

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 533 874**

51 Int. Cl.:

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/62 (2006.01)

C07K 14/78 (2006.01)

C40B 40/10 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **31.10.2008 E 08845766 (8)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **07.01.2015 EP 2215246**

54 Título: **Armazón proteico**

30 Prioridad:

31.10.2007 US 984209 P

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

15.04.2015

73 Titular/es:

**MEDIMMUNE, LLC (100.0%)
ONE MEDIMMUNE WAY
GAITHERSBURG, MD 20878, US**

72 Inventor/es:

**WU, HERREN;
BACA, MANUEL;
SWERS, JEFFREY y
CHACKO, BENOY**

74 Agente/Representante:

ISERN JARA, Jorge

ES 2 533 874 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

Armazón proteico

5 1. Campo de la invención

La presente invención se refiere a armazones proteicos que se unen específicamente a diana y a métodos para preparar, explorar y usar dichos armazones.

10 2. Antecedentes de la invención

La presente invención se refiere a armazones proteicos útiles, por ejemplo, para la generación de productos que tengan nuevas características de unión.

15 Como reactivos para el diseño de productos modificados técnicamente pueden usarse proteínas que tienen estructuras tridimensionales relativamente definidas, que normalmente reciben el nombre de armazones proteicos. Estos armazones contienen típicamente una o más regiones sensibles a variación de secuencia específica o al azar, y dicha distribución de secuencia al azar se lleva a cabo con frecuencia para producir bibliotecas de proteínas a partir de las cuales pueden seleccionarse productos deseados. Un área particular en el que dichos armazones son
20 útiles es en el campo del diseño de miméticos de anticuerpos.

Aunque en el comercio se conocen anticuerpos terapéuticos con algunos ejemplos satisfactorios (HERCEPTIN®, AVASTIN®, SYNAGIS®), hay un creciente interés en la generación de fragmentos de anticuerpo como proteínas terapéuticas. Las ventajas son la facilidad de realizar la manipulación mediante técnicas de biología molecular para
25 obtener características de unión deseadas, la capacidad de expresar dichos fragmentos en sistemas microbianos, y la expectativa de que los fragmentos de anticuerpo tengan mejor penetración tisular que los anticuerpos de longitud completa. Un ejemplo es REOPRO®.

Además, ha habido intentos para desarrollar productos terapéuticos pequeños que no son anticuerpos, es decir, miméticos de anticuerpos, para aprovechar las ventajas de los anticuerpos y fragmentos de anticuerpos, tales como
30 unión de alta afinidad de dianas y baja inmunogenicidad y toxicidad, evitando a la vez algunos de los inconvenientes, tales como la necesidad de enlaces disulfuro intradominio que requieren replegamiento apropiado, y la tendencia de los fragmentos de anticuerpo a agregarse y ser menos estables que los IgG de longitud completa. Un ejemplo es un armazón de "minicuerpo", que está relacionado con el plegamiento de inmunoglobulina, que se diseña suprimiendo
35 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 restos y puede usarse para presentar dos bucles hipervariables, de forma muy similar a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) en anticuerpos. Estos dos bucles se han distribuido al azar y los productos se han seleccionado para la unión al antígeno, pero hasta la fecha el armazón parece tener una utilidad algo limitada debido a problemas de solubilidad. Otro armazón usado para presentar
40 bucles ha sido tendamistat, una proteína pequeña inhibidora de α -amilasa, que contiene un sándwich de lámina beta de seis cadenas, de 74 restos, que se mantiene unido por dos enlaces disulfuro y que forma 3 bucles de tipo CDR (*McConnell y Hoess, J. Mol. Biol. 250:460, 1995*).

Otras proteínas se han ensayado como estructuras y se han usado para presentar restos distribuidos al azar en
45 superficies helicoidales 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 restringidos por puentes disulfuro, tales como los de los inhibidores de proteasas 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*).

50 *Koide A et al.: "The fibronectin type III domain as a scaffold for novel binding proteins", Journal Of Molecular Biology, vol. 284, Nº 4, 11 diciembre 1998 (1998-12-11), páginas 1141-1151* describen la preparación de una biblioteca de presentación de fagos de FN3 en la que en dos bucles de superficie se distribuyeron restos al azar. Se seleccionaron FN3 mutantes que se unían a un ligando de ensayo, la ubiquitina, con afinidades significativas; el FN3 de tipo silvestre no mostró afinidad medible.

60 *Batori V et al.: "Exploring the potential of the monobody scaffold: effects of loop elongation on the stability of a fibronectin type III domain", Protein Engineering, vol. 15, Nº 12, 1 de enero de 2002, páginas 1015-1020*, describen el desarrollo de miméticos de anticuerpos pequeños, 'monocuerpos', usando como armazón el décimo dominio de fibronectina de tipo III de fibronectina humana (FNfn10). Inicialmente, se realizaron alteraciones en dos bucles de FNfn10 que eran estructuralmente equivalentes a dos de los bucles hipervariables del dominio de inmunoglobulina. Para evaluar la posibilidad de utilizar otros bucles en FNfn10 para la unión con diana, se investigaron los efectos de la elongación de cada bucle en la estabilidad conformacional de FNfn10. Los resultados sugirieron que todos los bucles, excepto el bucle EF, podrían usarse para modificar técnicamente un sitio de unión.

65

Koide Akiko et al.: "Monobodies: antibody mimics based on the scaffold of the fibronectin type III domain", *Methods in Molecular Biology*, vol. 352, 1 de enero de 2007, páginas 95-109, describen el uso del décimo dominio de fibronectina de tipo III de fibronectina humana (FNfn10) como un almacén para presentar múltiples bucles de superficie para la unión con diana.

Karatan E et al.: "Molecular Recognition Properties of FN3 Monobodies that Bind the Src SH3 Domain", *Chemistry and Biology*, Current Biology, vol. 11, Nº 6, 1 de junio de 2004, páginas 835-844, describen la construcción de una biblioteca de presentación de fagos basada en el almacén del décimo dominio de fibronectina humana de tipo III (FN3) distribuyendo al azar restos en sus bucles FG y BC. Para analizar las propiedades de reconocimiento de los agentes de unión seleccionados se realizaron experimentos de unión competitiva, de reemplazo de bucles y de perturbación por RMN.

El documento WO 2005/056764 A2 describe polipéptidos de único dominio que se unen con el receptor del factor de crecimiento endotelial vascular 2 (VEGFR-2).

Gill D S et al.: "Biopharmaceutical drug discovery using novel protein scaffolds", *Current Opinion In Biotechnology*, vol. 17, Nº 6, 1 de diciembre de 2006, páginas 653-658, revisaron el desarrollo de nuevas tecnologías de almacén proteico, incluyendo anticuerpos de único dominio, productos inmunofarmacéuticos modulares pequeños, tetranectinas, AdNectinas, proteínas de dominio A, lipocalinas y proteínas de repetición de ankirina.

El documento US 6 818 418 B1 (*Lipovsek et al.*) desvela proteínas que incluyen un dominio de fibronectina de tipo III que tiene al menos un bucle distribuido al azar.

Por lo tanto, existe la necesidad de desarrollar moléculas de tipo anticuerpo artificiales, estables, pequeñas para una diversidad de aplicaciones terapéuticas y diagnósticas.

La cita o el análisis de una referencia en el presente documento no debería interpretarse como una admisión de que esta es técnica anterior de la presente invención.

3. Sumario de la invención

La presente invención proporciona un almacén polipeptídico recombinante que comprende:

I. siete dominios de cadena beta designados A, B, C, D, E, F y G;

II. unidos a seis regiones de bucle, en las que una región de bucle conecta con cada cadena beta y se denomina bucle AB, BC, CD, DE, EF, y FG;

III. en el que al menos una región de bucle es una variante de origen no natural de la región de bucle afín en SEC ID Nº: 1; y

IV. en el que dicho almacén comprende al menos un enlace disulfuro para unir cualquiera de dos de dichos siete dominios de cadena beta, en el que dicho almacén comprende las secuencias de cadena beta correspondientes al tercer dominio de fibronectina III de tenascina C, Tn3^{SS3} (SEC ID Nº: 65), o Tn3^{SS4} (SEC ID Nº: 66); o en el que dicho almacén comprende al menos dos enlaces disulfuro para unir cualquiera de dos dichos siete dominios de cadena beta, en el que dicho almacén comprende las secuencias de cadena beta correspondientes a Tn3^{SS3+4} (SEC ID Nº: 67).

Preferentemente, un almacén de la invención se une con una diana.

Preferentemente, en un almacén de la invención, dicho bucle BC comprende:

9 aminoácidos que tienen una secuencia de S-X-a-X-b-X-X-X-G, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa prolina o alanina y en la que (b) representa alanina o glicina; u

11 aminoácidos que tienen una secuencia de S-P-c-X-X-X-X-T-G, en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (c) representa prolina, serina o glicina; o

12 aminoácidos que tienen una secuencia de A-d-P-X-X-X-e-f-X-l-X-G, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (d) representa prolina, glutamato o lisina, en la que (e) representa asparagina o glicina, y en la que (f) representa serina o glicina.

Preferentemente además, en un almacén de la invención, dicho bucle FG comprende:

9 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-G-X-X-X-S, en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina; o

10 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-X-b-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina y en la que (b) representa serina o glicina; u

11 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido, y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

En realizaciones preferidas del almacén de la invención, dicha diana es un antígeno de superficie celular, un antígeno soluble, un antígeno inmovilizado, un antígeno inmunosilencioso, un antígeno intracelular, un antígeno

intranuclear, un autoantígeno, un antígeno no propio, un antígeno de cáncer, un antígeno bacteriano o un antígeno viral.

5 Más preferentemente, un armazón de la invención, se conjuga con un agente heterólogo, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en: otro armazón, polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humana (HSA), una región Fc de un anticuerpo, una molécula de IgG, un péptido de unión, fármaco citotóxico, un radiomarcador, un agente formador de imágenes, una etiqueta de His, Biotina, una etiqueta Flag, un ácido nucleico y una citocina.

10 La invención proporciona un armazón multimérico que comprende al menos dos armazones de la invención, en el que dichos armazones están unidos por otro armazón, una molécula de IgG o un fragmento de la misma, una región de Fc, un dominio de dimerización, una reticulación química, un enlace disulfuro o un enlazador de aminoácidos.

15 La invención proporciona una biblioteca de presentación de polipéptidos que comprende un armazón de la invención, en el que al menos la longitud y/o diversidad de una región de bucle está distribuida al azar.

Preferentemente, una biblioteca de presentación de polipéptidos de la invención se presenta en la superficie de un ribosoma, un bacteriófago, un virus, una bacteria o una levadura.

20 La invención proporciona un método para obtener un armazón polipeptídico que se une con una diana, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un ligando diana con la biblioteca de la invención en condiciones que permiten que se forme un complejo de armazón: ligando diana, y (b) obtener del complejo, el armazón que se une con el ligando diana.

