicionalmente bucles que conectan las cadenas beta entre sí y están expuestas al disolvente. Hay al menos tres de dichos bucles en cada extremo del sándwich de lámina beta, en los que el borde es el límite de la proteína perpendicular a la dirección de las cadenas beta. Preferiblemente, un dominio de fibronectina de tipo III incluye una secuencia que exhibe al menos un 30% de identidad de aminoácidos, y preferiblemente al menos un 50% de identidad de aminoácidos, con la secuencia que codifica la estructura del dominio de ¹⁰F_n3 designado como “1ttg” (ID = “1ttg” (un ttg)) disponible en la Protein Data Base. La identidad de secuencia designada en esta definición se determina mediante el programa Homology, disponible en Molecular Simulation (San Diego, CA). La invención incluye adicionalmente polímeros de moléculas relacionadas con ¹⁰F_n3, que son una extensión del uso de la estructura monomérica en la que las subunidades de la poliproteína son idénticas o diferentes en secuencia.

Por “fibronectina de origen natural”, se entiende cualquier proteína de fibronectina que esté codificada por un organismo vivo.

Por “aleatorizado” se entiende incluir una o más alteraciones de aminoácidos respecto a una secuencia molde.

Por “proteína” se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de longitud, modificación postraduccional o función. “Proteína” y “péptido” se usan intercambiamente en la presente memoria.

Por “ARN” se entiende una secuencia de dos o más ribonucleótidos unidos covalentemente de origen natural o modificados. Un ejemplo de ARN modificado incluido en este término es el ARN fosforotioato.

ES 2 329 959 T3

Por "ADN" se entiende una secuencia de dos o más desoxirribonucleótidos unidos covalentemente de origen natural o modificados.

5 Por "ácido nucleico" se entiende cualesquiera dos o más nucleótidos o análogos o derivados nucleotídicos unidos covalentemente. Como se usa en la presente memoria, este término incluye, sin limitación, ADN, ARN y APN.

Por "farmacéuticamente aceptable" se entiende un compuesto o proteína que puede administrarse a un animal (por ejemplo un mamífero) sin consecuencias médicamente adversas significativas.

10 Por "vehículo fisiológicamente aceptable" se entiende un vehículo que no tiene un impacto negativo significativo sobre el hospedador tratado y que retiene las propiedades terapéuticas del compuesto con el que se administra. Es un vehículo fisiológicamente aceptable ejemplar la solución salina fisiológica. Son conocidos otros vehículos fisiológicamente aceptables y sus formulaciones por los expertos en la técnica y se describen, por ejemplo, en *Remington's Pharmaceutical Sciences*, (18ª edición), ed. A. Gennaro, 1990, Mack Publishing Company, Easton, PA.

15 Por "seleccionar" se entiende separar sustancialmente una molécula de otras moléculas de una población. Como se usa en la presente memoria, una etapa "selectiva" proporciona al menos un enriquecimiento de 2 veces, preferiblemente 30 veces, más preferiblemente 100 veces y lo más preferiblemente 1000 veces de una molécula deseada respecto a moléculas indeseadas en una población después de la etapa de selección. La etapa de selección puede repetirse 20 cualquier número de veces, y pueden combinarse diferentes tipos de etapas de selección en un enfoque dado.

Por "pareja de unión", como se usa en la presente memoria, se entiende cualquier molécula que tenga una afinidad específica, covalente o no covalente, por una porción de un compuesto deseado (por ejemplo proteína) de interés. Los 25 ejemplos de parejas de unión incluyen, sin limitación, miembros de pares de antígeno/anticuerpo, pares de proteína/inhibidor, pares de receptor/ligando (por ejemplo, pares de receptor de superficie celular/ligando tales como pares de receptor de hormona/hormona peptídica), pares de enzima/sustrato (por ejemplo, pares de cinasa/sustrato), pares de lectina/carbohidrato, agregados proteicos oligoméricos o heterooligoméricos, pares de proteína de unión a ADN/sitio de unión a ADN, pares de ARN/proteína y dúplex de ácido nucleico, heterodúplex o cadenas ligadas, así como cualquier molécula que sea capaz de formar uno o más enlaces covalentes o no covalentes (por ejemplo, enlaces disulfuro) 30 con cualquier porción de otra molécula (por ejemplo, un compuesto o proteína).

Por "soporte sólido" se entiende, sin limitación, cualquier columna (o material de columna), perla, tubo de ensayo, disco de microvaloración, partícula sólida (por ejemplo, agarosa o Sepharose), microchip (por ejemplo, chip de silicio, silicio-vidrio u oro), o membrana (por ejemplo, la membrana de un liposoma o vesícula) al que pueda unirse un 35 complejo de afinidad directa o indirectamente (por ejemplo, mediante otros intermedios de pareja de unión tales como otros anticuerpos o proteína A), o en los que pueda embeberse un complejo de afinidad (por ejemplo, mediante un receptor o canal).

La presente invención proporciona una serie de ventajas. Por ejemplo, como se describe con más detalle a continuación, el presente mimético de anticuerpo exhibe propiedades biofísicas mejoradas tales como estabilidad en condiciones reductoras y solubilidad a altas concentraciones. Además, estas moléculas pueden expresarse y plegarse fácilmente en sistemas procarióticos tales como *E. coli*, en sistemas eucarióticos tales como levadura y en sistemas de traducción *in vitro* tales como el sistema de lisado de reticulocito de conejo. Además, estas moléculas son extremadamente sensibles a técnicas de maduración por afinidad que implican múltiples ciclos de selección, incluyendo selección *in vitro* 40 usando tecnología de fusión de ARN-proteína (Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 94: 12297, 1997; Szostak *et al.*, documentos USSN 09/007.005 y USSN 09/247.190; Szostak *et al.*, documento WO98/31700), exposición en fago (véase, por ejemplo, Smith y Petrenko, *Chem. Rev.* 97: 317, 1997) y sistemas de exposición en levadura (véase por ejemplo Boder y Wittrup, *Nature Biotech.* 15: 553, 1997).

50 Resultarán evidentes otros rasgos y ventajas de la presente invención a partir de la siguiente descripción detallada de la misma, y de las reivindicaciones.

Breve descripción de los dibujos

55 La Figura 1 es una fotografía que muestra una comparación entre las estructuras de regiones variables de cadena pesada de anticuerpo de camello (azul oscuro) y llama (azul claro) en cada una de dos orientaciones.

60 La Figura 2 es una fotografía que muestra una comparación entre las estructuras de la región variable de cadena pesada de anticuerpo de camello (azul oscuro), la región variable de cadena pesada de anticuerpo de llama (azul claro) y un módulo número 10 de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) (amarillo).

La Figura 3 es una fotografía que muestra un módulo número 10 de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), con los bucles correspondientes a los bucles de unión a antígeno en las cadenas pesadas de IgG destacados en rojo.

65 La Figura 4 es una gráfica que ilustra un alineamiento de secuencia entre un dominio de proteína fibronectina de tipo III y dominios de proteína relacionados. La secuencia de aminoácidos de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural se expone como: VSDVPRDLEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT.

ES 2 329 959 T3

La Figura 5 es una fotografía que muestra las similitudes estructurales entre un dominio ¹⁰F_{n3} y 15 proteínas relacionadas, incluyendo fibronectinas, tenascinas, colágenos y undulina. En esta fotografía, las regiones se marcan del modo siguiente: constante, azul oscuro; conservada, azul claro; neutra, blanco; variable, rojo y motivo de unión a integrina RGD (variable), amarillo.

La Figura 6 es una fotografía que muestra modelos espaciales compactos de los módulos 9 y 10 de fibronectina III, en cada una de dos orientaciones diferentes. Los dos módulos y el bucle de unión a integrina (RGD) están marcados. En esta figura, el azul indica residuos cargados positivamente, el rojo indica residuos cargados negativamente y el blanco indica residuos no cargados.

La Figura 7 es una fotografía que muestra modelos espaciales compactos de los módulos 7-10 de fibronectina III, en cada una de tres orientaciones diferentes. Los cuatro módulos están marcados. En esta figura, el azul indica residuos cargados positivamente, el rojo indica residuos cargados negativamente y el blanco indica residuos no cargados.

La Figura 8 es una fotografía que ilustra la formación, en diferentes condiciones salinas, de fusiones de ARN-proteína que incluyen dominios de fibronectina de tipo III.

La Figura 9 es una serie de fotografías que ilustran la selección de fusiones de ARN-proteína que contienen el dominio de fibronectina de tipo III, medida mediante análisis de señal por PCR.

La Figura 10 es una gráfica que ilustra un aumento del porcentaje de unión a TNF- α durante las selecciones descritas en la presente memoria, así como una comparación entre la fusión de ARN-proteína y selecciones de proteína libre.

La Figura 11 es una serie de representaciones esquemáticas que muestran IgG, ¹⁰F_{n3}, F_n-CH₁-CH₂-CH₃ y F_n-CH₂-CH₃ (en sentido de la agujas del reloj desde arriba a la izquierda).

La Figura 12 es una fotografía que muestra un modelo molecular de F_n-CH₁-CH₂-CH₃ basado en estructuras tridimensionales conocidas de IgG (cristalografía de rayos X) y ¹⁰F_{n3} (RMN y cristalografía de rayos X).

Descripción detallada

Los miméticos de anticuerpo novedosos descritos en la presente memoria se han diseñado para ser superiores tanto a fragmentos derivados de anticuerpo como a estructuras no de anticuerpo, por ejemplo aquellos marcos estructurales descritos anteriormente.

La ventaja principal de estos miméticos de anticuerpo frente a los fragmentos de anticuerpo es estructural. Estos armazones derivan de módulos estructurales completos, estables y solubles encontrados en proteínas de fluidos del cuerpo humano. En consecuencia, exhiben mejores propiedades de plegamiento y termoestabilidad que los fragmentos de anticuerpos, cuya creación implica la retirada de partes del plegamiento nativo del anticuerpo, a menudo exponiendo residuos de aminoácidos que, en un anticuerpo intacto, estarían enterrados en un entorno hidrófobo tal como una interfase entre dominios variables y constantes. La exposición de dichos residuos hidrófobos a disolvente aumenta la probabilidad de agregación.

Además, los miméticos de anticuerpo descritos en la presente memoria no tienen enlaces disulfuro, que se ha reseñado que retardan o evitan un plegamiento apropiado de los fragmentos de anticuerpo en ciertas condiciones. Puesto que los presentes armazones no se basan en disulfuros para su estabilidad de plegamiento nativa, son estables en condiciones reductoras, al contrario que los anticuerpos y sus fragmentos que se desordenan tras la degradación del enlace disulfuro.

Además, estos armazones basados en fibronectina proporcionan las ventajas funcionales de moléculas de anticuerpo. En particular, a pesar del hecho de que el módulo ¹⁰F_{n3} no sea una inmunoglobulina, su plegamiento global es cercano al de la región variable de la cadena pesada de IgG (Figura 2), haciendo posible exponer los tres bucles de fibronectina análogos a CDR en orientaciones relativas similares a las de los anticuerpos nativos. Debido a esta estructura, el presente mimético de anticuerpo posee propiedades de unión a antígeno que son en naturaleza y afinidad similares a las de los anticuerpos, y puede emplearse una estrategia de aleatorización de bucle y transposición *in vitro* que es similar al procedimiento de maduración por afinidad de anticuerpos *in vivo*.

Se describen ahora a continuación armazones basados en fibronectina ejemplares y su uso para identificar, seleccionar y hacer evolucionar proteínas de unión novedosas así como sus ligandos diana. Estos ejemplos se proporcionan con fines de ilustrar, y no limitar, la invención.