25 El método de la invención también puede comprender distribuir al azar al menos un bucle de dicho armazón de la proteína obtenido en la etapa (b) para generar un armazón adicional distribuido al azar y repetir las etapas (a) y (b) usando dicho armazón adicional distribuido al azar.

30 Adicionalmente la invención proporciona una composición estéril, apirógena, que comprende un armazón de la invención y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

35 En el presente documento se describe una familia de armazones proteicos de origen no natural, recombinantes, capaces de unirse con cualquier compuesto de interés. En particular, las proteínas descritas en el presente documento pueden usarse para presentar bucles definidos que son análogos a las regiones determinantes de la complementariedad ("CDR") de una región variable de anticuerpo. Estos bucles pueden someterse a distribución al azar o evolución restringida para generar la diversidad necesaria para unirse con una multitud de compuestos diana. Las proteínas pueden ensamblarse en armazones multiespecíficos capaces de unirse con diferentes dianas.

40 Los inventores describen armazones polipeptídicos de origen no natural, recombinantes, que comprenden una pluralidad de dominios de cadena beta unidos con una pluralidad de regiones de secuencia de bucle derivadas de una secuencia proteica de origen natural, en la que una o más de dichas secuencias de región de bucle varían por delección, sustitución o adición en al menos un aminoácido de las secuencias de bucle correspondientes en la secuencia proteica de origen natural, y en la que los dominios de cadena beta del armazón polipeptídico tienen al menos 50 % de homología con las secuencias de dominio correspondientes de una secuencia proteica de origen natural. En algunas realizaciones descritas en el presente documento, la secuencia de origen natural es la secuencia proteica correspondiente a la tenascina C humana. En particular, estos armazones incluyen el tercer dominio de FnIII de tenascina C (también conocido como el dominio "Tn3"). En realizaciones específicas descritas, los armazones comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 1, 5-32, 64-67 y 210. En otras realizaciones específicas, un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 33-59 puede codificar los armazones.

50 En otras realizaciones descritas en el presente documento, la secuencia de origen natural corresponde a un motivo estructural Tn3 predicho, tal como los derivados de un organismo termófilo, por ejemplo, pero sin limitación, *Archaeoglobus fulgidus*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, y *Sulfolobus tokodaii*.

55 En realizaciones específicas, los armazones comprenden una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 2-4, 68-88, y 210. En otras realizaciones específicas, un ácido nucleico que comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en las SEC ID Nos: 89-98 puede codificar los armazones.

60 En otro aspecto descrito en el presente documento, los armazones también incluyen armazones estabilizados por disulfuro. Los armazones estabilizados por disulfuro muestran estabilidad potenciada, medida por tolerancia térmica, resistencia a desnaturalización caotrópica y tratamiento con proteasas.

65 Los armazones se modifican técnicamente para unirse con dianas de interés, como se describe en el presente documento. Dicha unión puede, por ejemplo, mostrar una afinidad de al menos 100 μ M.

También se describen armazones multiméricos que comprenden al menos dos armazones desvelados en el presente documento (conocidos en lo sucesivo en el presente documento como "armazones multiméricos"). En algunas realizaciones, los armazones multiméricos comprenden al menos dos armazones unidos, por ejemplo, pero sin limitación, por un dominio de dimerización, un enlazador de aminoácidos, un enlace disulfuro, un reticulante químico, y una molécula de IgG o fragmento de la misma, o una región Fc.

También se describen bibliotecas de presentación de polipéptidos que comprenden una pluralidad de armazones. Las bibliotecas son útiles para capturar e identificar armazones de unión a diana para construir armazones multiméricos.

Se describen moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican los armazones y las bibliotecas de la invención.

Se describen métodos para preparar, usar, explorar, optimizar, y modificar técnicamente los armazones y las bibliotecas de la invención.

En otro aspecto más, se describen composiciones farmacéuticas que comprenden los armazones de la invención.

Adicionalmente, se describen métodos para tratar, prevenir, mejorar, detectar, diagnosticar o controlar en un paciente una enfermedad o sus síntomas, como se describe en el presente documento, administrando cantidades terapéuticamente eficaces de los armazones desvelados en el presente documento y/o las composiciones farmacéuticas que comprenden los armazones descritos en el presente documento.

En realizaciones específicas, se describen agentes de unión específicos de TRAIL-R2 que son útiles para prevenir, mejorar, detectar, diagnosticar o controlar enfermedades, tales como, pero sin limitación, cáncer. En otras realizaciones específicas, para el tratamiento de cánceres en los que las células cancerosas expresan TRAIL-R2 son útiles armazones de unión específicos de TRAIL-R2. Los cánceres pueden incluir, pero sin limitación, cáncer de pulmón, linfoma no Hodgkin, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer de ovario, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, cáncer de próstata y melanoma.

4. Breve descripción de las figuras

Figura 1. Expresión en células total recombinante de armazones. En este documento se presenta un gel de PAGE teñido con Coomassie de diversos lisados recombinantes de cultivos de *E. coli* que expresan armazones proteicos. Con un asterisco (*) se indican armazones altamente expresados

Figura 2. Expresión y purificación de un armazón basado en Tn3. En este documento se presenta un gel de PAGE teñido con Coomassie que ilustra el armazón basado en Tn3 después de expresión recombinante y purificación. El armazón de Tn3 se purificó fácilmente hasta su homogeneidad.

Figura 3A. Determinación de la temperatura de fusión para un armazón basado en Tn3. El gráfico ilustra la determinación de la curva de fusión térmica del armazón basado en Tn3, medido por calorimetría de exploración diferencial. Se determinó que la T_f era de aproximadamente 45 °C a pH 7,0.

Figura 3B. Perfil de desnaturalización de urea de un armazón basado en Tn3. El gráfico representa el perfil de desnaturalización de un armazón basado en Tn3 en diversas concentraciones de urea a pH 7,5. El cambio de la fluorescencia intrínseca de las moléculas se usó como una medida del desplegamiento de la molécula. Para el armazón de Tn3, el desplegamiento produce un aumento en la intensidad de fluorescencia y un desplazamiento a una longitud de onda mayor. Como se demuestra en la figura, la molécula se pliega a concentraciones bajas de urea (menores de o iguales a 1 M) y comienza a desnaturalizarse a mayores concentraciones de urea. Se calculó que la molaridad a la cual el 50 % de las moléculas se desplegaban era de aproximadamente 2 M.

Figura 3C. Existe un armazón de Tn3 en un estado monomérico. En el gráfico representa los resultados de un análisis de cromatografía de exclusión por tamaño de un armazón de Tn3 purificado para determinar las proporciones relativas de fragmentos contaminantes y/o estructuras de mayor orden. Como se representa por los porcentajes en el gráfico, más de 97 % del armazón se eluyó en forma monomérica (que un detector de dispersión luminica en línea ha determinado que es de aproximadamente 11 kDa) mientras que solamente una pequeña fracción (de aproximadamente 3%) eluyó a un máximo de aproximadamente 21 kDa, posiblemente como un dímero.

Figura 4. Los bucles BC de los armazones demuestran diversidad de longitud de bucle. El gráfico representa la diversidad de longitud de bucle BC de diversos armazones proteicos relacionados con TN3. (A) representa la diversidad de longitud de bucle mostrada por secuencias derivadas de un subconjunto de armazones relacionados con Tn3 de la base de datos de PDB (51 secuencias). (B) representa la diversidad de longitud de bucle mostrada por secuencias derivadas de la base de datos Swiss-Prot (397 secuencias). Como se presenta, el bucle BC de diversos armazones relacionados con TN3 muestra longitudes de 7-26 restos de aminoácidos. De acuerdo con el esquema usado en el presente documento, la longitud de los bucles BC en Tn3 es de 9 restos.

Figura 5. Los bucles FG de los armazones demuestran diversidad de longitud de bucle. El gráfico representa la diversidad de longitud de los bucles FG de diversos armazones proteicos relacionados con Tn3. La figura representa la diversidad de longitud del bucle FG mostrada por secuencias derivadas de un subconjunto de armazones relacionados con Tn3 de la base de datos de PDB. Como se presenta, el bucle FG de los armazones de Tn3 muestra longitudes de 6-18 restos de aminoácidos. De acuerdo con el esquema usado en el presente documento, la longitud del bucle FG en Tn3 es de 10 restos.

Figura 6. Los bucles DE los armazones demuestran diversidad de longitud de bucle. El gráfico representa la diversidad de longitud de los bucles DE diversos armazones proteicos de TN3. La figura representa la diversidad de longitud de bucle DE mostrada por secuencias derivadas de un subconjunto de armazones relacionados con Tn3 de la base de datos de PDB. Como se presenta, el bucle DE armazones relacionados con Tn3 muestra longitudes de aproximadamente 4 a aproximadamente 17 restos de aminoácidos. De acuerdo con el esquema usado en el presente documento, la longitud del bucle DE en Tn3 es de 6 restos.

Figura 7A. Los bucles BC de 9 restos de aminoácidos de los armazones demuestran diversidad de secuencia. El gráfico representa la diversidad de secuencia mostrada por bucles BC de 9 restos de aminoácidos de la base de datos Swiss-Prot (73 secuencias). Usando la herramienta de alineamiento, Weblogo, la incidencia relativa de que un aminoácido aparezca en una posición particular en un bucle BC de 9 de aminoácidos de longitud, se representa por el tamaño del código de una letra encima de la posición particular. Por ejemplo, en la posición 3 de los bucles BC analizados de 9 restos de aminoácidos, el aminoácido más frecuente es Prolina (P), seguido de Alanina (A), seguido de Valina (V).

Figura 7B. Los bucles BC de 12 restos de aminoácidos de los armazones demuestran diversidad de secuencia. El gráfico representa la diversidad de secuencia mostrada por bucles BC de 12 restos de aminoácidos del conjunto de datos de Swiss-Prot (99 secuencias). Usando la herramienta de alineamiento, Weblogo, la incidencia relativa de que un aminoácido aparezca en una posición particular en un bucle BC de 12 de aminoácidos de longitud, se representa por el tamaño del código de una letra encima de la posición particular. Por ejemplo, en la posición 3 de los bucles BC analizados de 12 restos de aminoácidos, el aminoácido más frecuente es Prolina (P), seguido de Glicina (G), seguido de Glutamina (Q).

Figura 8. Los bucles FG de los armazones demuestran diversidad de secuencia. El gráfico representa la diversidad de secuencia mostrada por bucles FG de todas las longitudes del conjunto de datos de Swiss-Prot (393 secuencias). Usando la herramienta de alineamiento, Weblogo, la incidencia relativa de que un aminoácido aparezca en una posición particular en el bucle FG, se representa por el tamaño del código de una letra encima de la posición particular. Por ejemplo, en la posición 2 de los bucles FG analizados, el aminoácido más frecuente es Asparagina (N), seguido de Treonina (T), seguido de Lisina (K).