Motivo estructural ¹⁰F_{n3}

Los miméticos de anticuerpo de la presente invención están basados en la estructura de un módulo de fibronectina de tipo III (F_{n3}), un dominio común encontrado en sangre y proteínas estructurales de mamíferos. Este dominio aparece más de 400 veces en la base de datos de proteínas y se ha estimado que aparece en un 2% de las proteínas secuenciadas hasta la fecha, incluyendo fibronectinas, tenascina, proteínas citoesqueléticas intracelulares y enzimas

ES 2 329 959 T3

procarióticas (Bork y Doolittle, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 8990, 1992; Bork *et al.*, *Nature Biotech.* 15: 553, 1997; Meinke *et al.*, *J. Bacteriol.* 175: 1910, 1993; Watanabe *et al.*, *J. Biol. Chem.* 265: 15659, 1990). En particular, estos armazones incluyen, como molde, el décimo módulo de Fn3 humano (¹⁰Fn3), que comprende 94 residuos de aminoácidos. El plegamiento global de este dominio está estrechamente relacionado con el del fragmento de anticuerpo funcional más pequeño, la región variable de la cadena pesada, que comprende toda la unidad de reconocimiento de antígeno en IgG de camello y llama (Figuras 1, 2). Las grandes diferencias entre los dominios de camello y llama y el dominio ¹⁰Fn3 son que (i) ¹⁰Fn3 tiene menos cadenas beta (siete frente a nueve) y (ii) las dos láminas beta empaquetadas entre sí están conectadas por un puente disulfuro en los dominios de camello y llama pero no en ¹⁰Fn3.

Los tres bucles de ¹⁰Fn3 correspondientes a bucles de unión a antígeno de la cadena pesada de IgG transcurren entre los residuos de aminoácidos 21-31, 51-56 y 76-88 (Figura 3). La longitud del primer y tercer bucles, de 11 y 12 residuos respectivamente, entra dentro del intervalo de los correspondientes bucles de reconocimiento de antígeno encontrados en cadenas pesadas de anticuerpo, es decir, 10-12 y 3-25 residuos, respectivamente. En consecuencia, una vez aleatorizados y seleccionados por alta afinidad de antígeno, estos dos bucles hacen contactos con antígeno equivalentes a los contactos de los bucles correspondientes en anticuerpos.

En contraposición, el segundo bucle de ¹⁰Fn3 es sólo de 6 residuos de largo, mientras que el correspondiente bucle en cadenas pesadas de anticuerpo está en el intervalo de 16-19 residuos. Por lo tanto, para optimizar la unión a antígeno, se extiende preferiblemente el segundo bucle de ¹⁰Fn3 en 10-13 residuos (además de aleatorizarse) para obtener la flexibilidad y afinidad mayor posible en la unión a antígeno. Es más, en general las longitudes así como las secuencias de los bucles similares a CDR de los miméticos de anticuerpo pueden aleatorizarse durante la maduración por afinidad *in vitro* o *in vivo* (como se describe con más detalle a continuación).

El décimo dominio de fibronectina de tipo III humano, ¹⁰Fn3, se repliega rápidamente incluso a baja temperatura, su conformación de cadena principal se ha recuperado en 1 segundo a 5°C. La estabilidad termodinámica del ¹⁰Fn3 es alta ($\Delta G_U = 24 \text{ kJ/mol} = 5,7 \text{ kcal/mol}$), correlacionado con su alta temperatura de fusión de 110°C.

Uno de los papeles fisiológicos del ¹⁰Fn3 es como una subunidad de fibronectina, una glucoproteína que existe en forma soluble en fluidos corporales y en forma insoluble en la matriz extracelular (Dickinson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 236: 1079, 1994). Un monómero de fibronectina de 220-250 kDa contiene 12 módulos de tipo I, 2 módulos de tipo II y 17 módulos de tipo III de fibronectina (Potts y Campbell, *Curr. Opin. Cell Biol.* 6: 648, 1994). Los diferentes módulos de tipo III están implicados en la unión de fibronectina a integrinas, heparina y sulfato de condroitina. Se encontró que el ¹⁰Fn3 mediaba la adhesión celular mediante un motivo de unión a integrina Arg-Gly-Asp (RGD) en uno de sus bucles expuestos. Se ha mostrado que motivos RGD similares están implicados en la unión a integrina de otras proteínas, tales como fibrinógeno, factor de von Willebrand y vitronectina (Hynes *et al.*, *Cell* 69: 11, 1992). No se han descrito papeles de unión a matriz o célula para ¹⁰Fn3.

La observación de que el ¹⁰Fn3 tiene una actividad sólo ligeramente más adhesiva que un péptido corto que contiene RGD es consistente con la conclusión de que la actividad de unión a célula de ¹⁰Fn3 está localizada en el péptido RGD en lugar de distribuida a lo largo de la estructura de ¹⁰Fn3 (Baron *et al.*, *Biochemistry* 31: 2068, 1992). El hecho de que el ¹⁰Fn3 sin el motivo RGD es improbable que se una a otras proteínas plasmáticas o matriz extracelular hace a ¹⁰Fn3 un almacén útil para reemplazar anticuerpos. Además, la presencia de ¹⁰Fn3 en fibrinógeno natural en la corriente sanguínea sugiere que es improbable que el ¹⁰Fn3 mismo sea inmunogénico en el organismo de origen.

Además, se ha determinado que el marco estructural de ¹⁰Fn3 posee secuencias de bucle expuestas tolerantes a aleatorización, que facilitan la generación de diversos conjuntos de miméticos de anticuerpos. Esta determinación se realizó examinando la flexibilidad de la secuencia de ¹⁰Fn3. En particular, se alineó la secuencia de ¹⁰Fn3 con las secuencias de fibronectinas de otras fuentes así como con secuencias de proteínas relacionadas (Figura 4), y se cartografiaron los resultados de este alineamiento en la estructura tridimensional del dominio ¹⁰Fn3 humano (Figura 5). Este alineamiento reveló que la mayoría de los residuos conservados se encuentran en el núcleo del sándwich de láminas beta, mientras que los residuos altamente variables están localizados a lo largo de los bordes de las láminas beta, incluyendo los extremos N y C, en las caras accesibles al disolvente de ambas láminas beta y en los tres bucles accesibles al disolvente que sirven como bucles hipervariables para maduración por afinidad del mimético de anticuerpo. A la vista de estos resultados, es improbable que la aleatorización de estos tres bucles tenga un efecto adverso sobre el plegamiento o estabilidad global de la estructura de ¹⁰Fn3 misma.

Para la secuencia de ¹⁰Fn3 humano, este análisis indica que, como mínimo, los aminoácidos 1-9, 44-50, 61-54, 82-94 (bordes de láminas beta); 19, 21, 30-46 (pares), 79-65 (impares) (caras accesibles a disolvente de ambas láminas beta); 21-31, 51-56, 76-88 (bucles accesibles a disolvente similares a CDR); y 14-16 y 36-45 (otros bucles accesibles a disolvente y giros beta) pueden aleatorizarse para evolucionar a proteínas de unión a compuesto nuevas o mejoradas. Además, como se debate anteriormente, las alteraciones en las longitudes de uno o más bucles expuestos a disolvente pueden incluirse también en dichos procedimientos de evolución dirigida. Como alternativa, pueden usarse también cambios en las secuencias de lámina β para evolucionar a proteínas nuevas. Estas mutaciones cambian el almacén y alteran así indirectamente la(s) estructura(s) de bucle. Si se toma este enfoque, las mutaciones no deberían saturar la secuencia, sino que deberían introducirse bastantes pocas mutaciones. Preferiblemente, deberían introducirse en las secuencias de lámina β no más de 10 cambios de aminoácidos, y más preferiblemente no más de 3 cambios de aminoácidos, mediante este enfoque.

Fusiones de fibronectina

El mimético de anticuerpo descrito en la presente memoria puede fusionarse con otros dominios de proteína. Por ejemplo, estos miméticos pueden integrarse con la respuesta inmunitaria humana fusionando la región constante de una IgG (Fc) con un módulo $^{10}\text{Fn3}$, preferiblemente por el extremo C de $^{10}\text{Fn3}$. La Fc en dicha molécula de fusión de $^{10}\text{Fn3}$ -Fc activa el componente de complemento de la respuesta inmunitaria y aumenta el valor terapéutico del mimético de anticuerpo. De forma similar, puede usarse una fusión entre $^{10}\text{Fn3}$ y una proteína de complemento, tal como Clq, para orientar a células, y puede usarse una fusión entre $^{10}\text{Fn3}$ y una toxina para destruir específicamente células que portan un antígeno particular. Además, puede fusionarse $^{10}\text{Fn3}$ en cualquier forma con albúmina para aumentar su semivida en la corriente sanguínea y su penetración en tejido. Cualquiera de estas fusiones puede generarse mediante técnicas estándar, por ejemplo, mediante la expresión de la proteína de fusión de un gen de fusión recombinante construido usando secuencias génicas públicamente disponibles.

Múltimeros de armazón de fibronectina

Además de monómeros de fibronectina, puede generarse cualquiera de los constructos de fibronectina descritos en la presente memoria como dímeros o múltimeros de miméticos de anticuerpo basados en $^{10}\text{Fn3}$ como medio para aumentar la valencia y por tanto la avidéz de la unión a antígeno. Dichos múltimeros pueden generarse mediante la unión covalente entre módulos $^{10}\text{Fn3}$ individuales, por ejemplo, imitando la unión $^8\text{Fn3}$ - $^9\text{Fn3}$ - $^{10}\text{Fn3}$ de extremo C a N natural o imitando dímeros de anticuerpo que se mantienen juntos mediante sus regiones constantes. Puede explotarse un constructo de $^{10}\text{Fn3}$ -Fc para diseñar dímeros de esquema general $^{10}\text{Fn3}$ -Fc::Fc- $^{10}\text{Fn3}$. Los enlaces modificados por ingeniería genética en la interfase Fc::Fc pueden ser covalentes o no covalentes. Además, pueden usarse parejas de dimerización o multimerización distintas de Fc en híbridos de $^{10}\text{Fn3}$ para crear dichas estructuras de orden superior.

En ejemplos particulares, pueden generarse múltimeros unidos covalentemente construyendo genes de fusión que codifican el múltimero o, como alternativa, introduciendo por ingeniería genética codones de residuos de cisteína en secuencias monoméricas y permitiendo que ocurra la formación de enlace disulfuro entre los productos de expresión. Pueden generarse también múltimeros unidos no covalentemente mediante una variedad de técnicas. Estas incluyen la introducción en secuencias monoméricas de codones correspondientes a residuos cargados positiva y/o negativamente y permitir que ocurran interacciones entre estos residuos en los productos de expresión (y por lo tanto entre los monómeros). Este enfoque puede simplificarse aprovechando los residuos cargados presentes naturalmente en una subunidad monomérica, por ejemplo, los residuos cargados negativamente de fibronectina. Otro medio para generar miméticos de anticuerpo unidos no covalentemente es introducir en el gen monomérico (por ejemplo, en los extremos amino o carboxilo) las secuencias de codificación de proteínas o dominios de proteína conocidos por interactuar. Dichas proteínas o dominios de proteína incluyen motivos de enrollamiento helicoidal, motivos de cremallera de leucina y cualquiera de las numerosas subunidades de proteína (o fragmentos de las mismas) conocidas por dirigir la formación de dímeros o múltimeros de orden superior.