Figura 9A. Expresión y purificación de un armazón de Tn3 específico de SYNAGIS®. En este documento se presenta un gel de PAGE teñido con Coomassie que ilustra el armazón de Tn3 específico de SYNAGIS® (SynBP01) después de expresión recombinante y purificación. El armazón de SynBP01 se purificó fácilmente hasta su homogeneidad.

Figura 9B. La determinación de la K_D del armazón de unión específica de SYNAGIS®. El seguimiento representa un experimento que caracteriza la afinidad de unión específica del armazón de SynBP01 para SYNAGIS® mediante un ensayo de BIACORE®. Usando SYNAGIS® inmovilizado y SynBP01 de fase móvil a diversas concentraciones se determinó que la afinidad de unión (K_D) era de aproximadamente 16 μ M.

Figura 9C. El armazón de unión específica de SYNAGIS® muestra una estabilidad similar a la del armazón de base. Se identificó un armazón de unión específica de SYNAGIS® de una biblioteca de armazones como la preparada en el Ejemplo 3. En este documento se presentan los resultados de un experimento de desnaturalización de urea en el que la fluorescencia intrínseca mide el desplegamiento de las proteínas. En este experimento, el armazón de Tn3 (TS) y el armazón de unión específica de SYNAGIS® SynBP01 (A1) mostró perfiles de desnaturalización muy similares con concentraciones de urea crecientes.

Figura 9D. Los armazones de unión interaccionan con el anticuerpo diana SYNAGIS®, de forma bivalente. El seguimiento representa un experimento que caracteriza la interacción de dos armazones en una molécula inmovilizada en un formato de ensayo de BIACore. En este experimento, se superpone SYNAGIS® inmovilizado con una solución de armazón proteico específico de SYNAGIS® 1 μ M (trazado azul) o con una solución de armazón de proteína específica de SYNAGIS® 1 μ M + mAb de entrecruzamiento 0,19 μ M (trazado rojo). El gráfico representa las características de unión diferencial mostradas por armazones monoméricos o armazones reticulados.

Figura 10A. Alineamiento de secuencia de motivos estructurales de Tn3 que contienen disulfuro de origen natural. El alineamiento de secuencia presentado perfila la posición de restos de cisteína en 21 motivos estructurales relacionados con Tn3 que contienen disulfuro de origen natural en un intento de determinar posiciones candidatas para modificar técnicamente la estabilidad. Los restos de Cys de color similar dentro de secuencias de Tn3 individuales se unen por un enlace disulfuro. La secuencia de Tn3 (Iten.pro) se incluye en el alineamiento para

facilitar la identificación de restos y posiciones en Tn3 correspondiente a restos de cisteína en armazones que contienen disulfuro.

5 Figura 10B. Modificación técnica dirigida por disulfuro para aumentar la estabilidad de los armazones. El gráfico representa las posibles localizaciones disulfuro a modificar técnicamente en la secuencia del armazón. En un intento de aumentar la estabilidad, las cuatro localizaciones disulfuro representadas se modificaron técnicamente de manera individual en el armazón. Los armazones recombinantes resultantes se denominaron Tn3^{SS1}, Tn3^{SS2}, Tn3^{SS3} y Tn3^{SS4} respectivamente.

10 Figura 10C. Seguimiento por RP-HPLC de armazones modificados técnicamente con disulfuro purificados seleccionados. En el gráfico se representan los cromatogramas de HPLC de fase inversa de (i) Tn3^{SS3} y (ii) Tn3^{SS4} después de purificación, seguido de reducción, y después de replegamiento para formar enlaces disulfuro. Los cromatogramas demuestran que las cisteínas contenidas en los armazones están solo parcialmente oxidadas después de la purificación de proteínas (trazado superior) están completamente reducidas por tratamiento con DTT (trazado medio) y completamente oxidadas a disulfuros después del replegamiento (trazado inferior).

15 Figura 10D. Expresión y caracterización de armazones modificados técnicamente con disulfuro. La figura representa los resultados de un análisis por electroforesis en gel de poliacrilamida de 4 armazones modificados técnicamente con disulfuro presentados en la Figura 10B. Se analizaron muestras de las construcciones de Tn3 (TS), Tn3^{SS1} (1), Tn3^{SS2} (2), Tn3^{SS3} (3), Tn3^{SS4} (4), purificadas y replegadas, en condiciones reductoras y no reductoras, para evaluar la formación predicha de enlaces de disulfuro. Como se representa, Tn3^{SS2} forma un dímero con enlaces disulfuro. Las otras construcciones, (Tn3, Tn3^{SS1}, Tn3^{SS3}, y Tn3^{SS4}) no forman dímeros en respuesta a los restos de cisteína incorporados ya que los armazones que contienen disulfuro purificados y replegados migran de forma similar en condiciones reductoras y no reductoras.

20 Figura 10E. Perfil de desnaturalización de urea de los armazones modificados técnicamente con disulfuro individuales. El gráfico representa los resultados de un estudio de desnaturalización de urea de armazones que contienen disulfuro seleccionados perfilados en el panel A Tn3^{SS1} (SS1), Tn3^{SS3} (SS3), y Tn3^{SS4} (SS4), así como el armazón Tn3 (TS). En este experimento los diversos armazones purificados y replegados se exponen a niveles crecientes de urea. Como una medida del desplegamiento, se controla la fluorescencia relativa. A medida que la proteína se despliega o se hace menos estable, aumenta la fluorescencia relativa. Como se presenta en el panel, el armazón que contiene Tn3^{SS1} muestra una mayor sensibilidad a la urea en comparación con el armazón Tn3 y es por lo tanto menos estable. Además, los armazones Tn3^{SS3} y Tn3^{SS4} muestran mayor resistencia a la desnaturalización mediada por urea en comparación con Tn3 y son por lo tanto más estables. El armazón Tn3^{SS4} mostró la mayor resistencia a la desnaturalización mediada por urea de los armazones ensayados en este experimento.

25 Figura 10F. El armazón Tn3^{SS4} modificado técnicamente con disulfuro muestra mayor estabilidad en comparación con el armazón Tn3. El gráfico representa los resultados de un ensayo de desnaturalización con clorhidrato de guanidina que compara la estabilidad del armazón Tn3 (círculos) con el armazón Tn3^{SS4} (cuadrados) que contiene disulfuro. Como se presenta en el gráfico, el armazón Tn3^{SS4} mostró una mayor resistencia a la desnaturalización mediada por guanidina, y por lo tanto, fue más estable, en comparación con el armazón Tn3.

30 Figura 10G. El armazón Tn3^{SS4} muestra un alto nivel de resistencia a proteasa en comparación con el armazón Tn3. El panel representa los resultados de un ensayo de sensibilidad a proteasa que compara la estabilidad del armazón Tn3 con el armazón que contiene Tn3^{SS4}. En este experimento, la resistencia a proteasa relativa se correlaciona con la estabilidad proteica. Para el armazón Tn3, la incubación durante tan solo diez minutos con termolisina produce degradación. Después de una hora de incubación en termolisina, el armazón Tn3 está completamente degradado. El armazón que contiene Tn3^{SS4} mostró resistencia a termolisina durante todo el ciclo temporal de 16 horas lo que sugiere una mayor estabilidad en comparación con el armazón Tn3.

35 Figura 10H. El armazón Tn3^{SS4} modificado técnicamente con disulfuro muestra una alta temperatura de fusión (Tf). El gráfico representa los resultados de un estudio de estabilidad térmica que compara el armazón Tn3 (línea discontinua) con el armazón Tn3^{SS4} que contiene disulfuro (línea continua). Como se presenta en la curva de fusión, el armazón Tn3^{SS4} mostró una mayor temperatura de fusión (de aproximadamente 71 °C) en comparación con el armazón Tn3 (de aproximadamente 45 °C, véase también la Figura 3A).

40 Figura 10I. El armazón Tn3^{SS4} modificado técnicamente con disulfuro existe en un estado monomérico. La figura representa un trazado de un análisis de cromatografía por exclusión de tamaño/dispersión lumínica de ángulo múltiple (SEC-MALS) del armazón Tn3^{SS4}. Los datos demuestran que el armazón Tn3^{SS4} purificado existía en un estado monomérico, que se determinó que era de aproximadamente 11 kDa usando un detector de dispersión lumínica en línea.

45 Figura 10J. Cromatogramas de RP-HPLC de los armazones Tn3^{SS3+4} purificados modificados técnicamente con disulfuro. En la gráfica se presentan los cromatogramas de HPLC de fase inversa de Tn3^{SS3+4} después de purificación, seguido de reducción y después de replegar para formar enlaces disulfuro. Los trazados demostraron

que las cisteínas contenidas en los armazones están solamente parcialmente oxidadas después de la purificación proteica (trazado superior), están completamente reducidas por tratamiento con DTT (trazado medio) y están completamente oxidadas a dos enlaces disulfuro después de replegamiento (trazado inferior).

5 Figura 10K. El armazón Tn3^{SS3+4} que contiene disulfuro doble muestra un elevado nivel de estabilidad. El gráfico representa los resultados de un ensayo de desnaturalización de clorhidrato de guanidina que compara la estabilidad del armazón Tn3 (TS) (círculos) con el armazón Tn3^{SS4} (cuadrados) que contiene disulfuro individual y con el armazón Tn3^{SS3+4} (triángulos) que contiene disulfuro doble. Como se presenta en el gráfico, el armazón de disulfuro doble replegado, Tn3^{SS3+4}, mostró una mayor resistencia a la desnaturalización mediada por guanidina, y por lo tanto es más estable, en comparación con el armazón que contiene disulfuro individual replegado, Tn3^{SS4}, así como con el armazón Tn3.

15 Figura 11A. Expresión y purificación de armazones de organismos hipertermófilos. En este documento se presentan geles de PAGE teñidos con Coomassie que ilustran la expresión y purificación de armazones predichos (motivos estructurales Tn3) de diversas bacterias hipertermófilas. Todos los armazones predichos se expresaron y purificaron hasta su homogeneidad. En la figura, T representa lisado celular total, S representa fracción de lisado soluble y P representa proteína purificada.

20 La Figura 11B. Un armazón de *Staphylothermus marinus* muestra un alto nivel de estabilidad térmica. El gráfico representa la estabilidad térmica de un armazón de *Staphylothermus marinus*. El supuesto armazón se expresó de forma recombinante, se purificó y se sometió al ensayo de estabilidad térmica. Como se presenta en el gráfico, el armazón de *Staphylothermus marinus* muestra una alta temperatura de fusión (de aproximadamente 83 °C a pH 7,0).

25 Figura 11C. Un armazón de *Sulfolobus tokodaii* muestra un alto nivel de estabilidad. El panel representa la estabilidad térmica de un armazón de *Sulfolobus tokodaii*. El supuesto armazón se expresó de forma recombinante, se purificó y se sometió al ensayo de estabilidad térmica en un calorímetro de exploración diferencial. Como se presenta en el gráfico, el armazón de *Sulfolobus tokodaii* muestra una alta temperatura de fusión (de aproximadamente 98 °C) a pH 3,0. El armazón también muestra un alto nivel de estabilidad a pH 7,0, sin embargo, se agrega y precipita de la solución a temperaturas mayores de 75 °C.

35 Figura 11D. Un armazón de *Staphylothermus marinus* muestra un alto nivel de estabilidad. El gráfico representa los resultados de un ensayo de desnaturalización con clorhidrato de guanidina que demuestra la alta estabilidad proteica de un armazón de *Staphylothermus marinus*. Como se presenta en el gráfico, se requiere una alta concentración de clorhidrato de guanidina para desplegar el armazón (el 50 % de las moléculas se despliegan a una concentración de guanidina de 5,0 M), que ejemplifica la alta estabilidad.

40 Figura 11E. Un armazón de *Sulfolobus tokodaii* muestra un alto nivel de estabilidad. El panel representa los resultados de un ensayo de desnaturalización con clorhidrato de guanidina que demuestra la alta estabilidad proteica de un armazón de *Sulfolobus tokodaii*. El desplegamiento proteico se correlaciona con un aumento de la fluorescencia relativa de la molécula. Como se presenta en el gráfico, se requiere una alta concentración de HCl-guanidina para desplegar el armazón a pH 7,0 (círculos) o a pH 3,0 (cuadrado), que ejemplifica la alta estabilidad.

45 Figura 11F. Un armazón de *Staphylothermus marinus* muestra un alto nivel de resistencia a proteasa. El gráfico representa los resultados de un ensayo de sensibilidad a proteasa que mide la estabilidad de un armazón de *Staphylothermus marinus*. En este experimento, la resistencia relativa a proteasa se correlaciona con la estabilidad proteica. Para el armazón, la incubación durante diez minutos con termolisina produce un pequeño nivel de degradación que permanece estable a lo largo del tiempo. El armazón de *Staphylothermus marinus* mostró resistencia a termolisina durante todo el ciclo temporal de 16 horas.

50 Figura 11G. Un armazón de *Sulfolobus tokodaii* muestra un alto nivel de resistencia a proteasa. El panel representa los resultados de un ensayo de sensibilidad a proteasa que mide la estabilidad de un armazón de *Sulfolobus tokodaii*. En este experimento, la resistencia relativa a proteasa se correlaciona con la estabilidad proteica. El armazón de *Sulfolobus tokodaii* mostró resistencia a termolisina resistencia durante todo el ciclo temporal de 16 horas.

60 Figura 11H. Un armazón de *Staphylothermus marinus* se purifica a partir de una célula hospedadora. El panel representa una etapa en la purificación del armazón de *Staphylothermus marinus*. Debido al alto nivel de estabilidad mostrado por este armazón, es posible calentar el lisado de *E. coli* en bruto que contiene el armazón recombinante para retirar el grueso de las proteínas de células hospedadoras conservando al mismo tiempo el armazón. El carril 1 representa el lisado en bruto antes del tratamiento térmico. La tinción con Coomassie de un gel de PAGE que contenía el lisado en bruto demostró que el armazón candidato estaba presente. El tratamiento térmico del lisado en bruto a 70 °C durante 15 minutos produjo una pérdida de muchas de las proteínas de las células hospedadoras mientras que el armazón permanecía intacto (carril 2).

65

Figura 11I. Un armazón de *Staphylothermus marinus* se purifica a partir de una célula hospedadora. El panel representa una etapa en la purificación del armazón de *Staphylothermus marinus*. Debido al alto nivel de estabilidad mostrado por este armazón, es posible tratar el lisado de *E. coli* en bruto que contiene el armazón recombinante con termolisina para degradar el grueso de las proteínas de las células hospedadoras, conservando al mismo tiempo el armazón. El carril 1 representa el lisado en bruto antes del tratamiento con proteasa. La tinción con Coomassie de un gel de PAGE que contenía el lisado en bruto demostró que el armazón estaba presente. El tratamiento con proteasa del lisado en bruto a 55 °C durante 45 minutos produjo una pérdida muchas de las proteínas de las células hospedadoras mientras que el armazón permanecía intacto (carril 2).

Figura 11J. Un armazón de *Sulfolobus tokodaii* se purifica a partir de una célula hospedadora. El panel representa la purificación del armazón de *Sulfolobus tokodaii*. Debido al alto nivel de estabilidad mostrado por este armazón, es posible incubar el lisado en bruto que contiene el armazón recombinante a pH 3,0 y elevar la temperatura a 70 °C durante 15 minutos para retirar la mayoría de las proteínas de las células hospedadoras conservando al mismo tiempo el armazón soluble. El carril 1 representa el lisado de *E. coli* en bruto antes de la acidificación o tratamiento térmico. El carril 2 representa la proteína soluble restante después de disminuir el pH del lisado en bruto a 3,0. El carril 3 representa la proteína soluble después de disminuir el pH a 3,0 y la incubación a 70 °C durante 15 minutos. El armazón fue resistente y permaneció en solución durante estos tratamientos.

Figura 12. Se requieren dos bucles para la unión de SynBP01 con SYNAGIS®. Este panel representa la unión de SynBP01 y sus variantes con SYNAGIS® unido a placa. En este experimento, los bucles BC y FG de SynBP01 se transfirieron a un armazón de tipo silvestre para crear variantes de un solo bucle de SynBP01. Estas variantes (denominadas solo BC y solo FG) se sometieron a un ensayo de unión basado en ELISA en el que no mostraron unión con el SYNAGIS® unido a placa. Como control, se presenta unión de SynBP01 en el formato del ensayo de ELISA. Además, la mutación de disulfuro de SS4 se superpuso sobre SynBP01. Esta variante, denominada SynBP01 SS4 no mostró ninguna unión con SYNAGIS® unido a placa en el formato de ELISA.

Figura 13. Determinación de la afinidad de unión del clon 5E5 específico de TRAIL-R2 medida por BIAcore. Este panel representa una determinación de afinidad del clon 5E5 para TRAIL-R2 unido a microplaca. Se estimó que la K_d era de aproximadamente 700 nM.

Figura 14. Unión competitiva mostrada por clones múltiples específicos TRAIL-R2. En este panel se representan los resultados de un experimento de unión competitiva de diversos armazones específicos de TRAIL-R2. Se ensayaron dos clones específicos de TRAIL-R2, 5E5 y 7G11, con respecto a la unión competitiva frente a otros clones específicos de TRAIL-R2 presentados en fago. El clon 5E5 compite consigo mismo y con los otros clones excepto con 2H6 y 7G11. El clon 7G11 solo compite consigo mismo y con 2H6. Estos datos indican que hay dos grupos de clones que reconocen dos epítomos diferentes en TRAIL-R2.

Figura 15. Competición de diversos clones específicos de TRAIL-R2. En este panel se representan los resultados de un experimento de unión competitiva de diversos armazones específicos de TRAIL-R2. Se ensayaron cinco clones específicos de TRAIL-R2, 1E3, 1G11, 2B4, 1C12 y 2D3 con respecto a la unión competitiva frente a otros clones específicos de TRAIL-R2 presentados en fagos. Los clones 1E3, 1C12 y 2D3 compitieron con la mayoría de los clones presentados en fagos excepto con 8B3 y 7G11. El clon 1G11 soluble no compitió con ninguno de los clones presentados en fagos, y 2B4 mostró inhibición de baja a moderada en la mayoría de los casos. Estos datos sugieren que 1E3, 1C12 y 2D3 reconocen el mismo epítomo en TRAIL-R2.

Figura 16. Los agentes de unión de TRAIL-R2 inhiben la viabilidad celular. En el panel se representa la sensibilidad de la línea celular Colo-205 al tratamiento de 5E5, 7G11, 1C12, 2D3 y 1E3 cuando está formando complejo con el anticuerpo anti-etiqueta HIS y anti-IgG de ratón en la relación molar de 2:1:0,5. El porcentaje de células viables se obtuvo expresando la señal del ensayo para el tratamiento con clones de unión a TRAIL-R2 como un porcentaje de la señal obtenida para las células tratadas con un Tn3 de control que no se une con TRAIL-R2.

Figura 17A. Diagrama que representa ejemplos de proteínas de fusión con Tn3 multivalentes. La construcción bivalente representa un Tn3 fusionado con una región Fc de anticuerpo mientras que la construcción tetravalente fusiona el Tn3 con regiones constantes de cadena pesada y/o con la región Ckappa de cadena ligera.

Figura 17B. Diagrama que muestra el enlace de módulos proteicos en proteínas de fusión de Tn3 multivalentes. i) En la construcción de fusión de Fc, el módulo Tn3 N terminal está unido con la región Fc de la IgG1 mediante un enlazador peptídico y las regiones de bisagra de la IgG1. La longitud y composición de la secuencia enlazadora puede variar, pero en el Ejemplo 16 fue un motivo -GA-. ii) En la construcción de fusión Ckappa, el módulo Tn3 N terminal está unido con la región constante de una cadena ligera kappa de anticuerpo mediante un enlazador peptídico. La longitud y composición de la secuencia enlazadora puede variar, pero en el Ejemplo 16 fue un motivo -GGGTPT-. iii) En la construcción de fusión de IGHG1, el módulo Tn3 N terminal está unido con la región constante de una cadena pesada de IgG1 mediante un enlazador peptídico. La longitud y composición de la secuencia enlazadora puede variar, pero en el Ejemplo 16 fue un motivo -GGGTPT-.

Figura 18. Expresión de las construcciones Tn3 multivalentes. En la figura se representa un SDS-PAGE reductor que muestra los tamaños relativos de construcciones Tn3 bivalentes (muestras 1-3) y construcciones Tn3 tetravalentes (muestras 4-7) después de la purificación de proteína A. Los números de muestras corresponden a los mostrados en la Tabla 10. Todas las construcciones expresadas muestran los tamaños predichos por este análisis.

5
Figura 19. Afinidad de unión de monómeros y multímeros de Tn3. En este panel se representan sensogramas de un experimento de unión a biosensor usando construcciones de Tn3 1C12 y D1 mono, bi y tetravalentes. La proteína de fusión TRAIL-R2-Fc se inmovilizó en una microplaca sensora mientras que las proteínas de muestra se inyectaron sobre la microplaca. "Tetra" se refiere a las construcciones de fusión Cκ/IGHG1 tetravalentes. Las construcciones 10
1C12 muestran unión mejorada con TRAIL-R2 en función de la valencia, mientras que las construcciones de control D1 no muestran unión.

Figura 20. Efectos de las construcciones Tn3 bivalentes que se dirigen a TRAIL-R2. En este panel se representan las curvas de inhibición del crecimiento de células H2122 que se trataron con (A) el agente de unión a Tn3 15
específico de TRAIL-R2 1C12 en forma bivalente o con (B) un agente de unión a Tn3 no específico en forma bivalente con o sin la adición de un anticuerpo de entrecruzamiento (anti-Fc humano). En relación con el control sin agente de unión, el agente de unión específico para TRAIL-R2 mostró actividad leve en el ensayo, que disminuyó en presencia del anticuerpo secundario.