Moléculas similares a fibronectina

Aunque el $^{10}\text{Fn3}$ representa un armazón preferido para la generación de miméticos de anticuerpo, otras moléculas pueden sustituir a $^{10}\text{Fn3}$ en las moléculas descritas en la presente memoria. Estas incluyen, sin limitación, módulos de fibronectina humana $^1\text{Fn3}$ - $^9\text{Fn3}$ y $^{11}\text{Fn3}$ - $^{17}\text{Fn3}$, así como módulos de Fn3 relacionados de animales no humanos y procariotas. Además, pueden usarse también módulos de Fn3 de otras proteínas con homología de secuencia con $^{10}\text{Fn3}$, tales como tenascinas y undulinas. Los módulos de diferentes organismos y proteínas originales pueden ser los más apropiados para diferentes aplicaciones, por ejemplo, en el diseño de un mimético de anticuerpo, puede ser más deseable generar aquella proteína de una fibronectina o molécula similar a fibronectina nativa del organismo para el que se pretende una molécula terapéutica o de diagnóstico.

Evolución dirigida de proteínas de unión basadas en armazón

El mimético de anticuerpo descrito en la presente memoria puede usarse en cualquier técnica para hacer evolucionar proteínas de unión nuevas o mejoradas. En un ejemplo particular, se inmoviliza la diana de unión sobre un soporte sólido tal como una columna de resina o pocillo de placa de microvaloración, y se pone en contacto la diana con una colección de proteínas de unión basadas en armazón candidatas. Dicha colección puede consistir en clones de $^{10}\text{Fn3}$ construidos a partir del armazón de $^{10}\text{Fn3}$ de tipo salvaje mediante aleatorización de la secuencia y/o la longitud de los bucles similares de CDR de $^{10}\text{Fn3}$. Si se desea, esta colección puede ser una colección de fusión de ARN-proteína generada, por ejemplo, mediante las técnicas descritas en Szostak *et al.*, USSN 09/007.005, USSN 09/247.190; Szostak *et al.*, WO98/31700 y Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) vol. 94, pág. 12297-12302. Como alternativa, puede ser una colección de ADN-proteína (por ejemplo, como se describe en Lohse, "DNA-Protein Fusions and Uses Thereof", USSN. 60/110.549 presentada el 2 de diciembre de 1998 y presentada el 2 de diciembre de 1999). Se incuba la colección de fusión con la diana inmovilizada, se lava el soporte para retirar ligantes no específicos y se eluyen los ligantes más fuertes en condiciones muy rigurosas y se someten a PCR para recuperar la información de secuencia o para crear una nueva colección de ligantes que puede usarse para repetir el proceso de selección, con o sin mutagénesis adicional de la secuencia. Pueden efectuarse una serie de rondas de selección hasta obtenerse ligantes de suficiente afinidad por el antígeno.

En un ejemplo particular, puede usarse el armazón de ¹⁰F_n3 como diana de selección. Por ejemplo, si se requiere que una proteína se una a una secuencia peptídica específica presentada en un bucle de diez residuos, se construye un clon de ¹⁰F_n3 sencillo en el que uno de sus bucles se ha fijado a la longitud de diez y a la secuencia deseada. Se expresa *in vivo* el nuevo clon y se purifica, y después se inmoviliza sobre un soporte sólido. Se deja interaccionar entonces una colección de fusión de ARN-proteína basada en un armazón apropiado con el soporte, que después se lava, y se eluyen las moléculas deseadas y se vuelven a seleccionar como se describe anteriormente.

De forma similar, puede usarse el armazón de ¹⁰F_n3 para encontrar proteínas naturales que interaccionan con la secuencia peptídica expuesta en un bucle de ¹⁰F_n3. Se inmoviliza la proteína ¹⁰F_n3 como se describe anteriormente y se criban en una colección de fusión de ARN-proteína los ligantes del bucle expuesto. Se enriquecen los ligantes mediante rondas múltiples de selección y se identifican mediante secuenciación de ADN.

Además, en los enfoques anteriores, aunque las colecciones de ARN-proteína representan colecciones ejemplares de evolución dirigida, puede usarse cualquier tipo de colección basada en armazón en los procedimientos de selección de la invención.

Uso

Los miméticos de anticuerpo descritos en la presente memoria pueden hacerse evolucionar para unirse a cualquier antígeno de interés. Estas proteínas tienen propiedades termodinámicas superiores a las de los anticuerpos naturales y pueden evolucionar rápidamente *in vitro*. En consecuencia, estos miméticos de anticuerpo pueden emplearse en lugar de anticuerpos en todas las áreas en que se usan anticuerpos, incluyendo en los campos de investigación, terapia y diagnóstico. Además, debido a que estos armazones poseen propiedades de solubilidad y estabilidad superiores a los anticuerpos, los miméticos de anticuerpo descritos en la presente memoria pueden usarse también en condiciones que destruirían o inactivarían moléculas de anticuerpo. Finalmente, debido a que los armazones de la presente invención pueden hacerse evolucionar para unirse virtualmente a cualquier compuesto, estas moléculas proporcionan proteínas de unión completamente novedosas que encuentran uso también en las áreas de investigación, diagnóstico y terapia.

Resultados experimentales

Se generaron las moléculas de armazón ejemplares descritas anteriormente y se ensayaron, por ejemplo, en protocolos de selección como los siguientes.

Construcción de colección

Se construyó una colección compleja a partir de tres fragmentos, cada uno de los cuales contenía un área aleatorizada correspondiente a un bucle similar a CDR. Los fragmentos se nombraron BC, DE y FG, basándose en los nombres de los bucles similares a CDR-H contenidos en los mismos; además de ¹⁰F_n3 y una secuencia aleatorizada, cada uno de los fragmentos contenía extensiones que codificaban un dominio His₆ N-terminal o un marcador peptídico FLAG C-terminal. En cada unión entre dos fragmentos (concretamente, entre los fragmentos BC y DE o entre los fragmentos DE y FG), cada fragmento de ADN contenía secuencias de reconocimiento de endonucleasa de restricción IIS de tipo EarI. Esta enzima de restricción permitía el corte y empalme conjunto de fragmentos adyacentes retirando todas las secuencias extrañas no de ¹⁰F_n3. También permite un mezclado similar a la recombinación de los tres fragmentos de ¹⁰F_n3 entre ciclos de mutagénesis y selección.

Se ensambló cada fragmento de dos oligonucleótidos superpuestos, que se asociaron en primer lugar y se extendieron después formando la forma de ADN bicatenaria del fragmento. Se enumeran a continuación los oligonucleótidos que se usaron para construir y procesar los tres fragmentos; las especies “top” y “bottom” para cada fragmento son oligonucleótidos que contenían la secuencia de codificación de ¹⁰F_n3 completa. En estas referencias de oligonucleótidos, “N” indica A, T, C o G y “S” indica C o G.

HfnLBCTop(His):

5'- GG AAT TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA
TTT ACA ATT ACA ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GTT TCT GAT
GTT CCG AGG GAC CTG GAA GTT GTT GCT GCG ACC CCC ACC
AGC-3'

(SEC N° ID 1)

HfnLBCTop (un extremo N alternativo):

5'- GG AAT TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA
5 TTT ACA ATT ACA ATG GTT TCT GAT GTT CCG AGG GAC CTG GAA
GTT GTT GCT GCG ACC CCC ACC AGC-3'

10 (SEC N° ID 2)

HFnLBCBot-flag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC GCT CTT
20 CCC TGT TTC TCC GTA AGT GAT CCT GTA ATA TCT (SNN)7 CCA
GCT GAT CAG TAG GCT GGT GGG GGT CGC AGC -3'

25 (SEC N° ID 3)

HFnBC3'-flag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC GCT CTT
35 CCC TGT TTC TCC GTA AGT GAT CC-3'

(SEC N° ID 4)

HFnLDETop:

5'- GG AAT TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA
45 TTT ACA ATT ACA ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC CTC TTC ACA
GGA GGA AAT AGC CCT GTC C-3'

50 (SEC N° ID 5)

HFnLDEBot-flag 8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC GCT CTT
60 CGT ATA ATC AAC TCC AGG TTT AAG GCC GCT GAT GGT AGC TGT
(SNN)4 AGG CAC AGT GAA CTC CTG GAC AGG GCT ATT TCC TCC
TGT -3'

65 (SEC N° ID 6)

HFnde3'-flag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC GCT CTT
CGT ATA ATC AAC TCC AGG TTT AAG G-3'

(SEC N° ID 7)

HFnlFGTop:

5'- GG AAT TCC TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA
TTT ACA ATT ACA ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC CTC TTC TAT
ACC ATC ACT GTG TAT GCT GTC-3'

(SEC N° ID 8)

HFnlFGBot-flag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT TCG
GTA ATT AAT GGA AAT TGG (SNN)¹⁰ AGT GAC AGC ATA CAC AGT
GAT GGT ATA -3'

(SEC N° ID 9)

HFnlFG3'-flag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC TGT TCG
GTA ATT AAT GGA AAT TGG -3'

(SEC N° ID 10)

T7TMV (introduce el promotor T7 y la región no traducida de TMV necesarios para traducción *in vitro*):

5'- GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGA CAA TTA CTA TTT ACA
ATT ACA-3'

(SEC N° ID 11)

ASAflag8:

5'-AGC GGA TGC CTT GTC GTC GTC GTC CTT GTA GTC-3'

(SEC N° ID 12)

Unispl-s (oligonucleótido puente usado para ligar ARNm con el engarce que contiene puromicina descrito por Roberts *et al.*, 1997, *supra*):

5' -TTTTTTTTTTNAGCGGATGC-3'

(SEC N° ID 13)

A 18---2PEG (engarce de ADN-puromicina):

5'-(A)18(PEG)2CCPur

(SEC N° ID 14)

Se asociaron los pares de oligonucleótidos (500 pmol de cada uno) en 100 μ l de Tris 10 mM pH 7,5, NaCl 50 mM durante 10 minutos a 85°C, seguido de un corto enfriamiento (0,5-1 horas) a temperatura ambiente. Se extendieron entonces los fragmentos asociados con rebordes monocatenarios usando 100 U Klenow (New England Biolabs, Beverly, MA) por cada 100 μ l de alícuota de oligos asociados y el tampón formado por 838,5 μ l de H₂O, 9 μ l de Tris 1 M a pH 7,5, 5 μ l de MgCl₂ 1 M, 20 μ l de dNTP 10 mM y 7,5 μ l de DTT 1 M. Las reacciones de extensión procedieron durante 1 hora a 25°C.

A continuación, se transformaron cada uno de los fragmentos bicatenarios en una fusión de ARN-proteína (PROfusión™) usando la técnica desarrollada por Szostak *et al.*, USSN 09/007.005 y USSN 09/247.190; Szostak *et al.*, WO98/31700 y Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) vol. 94, pág. 12297-12302. Brevemente, se transcribieron los fragmentos usando un kit de transcripción *in vitro* de Ambion, MEGAscript (Ambion, Austin, TX) y se purificó en gel el ARNm resultante y se ligó con un engarce de ADN-puromicina usando ADN ligasa. Se tradujo entonces la molécula de ARNm-ADN-puromicina usando el kit de traducción basado en lisado de reticulocito de conejo Ambion. Se purificó la proteína PROfusión™ de ARNm-ADN-puromicina resultante usando oligo(dT)celulosa, y se sintetizó una cadena de ADN complementaria usando transcriptasa inversa y los cebadores de TI descritos anteriormente (Unisplint-S o flagASA), siguiendo las instrucciones del fabricante.

La PROfusión™ obtenida para cada fragmento se purificó a continuación en la resina apropiada a su marcador de purificación peptídica, concretamente, en agarosa Ni-NTA para el marcador His₆ y agarosa M2 para el marcador FLAG, siguiendo el procedimiento recomendado por el fabricante. Se amplificó el componente de ADNc de las PROfusión™ de unión al marcador mediante PCR usando perlas de PCR Ready-to-Go de Pharmacia, 10 pmol de cebadores de PCR 5' y 3' y el siguiente programa de PCR (Pharmacia, Piscataway, NJ): etapa 1: 95°C durante 3 minutos; etapa 2: 95°C durante 30 segundos, 58/62°C durante 30 segundos, 72°C durante 1 minuto, 20/25/30 ciclos, según sea necesario; etapa 3: 72°C durante 5 minutos; etapa 4: 4°C hasta el final.

Se escindió el ADN resultante con 5 U de EarI (New England Biolabs) por 1 μ g de ADN; la reacción tuvo lugar en tampón ADN ligasa T4 (New England Biolabs) a 37°C durante 1 hora, y estuvo seguido por una incubación a 70°C durante 15 minutos para inactivar EarI. Se combinaron cantidades iguales de ADN de BC, DE y FG y se ligaron para formar un gen de ¹⁰F_n3 completo con bucles aleatorizados. El ligamiento requería 10 U de EarI reciente (New England Biolabs) y 20 U de ADN ligasa T4 (Promega, Madison, WI), y llevó 1 hora a 37°C.

Se prepararon tres colecciones diferentes de la manera descrita anteriormente. Cada una contenía la forma del bucle FG con 10 residuos aleatorizados. Los bucles BC y DE de la primera colección portaban la secuencia de ¹⁰F_n3 de tipo salvaje; un bucle BC con 7 residuos aleatorizados y un bucle DE de tipo salvaje constituían la segunda colección; y un bucle BC con 7 residuos aleatorizados y un bucle DE con 4 residuos aleatorizados constituían la tercera colección. La complejidad del bucle FG en cada una de estas colecciones era de 10¹³; los dos bucles aleatorizados adicionales proporcionaban el potencial de una complejidad demasiado grande para muestrear en laboratorio.

Se combinaron las tres colecciones construidas en una colección maestra para simplificar el proceso de selección; se esperaba que la unión a diana misma seleccionara la colección más adecuada para una exposición particular. Se obtuvieron PROfusión™ de la colección maestra siguiendo el siguiente procedimiento descrito en Szostak *et al.*, USSN 09/007.005 y 09/247.190; Szostak *et al.*, WO98/31700 y Roberts y Szostak, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1997) vol. 94, pág. 12297-12302 (Figura 8).

Selecciones de fusión

Se sometió la colección maestra en forma de PROfusión™ a selección para unirse a TNF- α . Se emplearon dos protocolos: uno en el que la diana se inmovilizaba sobre una columna de agarosa y otro en la que la diana se inmo-

vilizaba sobre un chip BIACORE. En primer lugar, una optimización extensa de las condiciones para minimizar los ligantes de fondo a la columna de agarosa proporcionó las condiciones de tampón favorables de HEPES 50 mM, pH 7,4, 0,02% de Triton, ADN de esperma de salmón desnaturalizado por cizallamiento 100 μ g/ml. En este tampón, la unión no específica de la fusión de ARN de ¹⁰F_n3 a TNF- α -Sephacrose era de un 0,3%. La unión de fondo no específica de ARN-ADN de ¹⁰F_n3 a TNF- α -Sephacrose se encontró que era de un 0,1%.

Durante cada ronda de selección en TNF- α -Sephacrose, se preincubó en primer lugar la colección Profusion™ durante 1 hora con Sephacrose no derivatizada para retirar cualquier ligante no específico restante; se incubó el flujo de este preaclaramiento durante otra hora con TNF- α -Sephacrose. Se lavó la TNF- α -Sephacrose durante 3-30 minutos.

Después de cada selección, se amplificó por PCR el ADN de Profusion™ que había eluido del soporte sólido con NaOH 0,3 M o KOH 0,1 M; persistió una banda de ADN del tamaño esperado a través de múltiples rondas de selección (Figura 9); se observaron resultados similares en los dos protocolos de selección alternativos, y se muestran sólo los datos de la selección en columna de agarosa en la Figura 9.

En las primeras siete rondas, la unión de Profusion™ de colección a la diana permaneció baja; en contraposición, cuando se tradujo proteína reciente a partir de conjuntos de ADN en diferentes etapas de selección, aumentó significativamente la proporción de especies de unión a columna entre rondas (Figura 10). Pueden llevarse a cabo selecciones similares con cualquier otra diana de especie de unión (por ejemplo, IL-1 y IL-13).

Estudios animales

El ¹⁰F_n3 de tipo natural contiene un motivo tripeptídico de unión a integrina, arginina 78-glicina 79-aspartato 80 (el "motivo RGD") en la punta del bucle FG. Para evitar la unión a integrina y una respuesta inflamatoria potencial basada en este tripeptido *in vivo*, se generó una forma mutante de ¹⁰F_n3 que contenía una secuencia inerte, serina 78-glicina 79-glutamato 80 (el "mutante SGE"), una secuencia que se encuentra en el dominio ¹¹F_n3 de tipo silvestre estrechamente relacionado. Este mutante SGE se expresaba como una proteína libre marcada en el extremo N con His₆ en *E. coli*, y se purificó hasta homogeneidad en una columna de quelato metálico seguido de una columna de exclusión por tamaño.

En particular, se clonó la secuencia de ADN que codifica His₆-¹⁰F_n3(SGE) en el vector de expresión pET9a y se transformó en células BL21 DE3 pLysS. Se cultivó entonces el cultivo en caldo LB que contenía kanamicina 50 μ g/ml a 37°C, con agitación, hasta A₅₆₀ = 1,0, y se indujo después con IPTG 0,4 mM. Se incubó adicionalmente el cultivo inducido, en las mismas condiciones durante una noche (14-18 horas); se recuperaron las bacterias mediante centrifugación estándar a baja velocidad. Se resuspendió el sedimento celular en 1/50 del volumen de cultivo original de tampón de lisis (Tris 50 mM, pH 8,0, NaCl 0,5 M, 5% de glicerol, 0,05% de Triton X-100 y PMSF 1 mM), y se lisaron las células pasando la pasta resultante a través de un Microfluidizer M110-EH de Microfluidics Corporation tres veces. Se clarificó el lisado mediante centrifugación y se filtró el sobrenadante a través de un filtro de 0,45 μ m, seguido de filtración a través de un filtro de 0,2 μ m. Se cargaron 100 ml de lisado clarificado en una columna de cobalto Talon de 5 ml (Clontech, Palo Alto, CA), se lavaron con 70 ml de tampón de lisis y se eluyeron con un gradiente lineal de imidazol 0-30 mM en tampón de lisis. El caudal a través de la columna a lo largo de todas las etapas era de 1 ml/min. Se concentró la proteína eluida 10 veces mediante diálisis (corte de PM= 3.500) frente a PEG 15.000-20.000. Se dializó la muestra resultante en tampón 1 (tampón de lisis sin glicerol), se cargó después, 5 ml cada vez, en una columna de exclusión por tamaño Sephacryl 100 de 16 x 60 mm equilibrada con tampón 1. Se procesó la columna a 0,8 ml/min en tampón 1; se combinaron todas las fracciones que contenían una proteína del PM esperado, se concentraron 10x como se describe anteriormente y después se dializaron con PBS. Toxikon (MA) se comprometió a efectuar cribados de endotoxina y estudios animales en la muestra resultante.

En estos estudios animales, los niveles de endotoxina en las muestras examinadas hasta la fecha han estado por debajo del nivel de detección del ensayo. En un estudio toxicológico preliminar, se inyectó esta proteína en dos ratones a una dosis estimada de 100x la terapéutica de 2,6 mg/ratón. Los animales sobrevivieron las dos semanas del estudio, sin efectos patológicos aparentes. Estos resultados sugieren que el ¹⁰F_n3 puede incorporarse con seguridad a un medicamento IV.

Constructos alternativos para uso in vivo

Para extender la semivida del dominio ¹⁰F_n3 de 8 kDa, se ha construido también una molécula mayor que imita los anticuerpos naturales. Esta molécula de ¹⁰F_n3-Fc contiene los dominios -CH₁-CH₂-CH₃ (Figura 11) o -CH₂-CH₃ de la región constante de IgG del hospedador; en estos constructos, se injerta el dominio ¹⁰F_n3 en el extremo N en lugar del dominio V_H de IgG (Figuras 11 y 12). Se espera que dichos constructos similares a anticuerpos mejoren la farmacocinética de la proteína así como su capacidad de controlar la respuesta inmunitaria natural.

Para construir la forma de murino del clon ¹⁰F_n3-CH₁-CH₂-CH₃, se amplificó en primer lugar la región -CH₁-CH₂-CH₃ a partir de una colección de ADNc de hígado-bazo de ratón (Clontech) y se ligó después en el vector pET25b. Los cebadores usados en la clonación eran 5' Fc Nest y 3' Fc Nest, y los cebadores usados para injertar los sitios de restricción apropiados en los extremos del inserto recuperado eran 5' Fc HIII y 3' Fc Nhe:

ES 2 329 959 T3

5' Fc Nest 5'GCG GCA GGG TTT GCT TAC TGG GGC CAA GGG 3' (SEC N° ID 15);

3' Fc Nest 5'GGG AGG GGT GGA GGT AGG TCA CAG TCC 3' (SEC N° ID 16);

5 3' Fc Nhe 5' TTT GCT AGC TTT ACC AGG AGA GTG GGA GGC 3' (SEC N° ID 17); y

5' Fc HIII 5' AAA AAG CTT GCC AAA ACG ACA CCC CCA TCT GTC 3' (SEC N° ID 18).

10 Se usa PCR adicional para retirar la región CH₁ de este clon y crear la parte Fc del clon ¹⁰F_n3-CH₂-CH₃ más corto. Se corta y empalma la secuencia que codifica ¹⁰F_n3 en el extremo 5' de cada clon; puede usarse el ¹⁰F_n3 de tipo natural clonado de la misma colección de ADNc de bazo de ratón o un ¹⁰F_n3 modificado obtenido mediante mutagénesis o aleatorización de las moléculas. Los oligonucleótidos usados en la clonación de ¹⁰F_n3 de tipo natural murino eran:

15 Mo 5PCR-NdeI:

5' CATATGGTTTCTGATATTCCGAGAGATCTGGAG 3' (SEC N° ID 19);

20 Mo5PCR-His-NdeI (para un extremo N alternativo con el marcador de purificación His₆):

5' CAT ATG CAT CAC CAT CAC CAT CAC GTT TCT GAT ATT

25 CCG AGA G 3'

(SEC N° ID 20) y

Mo3PCR-EcoRI:

30 GAATTCCTATGTTTTATAATTGATGGAAAC3' (SEC N° ID 21).

35 Se construyen los equivalentes humanos de los clones usando la misma estrategia con secuencias oligonucleotídicas humanas.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en la que la secuencia de aminoácidos de cada uno del bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia del décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando **caracterizada** dicha proteína por su capacidad de unirse a antígeno.
- 10 2. Una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en la que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia del décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, y en la que el bucle DE de dicho ¹⁰F_n3 está extendido en longitud respecto al ¹⁰F_n3 humano de origen natural, estando **caracterizada** dicha proteína por su capacidad de unirse a antígeno.
- 15 3. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que la secuencia de aminoácidos del ¹⁰F_n3 humano de origen natural se expone en la Figura 4.
- 20 4. La proteína de la reivindicación 3, en la que el bucle BC del ¹⁰F_n3 humano de origen natural transcurre entre los residuos de aminoácidos 21-31 de la secuencia expuesta en la Figura 4.
- 5 5. La proteína de la reivindicación 3, en la que el bucle DE del ¹⁰F_n3 humano de origen natural transcurre entre los residuos de aminoácidos 51-56 de la secuencia expuesta en la Figura 4.
- 25 6. La proteína de la reivindicación 3, en la que el bucle FG del ¹⁰F_n3 humano de origen natural transcurre entre los residuos de aminoácidos 76-88 de la secuencia expuesta en la Figura 4.
- 30 7. La proteína de la reivindicación 1, en la que el bucle DE de dicho ¹⁰F_n3 se extiende en longitud respecto al ¹⁰F_n3 humano de origen natural.
8. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha unión a antígeno está mediada por tres bucles de ¹⁰F_n3.
9. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho ¹⁰F_n3 carece de un motivo de unión a integrina.
- 35 10. La proteína de la reivindicación 9, en la que dicho motivo de unión a integrina está reemplazado por una secuencia de aminoácidos que comprende un motivo de aminoácidos aminoácido básico-aminoácido neutro-aminoácido ácido.
- 40 11. La proteína de la reivindicación 10, en la que dicho motivo de unión a integrina está reemplazado por una secuencia de aminoácidos que comprende serina-glicina-glutamato.
12. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína carece de enlaces disulfuro.
13. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicha proteína está unida covalentemente a un ácido nucleico.
- 45 14. La proteína de la reivindicación 13, en la que dicho ácido nucleico codifica dicha proteína.
15. La proteína de la reivindicación 14, en la que dicho ácido nucleico es ARN.
- 50 16. Una proteína de fusión que comprende un ácido nucleico unido covalentemente a una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en la que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando **caracterizada** dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.
- 55 17. Una proteína de fusión que comprende la proteína de la reivindicación 1 ó 2.
18. La proteína de fusión de la reivindicación 17, en la que dicha proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, una proteína de complemento, una proteína toxina o una proteína albúmina.
- 60 19. Una proteína de fusión que comprende un dominio Fc de inmunoglobulina, una proteína de complemento, una proteína toxina o una proteína albúmina y una proteína similar a anticuerpo que comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), en la que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando **caracterizada** dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.
- 65

ES 2 329 959 T3

20. Un dímero o multímero de una proteína similar a anticuerpo, en el que la proteína similar a anticuerpo comprende un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) en el que la secuencia de aminoácidos de al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, estando **caracterizada** dicha proteína por su capacidad de unirse a un antígeno.

21. La proteína de la reivindicación 20, en la que dos o más de dos ¹⁰F_n3 están unidos covalentemente entre sí.

22. La proteína de la reivindicación 1 ó 2, en la que dicho antígeno es una proteína.

23. Una composición que comprende la proteína de la reivindicación 1 ó 2 y un vehículo fisiológicamente aceptable.

24. Una proteína de la reivindicación 1 ó 2 para uso en terapia o diagnóstico.

25. Un ácido nucleico que codifica la proteína de la reivindicación 1 ó 2.

26. El ácido nucleico de la reivindicación 25, sendo dicho ácido nucleico ADN o ARN.

27. Un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo de la reivindicación 1, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) aleatorizar el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos de cada uno de los bucles comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural;

(b) poner en contacto un antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.

28. Un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo de la reivindicación 2, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) aleatorizar al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG y extender el bucle DE en longitud de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos del bucle comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, y en el que el bucle DE de dicho ¹⁰F_n3 está extendido en longitud respecto al ¹⁰F_n3 humano de origen natural;

(b) poner en contacto un antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.

29. Un procedimiento para obtener una proteína similar a anticuerpo que se une a un antígeno, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) aleatorizar al menos un bucle seleccionado del grupo constituido por el bucle BC, el bucle DE y el bucle FG de un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3), creando así una colección de proteínas que comprenden un décimo dominio de fibronectina de tipo III en el que la secuencia de aminoácidos del bucle comprende una o más alteraciones de aminoácidos respecto a la secuencia de un décimo dominio de fibronectina de tipo III humano de origen natural, en el que cada proteína está unida covalentemente a un ácido nucleico que codifica la proteína;

(b) poner en contacto dicho antígeno con las proteínas, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de antígeno-proteína;

(c) seleccionar un complejo de antígeno-proteína; y

(d) obtener, a partir de dicho complejo, dicha proteína que se une a dicho antígeno.

ES 2 329 959 T3

30. El procedimiento de las reivindicaciones 27, 28 ó 29, comprendiendo adicionalmente dicho procedimiento aleatorizar al menos un bucle de dicha proteína obtenida en la etapa (b) y repetir dichas etapas (b), (c) y (d) usando dicha proteína aleatorizada adicionalmente.

5 31. Un procedimiento para obtener un compuesto que se une a una proteína de la reivindicación 1 ó 2, comprendiendo dicho procedimiento:

(a) poner en contacto dicha proteína con un compuesto candidato, llevándose a cabo dicho contacto en condiciones que permitan la formación de complejo de compuesto-proteína; y

10

(b) obtener, a partir de dicho complejo, dicho compuesto que se une a dicha proteína.

15

32. El procedimiento de la reivindicación 31, comprendiendo dicho procedimiento adicionalmente modificar dicho compuesto obtenido en la etapa (b) y repetir dichas etapas (a) y (b) usando dicho compuesto modificado adicionalmente.

33. El procedimiento de las reivindicaciones 27, 28, 29 ó 31, en el que dicho antígeno o compuesto es una proteína.

20

34. El procedimiento de las reivindicaciones 27, 28 ó 29, en el que dicho antígeno se inmoviliza sobre un soporte sólido.