Figura 21. Efectos de las construcciones Tn3 tetravalentes que se dirigen a TRAIL-R2. En este panel se representan las curvas de inhibición del crecimiento de células H2122 que se trataron con (A) el agente de unión a Tn3 20
específico de TRAIL-R2 1C12 en forma tetravalente mono-específica o con (B) un agente de unión a Tn3 no específico en forma tetravalente mono-específica con o sin la adición de un anticuerpo de entrecruzamiento (anti-Fc humano). En relación con el control sin agente de unión, el agente de unión específico para TRAIL-R2 mostró actividad en el ensayo, que disminuyó ligeramente en presencia del anticuerpo secundario.

Figura 22. Efectos de las construcciones Tn3 tetravalentes multiespecíficas que se dirigen a TRAIL-R2. En este panel se representan las curvas de inhibición del crecimiento de células H2122 que se trataron con (A) el agente de 30
unión Tn3 específico de TRAIL-R2 1C12 y 2D3 en una forma tetravalente biespecífica (1C12 fusionado con la región constante de cadena pesada de IgG1, 2D3 fusionado con el dominio Cκappa) o con (B) un agente de unión específico de TRAIL-R2 2D3 y 1C12 en una forma tetravalente biespecífica (2D3 fusionado con la región constante de cadena pesada de IgG1, 1C12 fusionado con el dominio Cκappa) con o sin la adición de un anticuerpo de entrecruzamiento (anti Fc humano). En relación con el control sin agente de unión (mostrado en la Figura 21), los 35
agentes de unión específicos de TRAIL-R2 mostraron actividad en el ensayo, que aumentaba en presencia del anticuerpo secundario.

Figura 23: Diseño de construcciones pSEC. (A) representa la secuencia de aminoácidos para la fase de lectura 40
abierta en pSEC-oppA-Tn3. El péptido señal de oppA (subrayado) SEC ID N°: 227 se escinde después de su secreción en el espacio periplásmico. El penúltimo resto dentro de la señal de oppA (en cursiva) se mutó a metionina en el derivado de pSEC-oppA (L25M)-Tn3 para introducir un sitio de clonación *Nco* I. (B) representa la construcción pSEC-oppA (L25M)-Tn3 que muestra la disposición del promotor, péptido señal, módulos de Tn3 y de etiqueta de His, dentro de la construcción.

Figura 24. Preparación de construcciones de Tn3 secretadas. (A) representa el análisis por SDS-PAGE de medios 45
en bruto y fracciones periplásmicas de *E. coli* que secreta Tn3. (B) representa el análisis por SDS-PAGE del armazón de Tn3 purificado de los medios de *E. coli*. (C) representa el análisis por HPLC del Tn3 purificado de los medios de *E. coli*. Un desplazamiento en el tiempo de retención después de reducción por DTT es coherente con la presencia de un enlace disulfuro.

Figura 25. SDS-PAGE de un agente de unión bivalente de SYNAGIS®-Fc. En este panel se representa el análisis 50
por SDS-PAGE reductor (carril 1) y no reductor (carril 2) del armazón SynBP01 fusionado con una región Fc. Estos resultados demuestran que la fusión es el tamaño correcto y puede indicar dimerización.

Figura 26. Análisis de unión comparativa de un agente de unión bivalente de SYNAGIS®-Fc con SynBP01. Análisis 55
de BIAcore comparativo de SynBP01 frente a SynBP01-Fc. Brevemente, se inmovilizó SYNAGIS® en la superficie de una microplaca sensora de CM5 mediante acoplamiento de amina. Se inyectó SynBP01 o SynBP01-Fc, a una concentración de 1 μM, a un caudal de 75 μl/min. La construcción de SynBP01-Fc bivalente muestra una mayor afinidad que el agente de unión de dominio individual.

Figura 27. Los armazones Tn3 pueden conjugarse con PEG. Análisis (A) análisis por SDS-PAGE de purificación en 60
columna de afinidad metálica inmovilizada de STn3 (CTC) (carriles 1-4), y de STn3 (CTC) purificado después del tratamiento con PEG derivatizado con maleimida (antes de cromatografía de intercambio catiónico) (carril 5). Carril 1: lisado de células totales de células que expresan STn3 (CTC); Carril 2: Flujo continuo de columna de IMAC; Carril 3: Fracción de lavado de columna de IMAC; Carril 4: STn3 (CTC), no pegilado; Carril 5: STn3 (CTC) pegilado. (B)

Análisis por SDS-PAGE de STn3 (CTC) pegilado, purificado a partir de una columna de intercambio catiónico SP XL. En los carriles 1-5 se muestran las fracciones de gradiente máximo.

5 Figura 28. Los bucles AB, CD y EF demuestran diversidad de longitud del bucle. La longitud de los bucles AB, CD y EF se extrajo para cada una de las 103 secuencias de Fn3 y estos datos se usaron para producir la distribución de frecuencia de longitudes de bucle mostrada. Para cualquier bucle dado, la suma de frecuencias para todas las longitudes es igual a 103, el número de secuencias analizadas.

10 Figura 29. Determinaciones de temperaturas de fusión para Tn3 a diferente pH y fuerza iónica. Los gráficos muestran las determinaciones de la curva de fusión térmica, medida por calorimetría de exploración diferencial, para el armazón Tn3 a pH 7,0 (en tampón de fosfato sódico 20 mM) (A), a pH 5,0 (en tampón de acetato sódico 20 mM) (B) y en tampón de alta salinidad a pH 7,0 (tampón de fosfato sódico 20 mM que contiene sal 1,0 M) (C). Se determinó que las T_f eran de aproximadamente 45 °C para Tn3 a pH 7,0, 52 °C a pH 5,0, y 55 °C a pH 7,0 en presencia de alta fuerza iónica. Las exploraciones repetidas (en amarillo) para las muestras a pH 7,0 muestran que el desplegamiento térmico es reversible en estas condiciones. El desplegamiento térmico de Tn3 es irreversible a pH 5,0.

20 Figura 30A. Diseño de mutantes de carga de Tn3. Se muestra un dibujo representativo de la estructura tridimensional de Tn3 (código pdb: 1decena). Se muestran los restos 8-90 de la SEC ID 1, con las cadenas laterales de todos los restos de Asp y Glu mostrados en amarillo y blanco. Se diseñó un panel de 8 mutantes en los que los restos de Asp y Glu mostrados en amarillo se reemplazaron con Asn o Gln. La numeración de los restos es conforme a la SEC ID 1.

25 Figura 30B. Análisis de SDS-PAGE de mutantes de carga recombinantes purificados de Tn3. Se procesaron alícuotas de cada una de las proteínas purificadas en un gel de SDS-PAGE. Para comparar, las proteínas de tipo silvestre se procesaron en un carril distinto del mismo gel, y muestra una tasa de migración similar a la de los diversos mutantes de carga.

30 Figura 31A. Capacidad de adición de estabilización de mutaciones Tn3.
 Se generó una serie de mutantes puntuales de Tn3 en los que se reemplazaron restos de Asp o Glu individuales con Asn o Gln. En este documento se presentan los resultados de un experimento de desnaturalización de urea en el que la fluorescencia intrínseca mide el desplegamiento de las proteínas. En este experimento, 5 de los 8 mutantes de carga del armazón Tn3 (E33Q, D49N, E52Q, D53N, E86Q) requirieron una mayor concentración de urea para efectuar el desplegamiento en comparación con el armazón Tn3 de tipo silvestre.

35 Figura 31B. La combinación de mutaciones de carga conduce a mejoras aditivas en la estabilidad de Tn3.
 Se combinaron mutaciones puntuales de restos de Asp o Glu que potenciaron la estabilidad de Tn3 de tipo silvestre en mutaciones dobles o triples de Tn3. Cada uno de los mutantes de Tn3 combinados (E33Q/D49N, D49N/E86Q y E33Q/D49N/E86Q) mostraron mayor estabilidad en comparación con cualquiera de los mutantes puntuales correspondientes o Tn3 de tipo silvestre.

40 Figura 32. Determinaciones de la temperatura de fusión para armazones Tn3 de tipo silvestre y con carga modificada técnicamente. El gráfico ilustra las determinaciones de curvas de fusión térmica de las variantes de armazón Tn3 a pH 7,0, medido por calorimetría de exploración diferencial. Se determinó que las T_f eran de aproximadamente 45 °C para Tn3 de tipo silvestre (A), 50 °C para Tn3 E33Q/D49N (B), 52 °C para Tn3 D49N/E86Q (C) y 52 °C para Tn3 E33Q/D49N/E86Q (D).

50 5. Descripción detallada

Los armazones proteicos descritos en el presente documento se han diseñado para ser superiores tanto a fragmentos derivados de anticuerpos como a armazones que no son de anticuerpo. La principal ventaja de los armazones frente a los fragmentos de anticuerpo es estructural. Estos armazones derivan de módulos estructurales completos, estables y solubles hallados en proteínas de fluidos corporales humanos y de otras fuentes en la naturaleza (por ejemplo, pero sin limitación, bacterias termófilas). En consecuencia, muestran mejores propiedades de plegamiento y termoestabilidad que los fragmentos de anticuerpo, cuya creación implica la retirada de partes del plegamiento nativo del anticuerpo, exponiendo con frecuencia restos de aminoácidos que, en un anticuerpo intacto, estarían ocultos en un ambiente hidrófobo, tal como una interfaz entre dominios variables y constantes. La exposición de dichos restos hidrófobos a disolvente aumenta la probabilidad de agregación.

Además, los armazones proporcionan las ventajas funcionales de moléculas de anticuerpo. En particular, a pesar del hecho de que el armazón no es una inmunoglobulina, su plegamiento general es próximo al de la región variable de la cadena pesada de IgG, haciendo posible presentar sus tres bucles de una manera análoga a las CDR de los anticuerpos en orientaciones relativas. Debido a esta estructura, los armazones descritos en el presente documento poseen propiedades de unión a antígeno que son de naturaleza y afinidad similares a las de los anticuerpos. Como

resultado, pueden emplearse estrategias de distribución al azar y redistribución de bucles *in vitro* que son similares al proceso de maduración por afinidad de los anticuerpos *in vivo*.

5.1 El motivo estructural de FnIII

Los armazones se basan en la estructura de un módulo de fibronectina de tipo III (FnIII), un dominio hallado en sangre de mamíferos y proteínas estructurales. Este dominio aparece con frecuencia en las proteínas secuenciadas hasta la fecha, incluyendo fibronectinas, tenascina, proteínas citoesqueléticas intracelulares, receptores de citocinas y enzimas procariotas (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). Aunque el dominio aparece muchas veces en la naturaleza, las secuencias de aminoácidos son bastante divergentes. En particular, estos armazones incluyen, el tercer dominio FnIII de tenascina C (también conocido como el dominio "Tn3"). El plegamiento general 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 antigénico en la IgG de camello y llama.

Además, el dominio Tn3 posee secuencias de bucle expuestas, que toleran la distribución al azar, facilitando la generación de diversos grupos de armazones proteicos capaces de unirse con dianas específicas con alta afinidad.

Estos armazones proteicos pueden utilizarse con el fin de diseñar proteínas que son capaces de unirse prácticamente con cualquier compuesto (por ejemplo, cualquier proteína) de interés. En particular, las moléculas basadas en el motivo estructural Tn3, descrito en el presente documento, pueden usarse como armazones que se someten a evolución dirigida diseñada para distribuir al azar uno o más de los bucles que son análogos a 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 de tipo anticuerpo con altas afinidades por los antígenos de interés. Además, los armazones descritos en el presente documento pueden usarse para presentar bucles expuestos definidos (por ejemplo, bucles previamente distribuidos al azar y seleccionados basándose en la unión antigénica) para dirigir la evolución de moléculas que se unen con dichos bucles introducidos. Puede llevarse a cabo una selección de este tipo para identificar moléculas de reconocimiento para cualquier bucle de tipo CDR individual o, como alternativa, para el reconocimiento de dos o los tres bucles de tipo CDR combinados en un resto de unión a epítopo no lineal.

Un conjunto de tres bucles de Tn3 correspondientes a los bucles de unión al antígeno de la cadena pesada de IgG se extiende entre los restos de aminoácidos 23-31 (BC), 50-56 (DE) y 75-84 (FG). La longitud de los bucles BC, DE, y FG, de 9, 6, y 10 restos, respectivamente, queda dentro del intervalo estrecho de los bucles de reconocimiento antigénico correspondientes hallados en cadenas pesadas de anticuerpos, es decir, longitudes de 7-10, 4-8 y 4-28 restos, respectivamente. Como alternativa, en otra realización, los bucles BC, DE y FG pueden extenderse entre los restos de aminoácidos 23 a 31, 51 a 56 y 75 a 84 respectivamente. En consecuencia, una vez distribuidos al azar y seleccionados con respecto a la afinidad antigénica, estos bucles pueden establecer contactos con antígenos equivalentes a los contactos de los bucles correspondientes en anticuerpos. Los bucles AB, CD y EF del dominio Tn3 también comparten esta propiedad y por tanto también están disponibles para la distribución al azar y selección con respecto a alta afinidad por antígenos. Este proceso puede realizarse en paralelo o en serie con la distribución al azar de los bucles BC, DE y FG.

En una realización específica, una o más regiones de bucle del armazón basadas en el dominio Tn3 de tenascina C humana, comprenden los restos de aminoácidos:

- I. Del 12 al 17 inclusive en un bucle AB;
- II. Del 23 al 31 inclusive en un bucle BC;
- III. Del 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
- IV. Del 50 al 56 inclusive en un bucle DE;
- V. Del 60 al 66 inclusive en un bucle EF; y
- VI. Del 75 al 84 inclusive en un bucle FG.

En otra realización específica, los armazones comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles, en los que un bucle comprende una secuencia de aminoácidos de las SEC ID Nos: 201, 202, 203, 204, 205, o 206. En una realización, los armazones comprenden un bucle AB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 201. En otra realización, los armazones comprenden un bucle BC que tienen una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 202. En otra realización, los armazones comprenden un bucle CD que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 203. En otra realización, los armazones comprenden un bucle DE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 204. En otra realización, los armazones comprenden un bucle EF que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 205. En otra realización, los armazones comprenden un bucle FG que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 206. En una realización específica, los armazones comprenden un bucle AB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 201, un bucle BC que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 202, un bucle CD que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 203, un bucle DE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°:

204, un bucle EF que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 205 y un bucle FG que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 206.

5 En otra realización específica, una o más regiones de bucle del armazón basadas en el dominio Tn3 de tenascina C humana, comprenden los restos de aminoácidos:

- 10 I. Del 11 al 17 inclusive en un bucle AB;
 II. Del 23 al 31 inclusive en un bucle BC;
 III. Del 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
 IV. Del 51 al 56 inclusive en un bucle DE;
 V. Del 60 al 67 inclusive en un bucle EF; y
 VI. Del 75 al 84 inclusive en un bucle FG.

15 En otra realización específica, los armazones comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles en los que un bucle comprende una secuencia de aminoácidos de SEC ID Nos: 207, 202, 203, 208, 209, o 206. En una realización, los armazones comprenden un bucle AB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 207. En otra realización, los armazones comprenden un bucle BC que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 202. En otra realización, los armazones comprenden un bucle CD que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 203. En otra realización, los armazones comprenden un bucle DE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 208. En otra realización, los armazones comprenden un bucle EF que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 209. En otra realización, los armazones comprenden un bucle FG que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 206. En una realización específica, los armazones comprenden un bucle AB que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 207, un bucle BC que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 202, un bucle CD que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 203, un bucle DE que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 208, un bucle EF que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 209, y un bucle FG que tiene una secuencia de aminoácidos de SEC ID N°: 206.

30 En otras realizaciones, los armazones comprenden regiones de bucle que son variantes de las regiones de bucle afines en cualquiera de las SEC ID Nos: 1-32 o 68-88.

35 En el presente documento se describen armazones polipeptídicos de origen no natural, recombinantes, que comprenden una pluralidad de dominios de cadena beta unidos con una pluralidad de secuencias de región de bucle derivadas de una secuencia proteica de origen natural, en los que una o más de dichas secuencias de región de bucle varían por delección, sustitución o adición en al menos un aminoácido de las secuencias de bucle correspondientes en la secuencia proteica de origen natural, y en los que los dominios de cadena beta del armazón polipeptídico tienen al menos 50 % de homología con las secuencias de dominio correspondientes de una secuencia proteica de origen natural. Por ejemplo, dichas secuencias de aminoácidos pueden ser, pero sin limitación, cualquiera de las SEC ID Nos: 1-32, 60-88, y 210. En otra realización específica, el armazón comprende la secuencia del dominio Tn3 de tenascina C humana. En otra realización, el armazón comprende una secuencia que tiene al menos 50 % de homología con el dominio de Tn3 de tenascina C humana. En realizaciones adicionales, dicha homología con el dominio Tn3 es de al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o más. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural es una secuencia proteica correspondiente a un motivo estructural Tn3 adicional de tenascina C humana. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural es una secuencia proteica correspondiente a un motivo estructural Tn3 de otra proteína tenascina o, como alternativa, una proteína tenascina de otro organismo (tal como, pero sin limitación, tenascinas murinas, porcinas, bovinas o equinas).

50 Aunque Tn3 representa un armazón para la generación de miméticos de anticuerpo, en las moléculas descritas en el presente documento, otras moléculas pueden sustituirse por Tn3. Estas incluyen, sin limitación, motivos estructurales de Tn3 de animales y procariotas relacionados. Además, también pueden usarse motivos estructurales Tn3 de otras proteínas. Los módulos de organismos y proteínas parentales diferentes pueden ser los más apropiados para diferentes aplicaciones; por ejemplo, al diseñar un armazón estable a un pH bajo, puede ser más deseable generar esa proteína de un organismo que crezca de forma óptima a un pH bajo (tal como, pero sin limitación, *Sulfolobus tokodaii*). En otra realización, pueden identificarse motivos estructurales Tn3 relacionados y utilizarse a partir de bacterias hipertermófilas tales como, pero sin limitación, *Archaeoglobus fulgidus* y *Staphylothermus marinus*, mostrando cada una de ellas crecimiento óptimo a más de 70 °C. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural corresponde a un motivo estructural Tn3 predicho de un organismo termófilo, por ejemplo, pero sin limitación, *Archaeoglobus fulgidus*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, y *Sulfolobus tokodaii*. En otra realización más, los armazones tienen una secuencia proteica que tiene una homología de al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % con cualquiera de las secuencias de una secuencia correspondiente a un motivo estructural Tn3 o un motivo estructural Tn3 predicho de un organismo termófilo como se ha descrito anteriormente. En algunas realizaciones, los motivos estructurales Tn3 de organismos termófilos pueden seleccionarse de las secuencias de aminoácidos de SEC ID Nos: 2-4 y 68-88.

Se describen armazones con una pluralidad de cadenas beta de más de siete. En una realización, los armazones comprenden una pluralidad de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o más cadenas beta.

- 5 Se describen armazones con una pluralidad de regiones de bucle de más de seis. En una realización, los armazones comprenden una pluralidad de al menos 7, al menos 8, al menos 9, al menos 10, al menos 11 o más regiones de bucle.

10 En una realización, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, en las que dichas cadenas beta se denominan cadenas A, B, C, D, E, F y G del extremo N terminal al C terminal. En otra realización, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, estando cada cadena separada por una región de bucle en la que las regiones de bucle se denominan bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG del extremo N terminal al C terminal. En una realización alternativa, los armazones comprenden menos de siete cadenas beta, estando cada cadena separada por una región de bucle. En una realización alternativa, los armazones comprenden menos de siete cadenas beta, estando cada cadena separada por una región de bucle.

15 En otra realización específica, los armazones comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas beta, en las que dichas cadenas beta comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEC ID Nos: 228-234. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena A comprende la secuencia de SEC ID N°: 228. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena B comprende la secuencia de SEC ID N°: 229. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al extremo C, en las que dicha cadena C comprende la secuencia de SEC ID N°: 230. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena D comprende la secuencia de SEC ID N°: 231. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena E comprende la secuencia de SEC ID N°: 232. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena F comprende la secuencia de SEC ID N°: 233. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena G comprende la secuencia de SEC ID N°: 234. En otra realización específica, los armazones comprenden una cadena A que tiene la secuencia de SEC ID N°: 228, una cadena B que tiene la secuencia de SEC ID N°: 229, una cadena de C que tiene la secuencia de SEC ID N°: 230, una cadena D que tiene la secuencia de SEC ID N°: 231, una cadena E que tiene la secuencia de SEC ID N°: 232, una cadena F que tiene la secuencia de SEC ID N°: 233 y una cadena G que tiene la secuencia de SEC ID N°: 234.

20 En otra realización específica, los armazones comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas beta, en las que dichas cadenas beta comprenden secuencias de aminoácidos seleccionadas de las SEC ID Nos: 235, 229, 230, 236, 232, 237, y 234. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena A comprende la secuencia de SEC ID N°: 235. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena B comprende la secuencia de SEC ID N°: 229. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena C comprende la secuencia de SEC ID N°: 230. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena D comprende la secuencia de SEC ID N°: 236. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena E comprende la secuencia de SEC ID N°: 232. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena F comprende la secuencia de SEC ID N°: 237. En otra realización específica, los armazones comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas A-G del extremo N terminal al C terminal, en las que dicha cadena G comprende la secuencia de SEC ID N°: 234. En otra realización específica, los armazones comprenden una cadena A que tiene la secuencia de SEC ID N°: 235, una cadena B que tiene la secuencia de SEC ID N°: 229, una cadena C que tiene la secuencia de SEC ID N°: 230, una cadena D que tiene la secuencia de SEC ID N°: 236, una cadena E que tiene la secuencia de SEC ID N°: 232, una cadena F que tiene la secuencia de SEC ID N°: 237 y una cadena G que tiene la secuencia de SEC ID N°: 234.