35. El procedimiento de la reivindicación 31, en el que dicha proteína se inmoviliza sobre un soporte sólido.

25

36. El procedimiento de la reivindicación 34 ó 35, en el que dicho soporte sólido es una columna o un microchip.

30

35

40

45

50

55

60

65

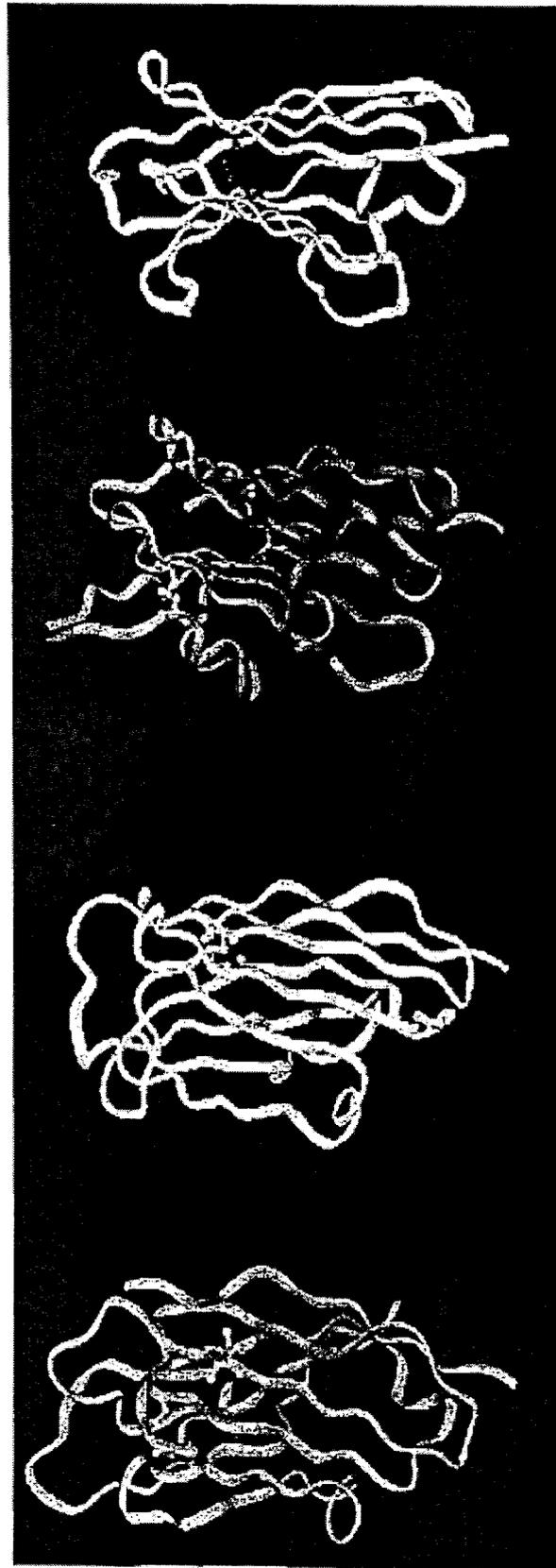


Fig. 1

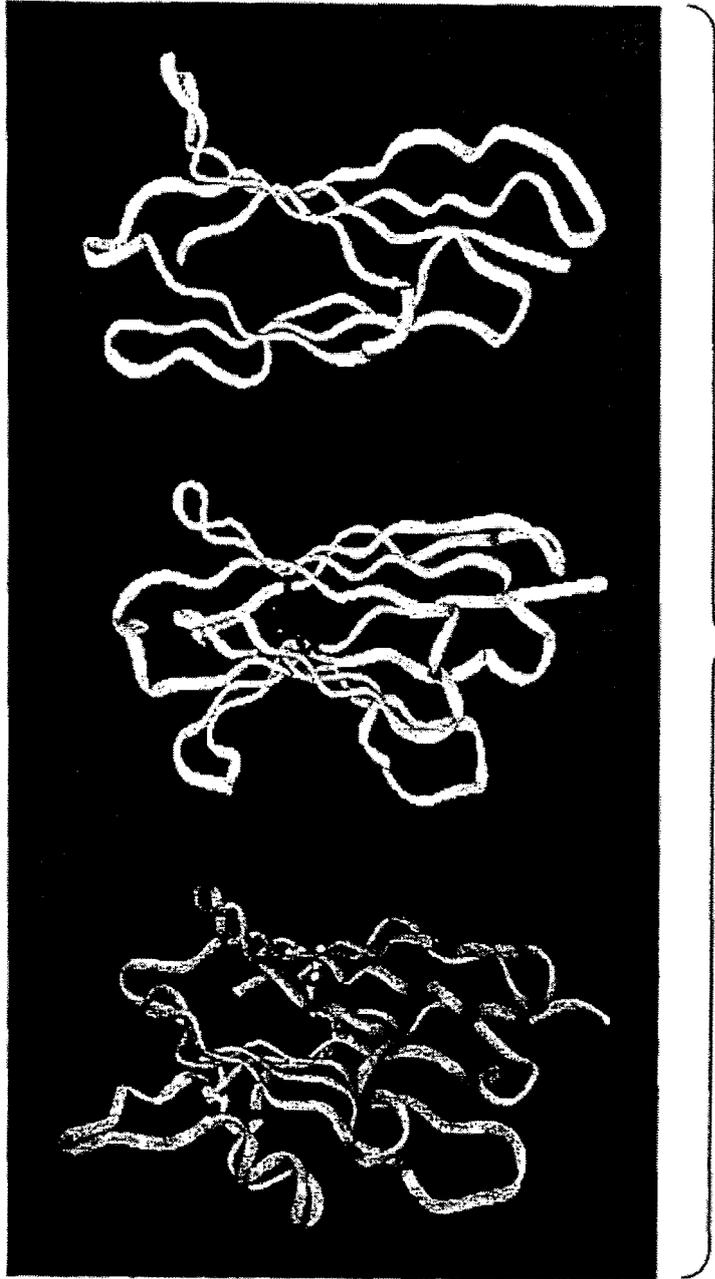


Fig. 2

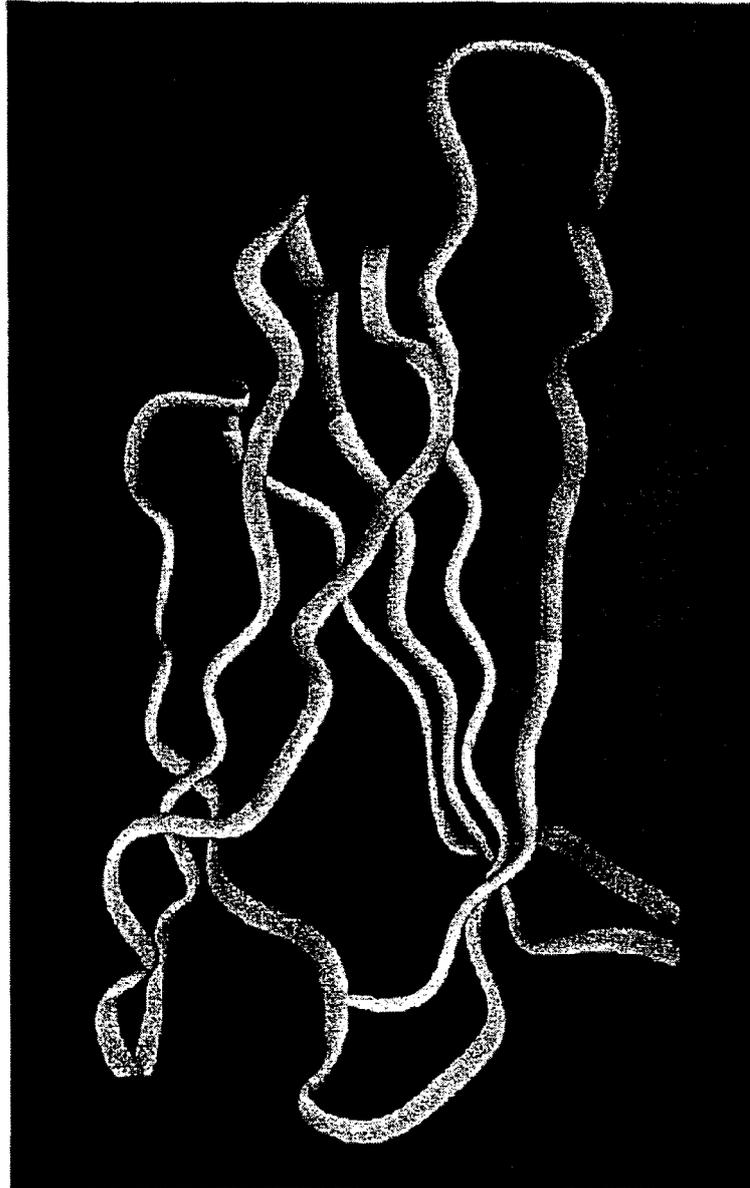


Fig. 3

	1	9 10	19 20	29 30	37	38	47 48	57 58	67 68	77 78	87 88	
Hs FND	VSDVPRD-LE	VVAATPTSLL	ISWDAPAVTV	RYRITYG--	ETGNSPVOE	ETGNSPVOE	FTVPGSKSTA	TISGLKPGVD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	ISINVRT	94
Bt FN	VSDVPRD-LE	VLAATPTSLL	ISWDAPAVTV	RYRITYG--	ETGNSPVOE	ETGNSPVOE	FTVPGSKSTA	TISGLKPGVD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	VSINVRT	94
Rn FN	VSDVPRD-LE	VIASTPTSLL	ISWEPpAVSV	RYRITYG--	ETGNSPVOE	ETGNSPVOE	FTVPGSKSTA	TIRNLIKPGAD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	VSINYQT	1510
Nm FN	VSDVPRD-LE	VIASTPTSLL	ISWEPpAVSV	RYRITYG--	ETGNSPVOE	ETGNSPVOE	FTVPGSKSTA	TIRNLIKPGAD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	VSINYKT	1611
Oc FN	VSDVPRD-LE	VIASTPTSLL	ISWEPpAVTV	RYRITYG--	ETPN-----	ETPN-----	FTVPGSKSTA	TIRNLIKPGAD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	VSINYKT	712
Gg FN	VSDVPRD-LE	VNDTSPTSLE	ISWDAPAVTV	RYRITYG--	ETGNSPVOE	ETGNSPVOE	FTVPGNSIA	TISGLKPGVD	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	VTVYTKT	64
Xl FN	VSDVPRD-LE	VTSSPMTUT	ISWEPpAVSV	RYRITYS--	QTGChEPKE	QTGChEPKE	FTVPGNSIA	TIRNLIKPGVS	YTIIVYAVTG	RGDSPASSKP	LTILHKT	443
Cf FN	AIDAPN-Lr	FLATTPNSLL	VSMOPPrARI	TYIINKYe--	KGSPPrEV	KGSPPrEV	PrDfPGVTeA	TIRGLePGTE	YTIQVIALKd	NKXSePLIGI	KTKDEL-	1611
Ec FN	AIDAPN-Lh	FLATTPNSLL	ISWOPPrARI	TYIINKYe--	KGSPPrEV	KGSPPrEV	PrDfPGVTeA	TIRGLePGTE	YTIQVIALKd	NKXSePLIGI	KTKDEL-	197
Hs TC	V8-PPKD-Lv	VteVTeetFN	LAWDn-eMrv	TeYLVVYTP-	-THEGLEMQ	-THEGLEMQ	PrVPGDQrST	IiQeLePGVE	YFIrVFAiLe	NKXSiPvSAR	V-----	686
Ss TP	V8-PPKD-Li	VteVTeetFN	LAWDn-eMrv	TeYLVVYTP-	-THEGLEMQ	-THEGLEMQ	PrVPGDQrST	IiQeLePGVE	YFIrVFAiLe	NKXSiPvSAR	V-----	686
Nm TX	MIDGPQD-Lr	VVAVTPITLD	LSWlrfPQaev	DcFVVSIV--	--SAGGrVI	--SAGGrVI	LeVPPeADcT	QlAdLMPGVE	YVwVTAERG	HAVSYDASiR	ANTG----	889
Hs CAP	TIPVPrVSLn	IYdVGPtTMH	VQWQD-VGGA	TGYILSYKfV	KDTEPrPK	KDTEPrPK	VrLGPtVNDn	QlAdLMPGVE	YVwVTAERG	HAVSYDASiR	ANTG----	1551
Oc C12	TIPVPrVSLn	IYdVGPtTMH	VQWQD-VGGA	TGYILSYKfV	KDTEPrPK	KDTEPrPK	VrLGPtVNDn	QlAdLMPGVE	YVwVTAERG	HAVSYDASiR	ANTG----	322
Gg C14	LalpmASDLk	LYdVShSSMR	AKVnG-VAGA	TGYMLIYAPL	TEGLAJdEKE	TEGLAJdEKE	IKIGEASTeL	QdVlLRdVTH	YVwVYAMF-	-----	-----	508
Hs U1	LalpmASDLl	LYdVtensSR	VKWDa-VpGA	SGYLLIYAPL	TEGLAGdEKE	TEGLAGdEKE	KIIGETHeRdI	ELSGLLPnTE	YVwVYAMFg	eeASDpVTGq	e-----	321

VAR.

cons.	P	L	V	SL	M	N	V	Y	I	Y	I	L	I	L	PGVD	Y	ITV	A	G	E	R	P	
CAP																							
C12																							
FND																							
FN																							
TF																							
TC																							
U1																							

CAP	precursor de colágeno alfa	NEGRITA	idéntico a Hs FND
C12	colágeno de tipo 12	minúscula	sustitución no conservativa (inversión de carga, cambio entre hidrófobo y cargado, adición o retirada de P)
FND	dominio de fibronectina de tipo III		posición de sustituciones no conservativas
FN	fibronectina		
TF	precursor de tenascina		
TC	tenascina C		
U1	undulina 1		
Bt	<i>Bovis taurus</i>		vaca
Cf	<i>Canis familiaris</i>		perro
Ec	<i>Equus caballus</i>		caballo
Ss	<i>Sus scrofa</i>		cerdo
Hs	<i>Homo sapiens</i>		ser humano
Oc	<i>Oryctolagus cuniculus</i>		conejo
Xl	<i>Xenopus laevis</i>		rana de uñas africanas