25 En otra realización, los armazones comprenden secuencias de cadena beta que tienen al menos 50 % de homología con las cadenas beta afines de cualquiera de las SEC ID Nos: 1-32 o 68-99. En realizaciones adicionales, dicha homología es de al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 %, al menos 99 %, o más.

30 Los bucles que conectan las diversas cadenas del armazón proteico pueden distribuirse al azar con respecto a la diversidad de longitud y/o secuencia. En una realización, los armazones tienen al menos un bucle que está

distribuido al azar con respecto a la diversidad de longitud y/o secuencia. En otra realización, los armazones tienen al menos un bucle que se mantiene constante mientras que al menos un bucle adicional se distribuye al azar con respecto a la diversidad de longitud y/o secuencia. En otra realización, las bibliotecas tienen armazones en los que al menos uno de los bucles AB, CD y EF se mantienen constantes mientras que al menos uno de los bucles BC, DE y FG se distribuyen al azar con respecto a la diversidad de longitud o secuencia.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle BC que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: S-X-a-X-b-X-X-X-G, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa prolina o alanina y en la que (b) representa alanina o glicina.

En otra realización específica, los armazones comprenden un bucle BC que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: A-d-P-X-X-X-e-f-X-l-X-G (SEC ID N°: 257), en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (d) representa prolina, glutamato o lisina, en la que (e) representa asparagina o glicina, y en la que (f) representa serina o glicina.

En otra realización, los armazones tienen un bucle BC que comprende 11 aminoácidos que tienen una secuencia consenso de S-P-c-X-X-X-X-X-T-G (SEC ID N°: 258), en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (c) representa prolina, serina o glicina.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-G-X-X-X-S, en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

En otra realización específica, los armazones comprenden un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-X-X- b-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina y en la que (b) representa serina o glicina.

En otra realización específica, los armazones comprenden un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A (SEC ID N°: 259), en la que X representa cualquier aminoácido, y en el que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle DE, que comprende 6 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: X-X-X-X-X-X, en la que X representa cualquier aminoácido.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle AB, que comprende 7 restos, que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: K-X-X-X-X-X-a, en la que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina y en la que (a) representa serina, treonina, alanina o glicina.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle AB, que comprende 9 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: K-X-X-X-X-X-X-a, en la que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina y en la que (a) representa serina, treonina, alanina o glicina.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle CD, que comprende 7, 8 o 9 restos, en los que cada resto en el bucle CD se distribuye al azar y en los que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina.

En una realización específica, los armazones comprenden un bucle EF que comprende 8 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: X-b-L-X-P-X-c-X, en la que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina, en la que (b) representa asparagina, lisina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico o glicina y en la que (c) representa isoleucina, treonina, serina, valina, alanina o glicina.

En algunas realizaciones, los armazones pueden comprender de aproximadamente 75 a aproximadamente 500, de aproximadamente 75 a aproximadamente 200, de aproximadamente 75 a aproximadamente 100, de aproximadamente 75 a aproximadamente 250 o de aproximadamente 75 a aproximadamente 150 aminoácidos.

5.2 Proteínas basadas en almacén modificado técnicamente con disulfuro

En un intento de aumentar la estabilidad de los armazones, se utilizó un enfoque bioinformático para identificar posiciones candidatas adecuadas para la modificación técnica de un enlace disulfuro. Sin embargo, con frecuencia, el diseño de disulfuro por inspección manual de estructuras proteicas para identificar pares de restos candidatos en estrecha proximidad es improductivo debido a las restricciones geométricas estrictas requeridas por ese tipo de enlace (véase *Dombkowski, Bioinformatics Vol.19 N° 14, 2003 1852-1853*). Por lo tanto, se describen armazones

que tienen enlaces disulfuro modificados técnicamente en posiciones que muestran estabilidad potenciada, medida por tolerancia térmica, resistencia a desnaturalización caotrópica y tratamiento con proteasa.

5 En una realización, los armazones comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, o al menos cinco enlaces disulfuro de origen no natural. En una realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural, en el que dicho al menos un enlace disulfuro de origen no natural estabiliza el armazón. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural localizado entre dos cadenas beta. Por ejemplo, dicho al menos un enlace disulfuro de origen no natural puede formar un enlace entre la cadena A y la cadena B, o entre la cadena D y la cadena E, o entre la cadena F y la cadena G o entre la cadena C y la cadena F. En otra realización, dicho al menos un enlace disulfuro de origen no natural forma un primer enlace entre la cadena F y la cadena G, y un segundo enlace entre la cadena C y la cadena F. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural localizado entre dos regiones de bucle. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural localizado entre una región de bucle y una cadena beta. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural que está localizado dentro de la misma cadena beta. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural que está localizado dentro de la misma región de bucle. En otra realización, los armazones comprenden al menos un enlace disulfuro de origen no natural, en el que el enlace está localizado entre dos armazones distintos.

20 En otra realización, los armazones comprenden un enlace disulfuro que forma un armazón multimérico (el término "multimérico" se define como al menos dos o más armazones en asociación) de al menos 2, al menos 3, al menos 4 o más armazones.

25 El aumento de la estabilidad a la que contribuyó la modificación técnica de los enlaces disulfuro puede medirse fácilmente por técnicas bien conocidas en este campo, tales como desnaturalización térmica (T_i) y caotrópica (tal como con urea o guanidina), tratamiento con proteasa (tal como termolisina) u otro parámetro de estabilidad aceptado en la técnica. Puede encontrarse una revisión exhaustiva de técnicas usadas para medir la estabilidad proteica, por ejemplo, en "Current Protocols in Molecular Biology" y "Current Protocols in Protein Science" por John Wiley y Sons. 2007.

30 En una realización los armazones que contienen enlaces disulfuro muestran un aumento en la estabilidad de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de la modificación técnica de los enlaces disulfuro, medida por tolerancia térmica, resistencia a desnaturalización caotrópica, tratamiento con proteasa, u otro parámetro de estabilidad bien conocido en este campo.

40 La estabilidad de una proteína puede medirse por el nivel de fluorescencia mostrado por la proteína en diversas condiciones. Hay una correlación positiva entre el desplegamiento relativo de una proteína y un cambio en la fluorescencia interna que la proteína muestra bajo tensión. Los ensayos de estabilidad proteica adecuados para medir características térmicas incluyen Calorimetría de Exploración Diferencial (CED) y Dicroísmo Circular (DC). Cuando la proteína demuestra un desplazamiento considerable en parámetros medidos por CED o DC, se correlaciona con una estructura desplegada, la temperatura a la que se realiza este cambio se denomina temperatura de fusión o (T_f). En una realización, los armazones con enlaces disulfuro modificados técnicamente muestran una temperatura de fusión (T_f) aumentada de al menos más de 45 °C, al menos más de 50 °C, al menos más de 55 °C, al menos más de 60 °C, al menos más de 65 °C, al menos más de 70 °C, al menos más de 71 °C, al menos más de 72 °C, al menos más de 73 °C, al menos más de 74 °C, al menos más de 75 °C, al menos más de 76 °C, al menos más de 77 °C, al menos más de 78 °C, al menos más de 79 °C, al menos más de 80 °C, al menos más de 81 °C, al menos más de 82 °C, al menos más de 83 °C, al menos más de 84 °C, al menos más de 85 °C, al menos más de 86 °C, al menos más de 87 °C, al menos más de 88 °C, al menos más de 89 °C, al menos más de 90 °C, al menos más de 91 °C, al menos más de 92 °C, al menos más de 93 °C, al menos más de 94 °C, al menos más de 95 °C, al menos más de 96 °C, al menos más de 97 °C o al menos más de 98 °C, o al menos más de 100 °C, o al menos más de 115 °C, o al menos más de 110 °C, o al menos más de 120 °C que la temperatura de fusión (T_f) mostrada por el mismo armazón antes de la modificación técnica en las mismas condiciones experimentales.

55 En otra realización, los armazones con disulfuro modificados técnicamente muestran una temperatura de fusión (T_f) aumentada al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de modificar técnicamente los disulfuro en las mismas condiciones experimentales.

65 Otro ensayo para la estabilidad proteica implica exponer una proteína a un agente caotrópico, tal como urea o guanidina (por ejemplo, HCl-guanidina o isotiocianato de guanidina) que actúa para desestabilizar interacciones dentro de la proteína. Tras exponer la proteína a niveles crecientes de urea o guanidina, la fluorescencia interna relativa se mide para evaluar un valor en el que el 50 % de las moléculas proteicas están desplegadas. Este valor se

denomina valor C_m y representa un valor de referencia para la estabilidad proteica. Cuanto mayor sea el valor C_m , más estable será la proteína. En una realización, los armazones con disulfuro modificados técnicamente muestran una C_m aumentada de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de modificar técnicamente con disulfuro, medida en un experimento de desnaturalización de urea en condiciones similares.

En otra realización, los armazones con disulfuro modificados técnicamente muestran una C_m aumentada de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de modificar técnicamente con disulfuro, medida en un experimento de desnaturalización de guanidina en condiciones similares.

Otro ensayo usado para ensayar la estabilidad proteica es un ensayo de resistencia a proteasa. En este ensayo, un nivel relativo de estabilidad proteica se correlaciona con la resistencia a degradación por proteasa a lo largo del tiempo. Cuanto más resistente al tratamiento por proteasa, más estable será la proteína. En una realización, los armazones con disulfuro modificados técnicamente muestran estabilidad aumentada en al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de modificar técnicamente los disulfuro, medida en un experimento de resistencia a proteasa en condiciones similares.

En algunos casos puede ser ventajoso utilizar un armazón con estabilidad disminuida, por ejemplo pero sin limitación, un armazón conjugado con una citotoxina, o un radionúclido. Dichos armazones pueden requerir velocidades de eliminación más rápidas en relación con toxicidad no específica. En una realización, los armazones comprenden un enlace disulfuro que desestabiliza el armazón en comparación con el armazón antes de la modificación técnica. En una realización, los armazones que contienen disulfuro muestran una reducción de la estabilidad de al menos 5 %, al menos 10 %, al menos 15 %, al menos 20 %, al menos 25 %, al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % o más en comparación con el mismo armazón antes de modificar técnicamente los disulfuro, medida por tolerancia térmica, resistencia a desnaturalización caotrópica, tratamiento con proteasa u otro parámetro de estabilidad bien conocido en la técnica en condiciones experimentales similares.