Fig. 4



Fig. 5

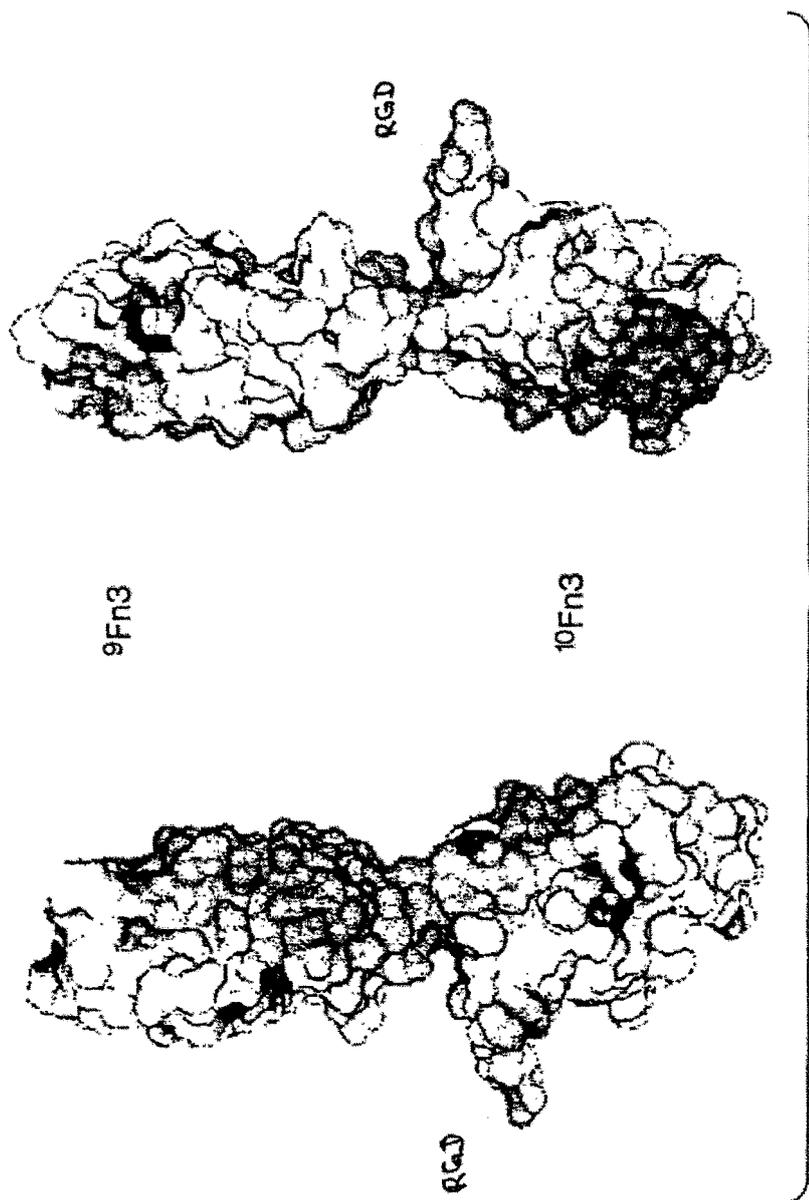
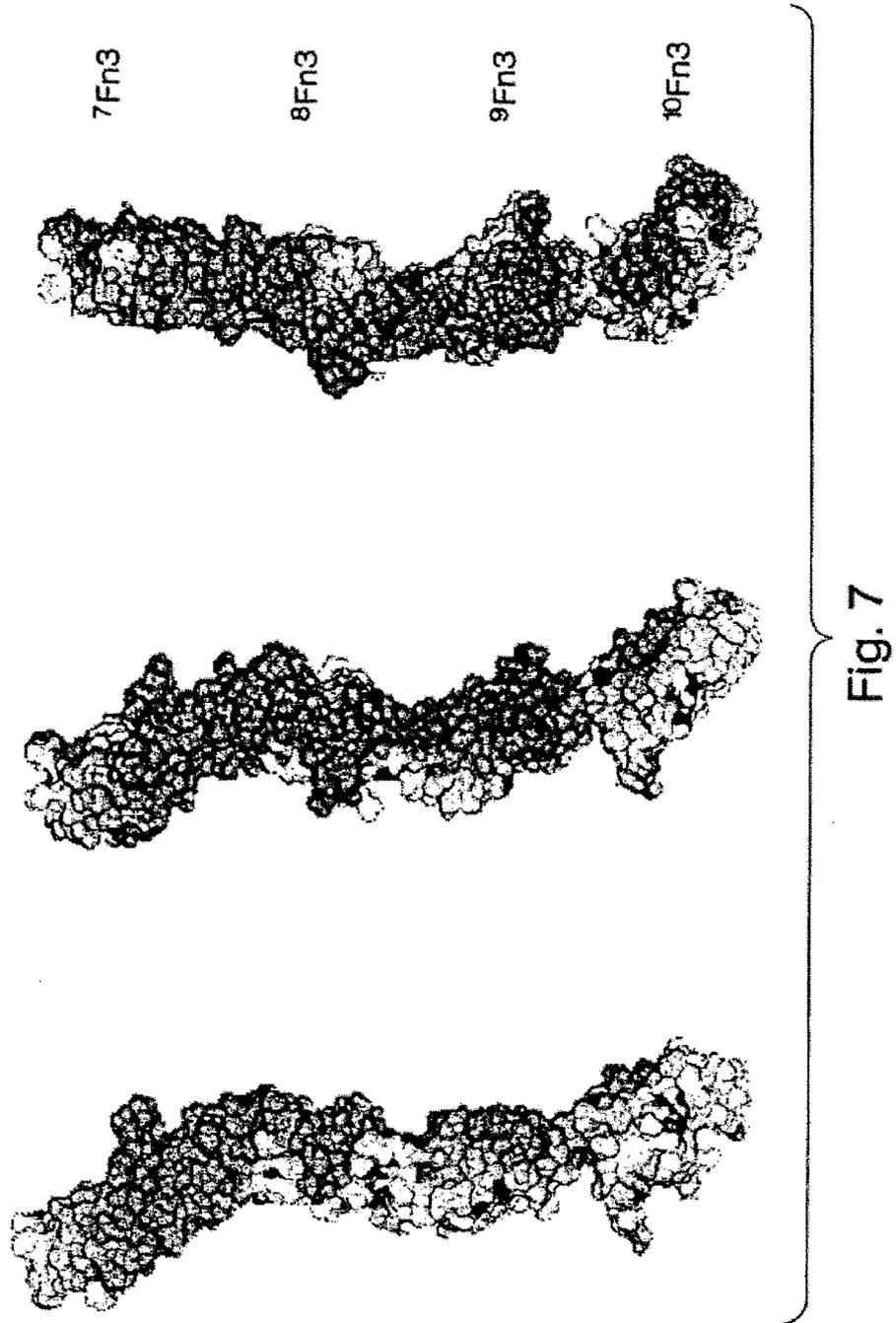


Fig. 6



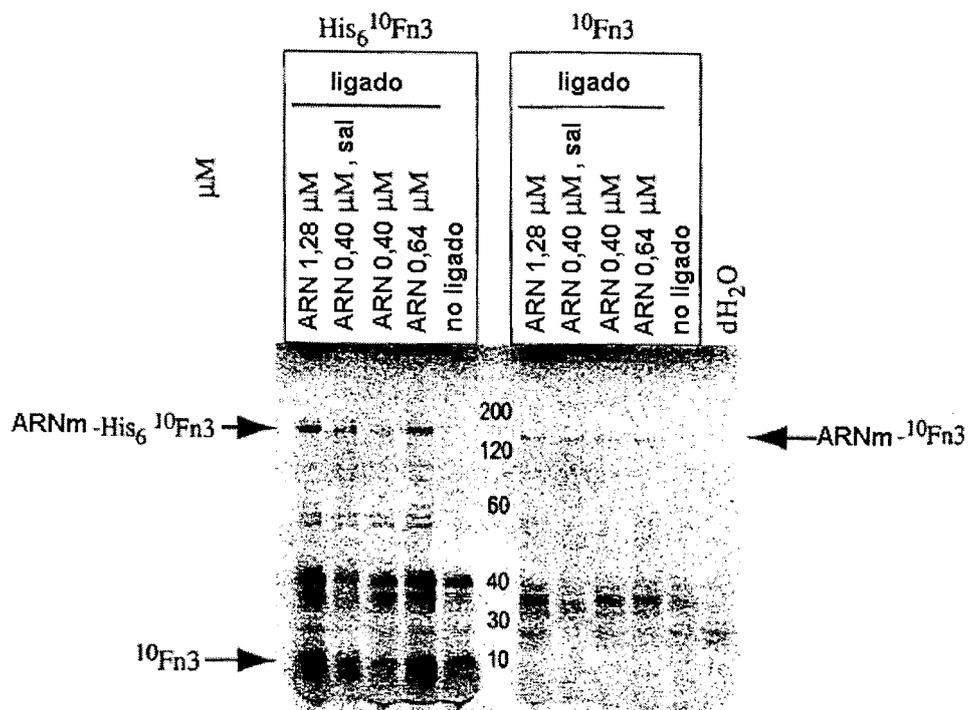


Fig. 8

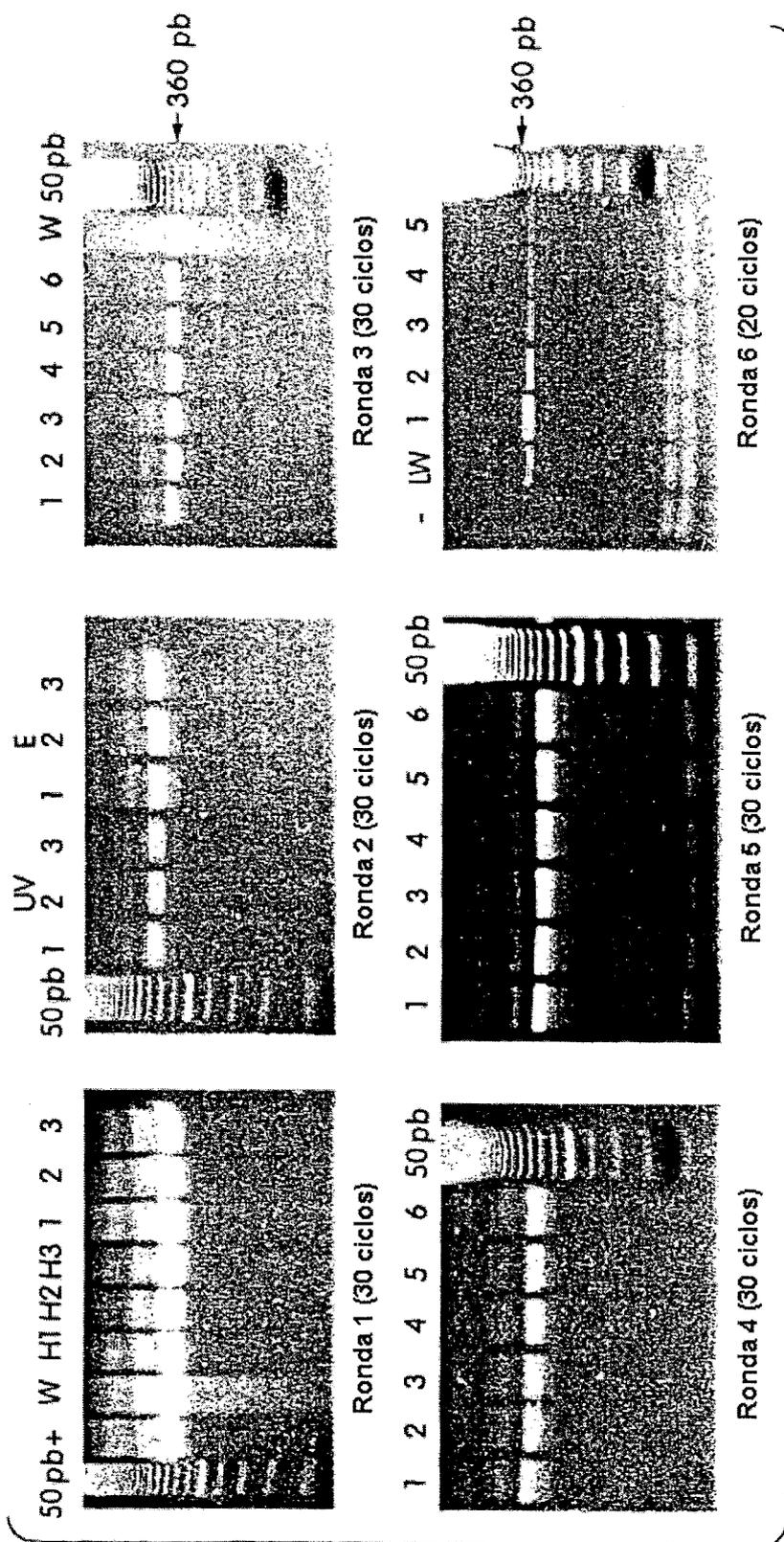


Fig. 9

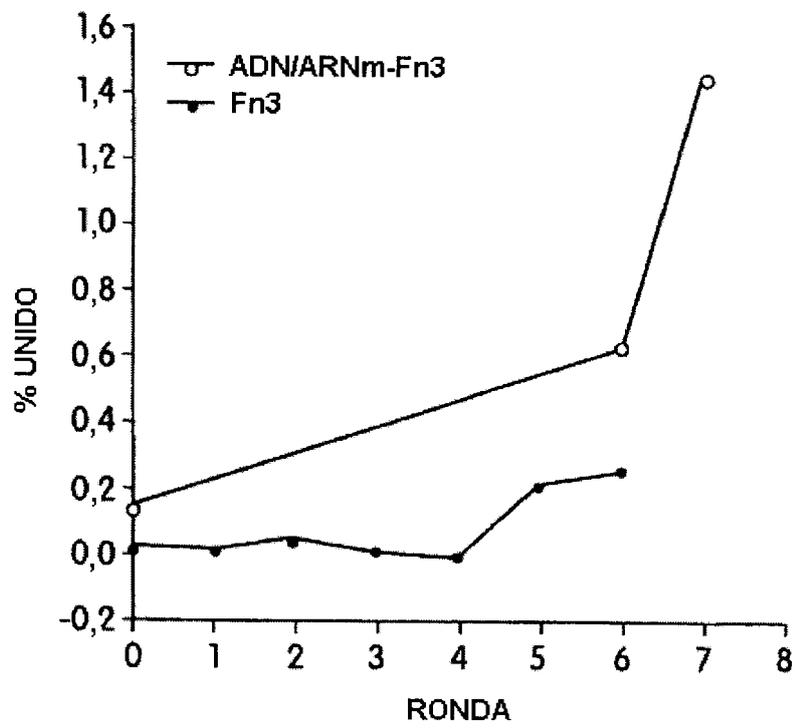


Fig. 10

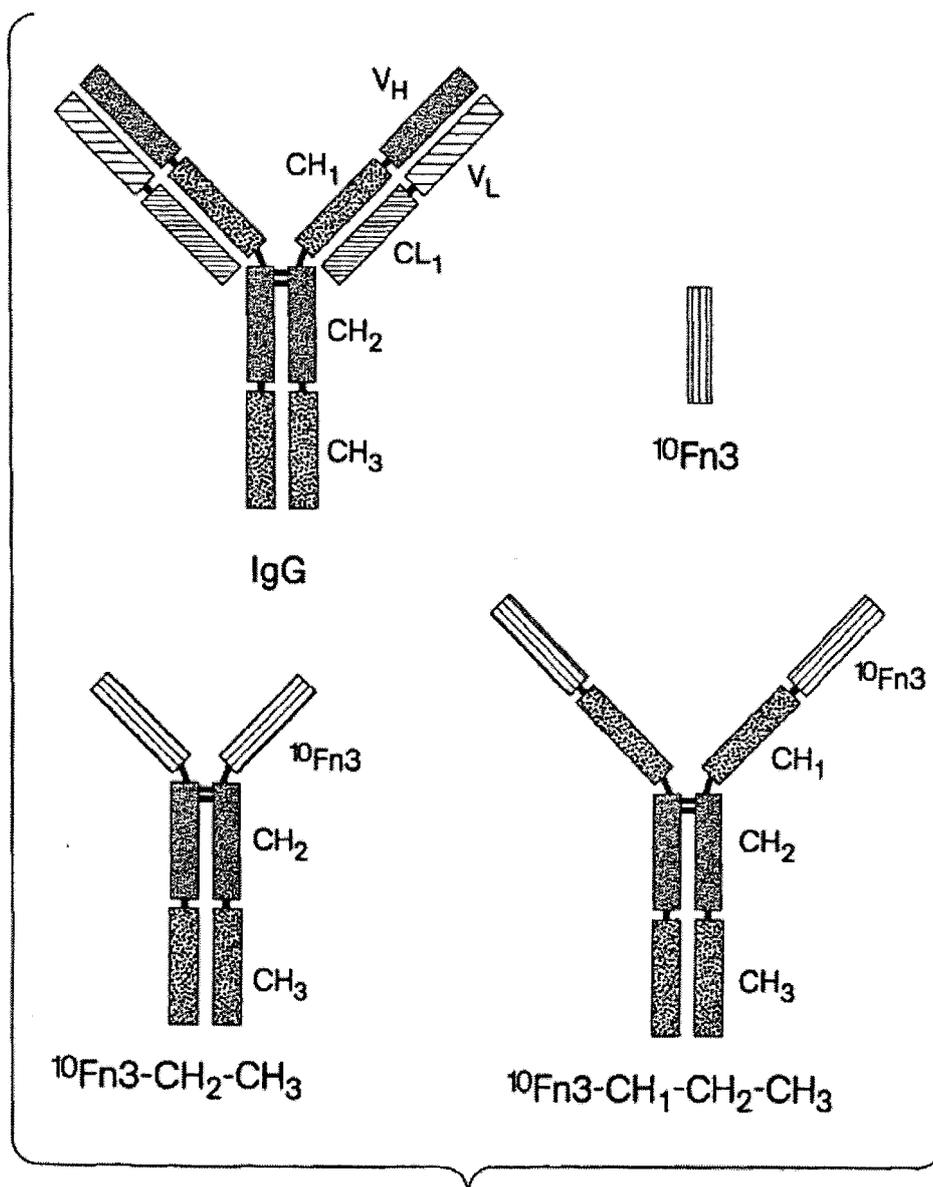


Fig. 11

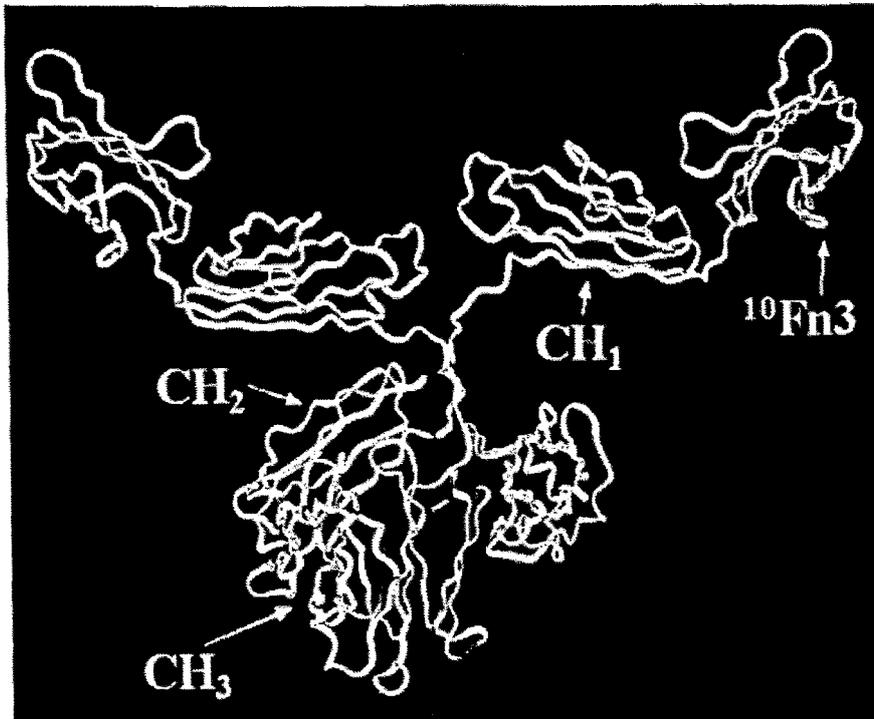


Fig. 12

ES 2 329 959 T3

LISTA DE SECUENCIAS

- <110> Phylos, Inc.
- 5 <120> ARMAZONES DE PROTEÍNA PARA MIMÉTICOS DE ANTICUERPO Y OTRAS PROTEÍNAS DE UNIÓN
<130> 50036/021WO2
<150> 60/111.737
<151> 10-12-1998
- 10 <160> 21
<170> FastSEQ para Windows versión 4.0
<210> 1
- 15 <211> 122
<212> ADN
<213> *Homo sapiens*
- 20 <400> 1
- ```
 ggaattccta atacgactca ctatagggac aattactatt tacaattaca atgcatcacc 60
 atccacatca cgtttctgat gttccgaggg acctggaagt tgttgctgcg acccccacca 120
 gc 122
```
- <210> 2  
<211> 104  
30 <212> ADN  
<213> *Homo sapiens*
- <400> 2
- 35
- ```
          ggaattccta atacgactca ctatagggac aattactatt tacaattaca atggtttctg      60
          atgttccgag ggacctggaa gttgttgctg cgacccccac cagc                       104
```
- 40 <210> 3
<211> 126
<212> ADN
45 <213> *Homo sapiens*
- <220>
<221> misc_feature
- 50 <222> (1)...(126)
<223> n= A, T, C o G
<221> misc_feature
<222> (1)...(126)
- 55 <223> s= C o G
- <400> 3
- 60
- ```
 ageggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgctcttc cctgtttctc cgtaagtgat 60
 cctgtaatat ctannsnnsn nsnnsnnsnn snccagctg atcagtaggc tggtaggggt 120
 cgcagc 126
```
- 65 <210> 4  
<211> 62

## ES 2 329 959 T3

<212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

5 <400> 4

**agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgctcttc cctgtttctc cgtaagtgat** 60  
**cc** 62

10

<210> 5  
 <211> 99  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

15

<400> 5

20

**ggaattccta atacgactca ctatagggac aattactatt tacaattaca atgcatcacc** 60  
**atcaccatca cctcttcaca ggaggaaata gccctgtcc** 99

25

<210> 6  
 <211> 132  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

30

<220>  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(132)

35

<223> n= A, T, C o G  
 <221> misc\_feature  
 <222> (1)...(132)

40

<223> s= C o G  
 <400> 6

45

**agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgctcttc gtataatcaa ctccaggttt** 60  
**aaggccgctg atggtagctg tsnnsnnsnn snnaggcaca gtgaactcct ggacagggct** 120  
**atttcctcct gt** 132

50

<210> 7  
 <211> 64  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

55

<400> 7

60

**agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgctcttc gtataatcaa ctccaggttt** 60  
**aagg** 64

65

<210> 8  
 <211> 101  
 <212> ADN  
 <213> *Homo sapiens*

## ES 2 329 959 T3

<400> 8

ggaattccta atacgactca ctatagggac aattactatt tacaattaca atgcatcacc 60  
atcacatca cctcttctat accatcactg tgtatgctgt c 101

5

<210> 9

<211> 114

<212> ADN

10 <213> *Homo sapiens*

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1)...(114)

15 <223> n= A, T, C o G

<221> misc\_feature

<222> (1)...(114)

20 <223> s= C o G

<400> 9

agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgtgctgg taattaatgg aaattggsnn 60  
snnnsnnsnns nnsnnsnnsn nsnnsnngt gacagcatac acagtgatgg tata 114

<210> 10

<211> 57

30 <212> ADN

<213> *Homo sapiens*

<400> 10

35 agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtcgtgctgg taattaatgg aaattgg 57

<210> 11

<211> 45

40 <212> ADN

<213> Fago T7 y virus del mosaico del tabaco

<400> 11

45 gcgtaatagc actcactata gggacaatta ctattacaa ttaca 45

<210> 12

<211> 33

50 <212> ADN

<213> Secuencia artificial

<220>

55 <223> Secuencia FLAG

<400> 12

60 agcggatgcc ttgtcgtcgt cgtccttgta gtc 33

<210> 13

<211> 19

<212> ADN

65 <213> Secuencia artificial

<220>

## ES 2 329 959 T3

<223> Oligonucleótido puente  
<221> misc\_feature  
<222> (1)...(19)  
5 <223> n= A, T, C o G  
  
<400> 13  
          **tttttttn agcggatgc**          19  
10  
<210> 14  
<211> 20  
<212> ADN  
15 <213> Secuencia artificial  
<220>  
<223> Oligonucleótido engarce de puromicina  
  
20 <400> 14  
          **aaaaaaaaaaaa aaaaaaaaaacc**          20  
  
<210> 15  
25 <211> 30  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
  
30 <400> 15  
          **gcggcagggt tgcttactg gggccaaggg**          30  
  
<210> 16  
35 <211> 27  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
  
40 <400> 16  
          **gggaggggtg gaggtaggtc acagtcc**          27  
  
<210> 17  
45 <211> 30  
<212> ADN  
<213> *Mus musculus*  
  
50 <400> 17  
          **ttgttagct ttaccaggag agtgggaggc**          30  
  
55 <210> 18  
<211> 33  
<212> ADN  
60 <213> *Mus musculus*  
  
<400> 18  
          **aaaaagcttg ccaaaacgac acccccatct gtc**          33  
65  
<210> 19  
<211> 33

## ES 2 329 959 T3

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

5 <400> 19

catatgggtt ctgatattcc gagagatctg gag 33

<210> 20

10 <211> 43

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

15 <400> 20

catatgcatc accatcacca tcacgttct galattccga gag 43

<210> 21

20 <211> 30

<212> ADN

<213> *Mus musculus*

25 <400> 21

gaaticctat gtttataat tgatggaac 30

30

35

40

45

50

55

60

65