5.3. Cinética de armazones

Se describen armazones que se unen específicamente con una diana (por ejemplo, una proteína). En algunas realizaciones, la diana puede ser, por ejemplo, pero sin limitación, un antígeno de superficie celular, un antígeno soluble, un antígeno inmovilizado, un antígeno inmunosilencioso, un antígeno intracelular, un antígeno intranuclear, un autoantígenos, un antígeno no propio, un antígeno de cáncer, un antígeno bacteriano o un antígeno viral.

En algunas realizaciones, los armazones se unen específicamente con una diana con cinética específica. En algunas realizaciones, los armazones pueden tener una constante de velocidad de asociación o velocidad k_{on} (armazón (Sc, abreviatura del inglés *Scaffold*) +antígeno (Ag) ($k_{on} \rightarrow Sc-Ag$) de al menos $10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $1,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $2 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $2,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^7 M^{-1}s^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}s^{-1}$, o una velocidad k_{on} de aproximadamente 10^5 a aproximadamente $10^8 M^{-1}s^{-1}$, una velocidad k_{on} de aproximadamente $1,5 \times 10^5 M^{-1}s^{-1}$ a aproximadamente $1 \times 10^7 M^{-1}s^{-1}$, una velocidad k_{on} de aproximadamente 2×10^5 a aproximadamente $1 \times 10^6 M^{-1}s^{-1}$, o una velocidad k_{on} de aproximadamente 4×10^5 a aproximadamente $10^7 M^{-1}s^{-1}$ determinada por un ensayo de BIAcore® o por otros ensayos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los armazones pueden tener una velocidad k_{off} (armazón(Sc)+antígeno (Ag) ($k_{off} \leftrightarrow Sc-Ag$) de menos de $10^{-3} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-3} s^{-1}$, menos de $10^{-4} s^{-1}$, menos de $2 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-4} s^{-1}$, menos de $10^{-5} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-5} s^{-1}$, menos de $10^{-6} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-6} s^{-1}$, menos de $10^{-7} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-7} s^{-1}$, menos de $10^{-8} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-8} s^{-1}$, menos de $10^{-9} s^{-1}$, menos de $5 \times 10^{-9} s^{-1}$, o menos de $10^{-10} s^{-1}$, o 10^{-3} - $10^{-10} s^{-1}$, o 10^{-4} - $10^{-8} s^{-1}$, o 10^{-5} - $10^{-8} s^{-1}$ determinada por un ensayo BIAcore® o por otros ensayos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los armazones pueden tener una constante de afinidad o K_a (k_{on}/k_{off}) de al menos $10^2 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^2 M^{-1}$, al menos $10^3 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^3 M^{-1}$, al menos $10^4 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^4 M^{-1}$, al menos $10^5 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^5 M^{-1}$, al menos $10^6 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^6 M^{-1}$, al menos $10^7 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^7 M^{-1}$, al menos $10^8 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^8 M^{-1}$, al menos $10^9 M^{-1}$, al menos $5 \times 10^9 M^{-1}$, al menos $10^{10} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{10} M^{-1}$, al menos $10^{11} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{11} M^{-1}$, al menos $10^{12} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{12} M^{-1}$, al menos $10^{13} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{13} M^{-1}$, al menos $10^{14} M^{-1}$, al menos $5 \times 10^{14} M^{-1}$, al menos $10^{15} M^{-1}$, o al menos $5 \times 10^{15} M^{-1}$, o 10^2 - $5 \times 10^5 M^{-1}$, 10^4 - $1 \times 10^{10} M^{-1}$, o 10^5 - $1 \times 10^8 M^{-1}$. Los armazones pueden tener una K_a de como máximo $10^{11} M^{-1}$, como máximo $5 \times 10^{11} M^{-1}$, como máximo

10^{12} M^{-1} , como máximo $5 \times 10^{12} \text{ M}^{-1}$, como máximo 10^{13} M^{-1} , como máximo $5 \times 10^{13} \text{ M}^{-1}$, como máximo 10^{14} M^{-1} , como máximo $5 \times 10^{14} \text{ M}^{-1}$ determinada por un ensayo BIAcore® o por otros ensayos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los armazones pueden tener una constante de disociación o K_d (K_{on}/K_{off}) de menos de 10^{-5} M , menos de $5 \times 10^{-5} \text{ M}$, menos de 10^{-6} M , menos de $5 \times 10^{-6} \text{ M}$, menos de 10^{-7} M , menos de $5 \times 10^{-7} \text{ M}$, menos de 10^{-8} M , menos de $5 \times 10^{-8} \text{ M}$, menos de 10^{-9} M , menos de $5 \times 10^{-9} \text{ M}$, menos de 10^{-10} M , menos de $5 \times 10^{-10} \text{ M}$, menos de 10^{-11} M , menos de $5 \times 10^{-11} \text{ M}$, menos de 10^{-12} M , menos de $5 \times 10^{-12} \text{ M}$, menos de 10^{-13} M , menos de $5 \times 10^{-13} \text{ M}$, menos de 10^{-14} M , menos de $5 \times 10^{-14} \text{ M}$, menos de 10^{-15} M , o menos de $5 \times 10^{-15} \text{ M}^{-1}$ determinada por un ensayo BIAcore® o por otros ensayos conocidos en la técnica.

5.4. Evolución dirigida de proteínas de unión basadas en armazón

Los armazones descritos en el presente documento pueden usarse en cualquier técnica para desarrollar proteínas de unión a diana nuevas o mejoradas. En un ejemplo particular, la diana se inmoviliza en un soporte sólido, tal como una resina en columna o un pocillo de una placa de microtitulación, y la diana se pone en contacto con una biblioteca de proteínas de unión candidatas basadas en armazón. Dicha biblioteca puede consistir en clones construidos a partir del armazón basado en el motivo Tn3 a través de distribución al azar de la secuencia y/o la longitud de los bucles de tipo CDR. En una realización, la biblioteca puede ser una biblioteca de presentación de fagos, fagémidos, virus, bacterias o levaduras o de ribosomas. Si se desea, esta biblioteca puede ser una biblioteca de fusión de ARN-proteína generada, por ejemplo, por las técnicas descritas en Szostak et al., Patente de Estados Unidos Nº 6.258.558 B1, Patente de Estados Unidos Nº 6.261.804 B1; Patente de Estados Unidos Nº 5.643.768 y Patente de Estados Unidos Nº 5.658.754. Como alternativa, puede ser una biblioteca de ADN-proteína (por ejemplo, como se describe en Lohse, DNA-Protein Fusions and Uses Thereof, Patente de Estados Unidos Nº 6.416.950.

A este respecto, la presentación de bacteriófagos (fagos) es una técnica bien conocida que permite explorar grandes bibliotecas de oligopéptidos para identificar uno o más miembros de esas bibliotecas que son capaces de unirse específicamente con una diana. La presentación de fagos es una técnica mediante la cual se presentan polipéptidos variantes como proteínas de fusión a la proteína de recubrimiento en la superficie de partículas de bacteriófagos (Scott, J. K. y Smith, G. P. (1990) Science 249: 386). La utilidad de la presentación de fagos está en el hecho de que grandes bibliotecas de variantes proteicas (o ADNc clonados al azar) distribuidas al azar de forma selectiva, pueden clasificarse rápida y eficazmente con respecto a las secuencias que se unan con una molécula diana con alta afinidad. Se han usado bibliotecas de presentación de péptidos (Cwirla, S. E. et al. (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87: 6378) o de proteínas (Lowman, H. B. et al. (1991) Biochemistry, 30: 10832; Clackson, T. et al. (1991) Nature, 352: 624; Marks, J. D. et al. (1991), J. Mol. Biol., 222:581; Kang, A. S. et al. (1991) Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 8363) en fagos, para explorar millones de polipéptidos u oligopéptidos con respecto a los que tengan propiedades de unión específicas (Smith, G.P. (191) Current Opin. Biotechnol., 2: 668). La clasificación de bibliotecas de fagos de mutantes al azar requiere una estrategia para construir y propagar un gran número de variantes, un procedimiento para purificación de afinidad usando el receptor diana, y un medio para evaluar los resultados de enriquecimientos de unión (véanse, por ejemplo, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.223.409, 5.403.484, 5.571.689, y 5.663.143).

Aunque la mayoría de los métodos de presentación de fagos han usado fagos filamentosos, también se conocen sistemas de presentación de fagos lambdoides (documento WO 95/34683; Patente de Estados Unidos Nº 5.627.024), sistemas de presentación de fagos T4 (Ren et al., Gene, 215: 439 (1998); Zhu et al., Cancer Research, 58(15): 3209-3214 (1998); Jiang et al., Infection & Immunity, 65(11): 4770-4777 (1997); Ren et al., Gene, 195(2): 303-311 (1997); Ren, Protein Sci., 5: 1833 (1996); Efimov et al., Virus Genes, 10: 173 (1995)) y sistemas de presentación de fagos T7 (Smith y Scott, Methods in Enzymology, 217: 228-257 (1993); Patente de Estados Unidos Nº 5.766.905).

Se han desarrollado ahora muchas otras mejoras y variaciones del concepto básico de presentación de fagos. Estas mejoras potencian la capacidad de los sistemas de presentación para explorar bibliotecas peptídicas con respecto a unión con moléculas diana seleccionadas y para presentar proteínas funcionales con el potencial de explorar estas proteínas con respecto a propiedades deseadas. Se han desarrollado dispositivos de reacción combinatorios para reacciones de presentación de fagos (documento WO 98/14277) y se han usado bibliotecas de presentación de fagos para analizar y controlar interacciones biomoleculares (documentos WO 98/20169; WO 98/20159) y propiedades de péptidos helicoidales restringidos (documento 98/20036). El documento WO 97/35196 describe un método para aislar un ligando de afinidad en el que una biblioteca de presentación de fagos se pone en contacto con una solución en la que el ligando se unirá con una molécula diana y una segunda solución en la que el ligando de afinidad no se unirá con la molécula diana, para aislar selectivamente ligandos de unión. El documento WO 97/46251 describe un método de bioselección de una biblioteca de presentación de fagos al azar con un anticuerpo purificado por afinidad y aislar después el fago de unión, seguido de un proceso de microselección usando pocillos de microplacas para aislar fagos de unión de alta afinidad. También se ha indicado el uso de la proteína A de *Staphylococcus aureus* como una etiqueta de afinidad (Li et al. (1998) Mol Biotech., 9: 187). El documento WO 97/47314 describe el uso de bibliotecas de sustracción de sustrato para distinguir especificidades enzimáticas usando una biblioteca combinatoria que puede ser una biblioteca de presentación de fagos. En el documento WO 97/09446 se describe un método adecuado para seleccionar enzimas para usar en detergentes usando presentación

de fagos. En las Patentes de Estados Unidos Nos: 5.498.538 y 5.432.018 y en el documento WO 98/15833 se describen métodos adicionales para seleccionar proteínas de unión específicas.

En las Patentes de Estados Unidos Nos 5.723.286, 5.432.018, 5.580.717, 5.427.908, 5.498.530, 5.770.434, 5.734.018, 5.698.426, 5.763.192 y 5.723.323 también se desvelan métodos para generar bibliotecas peptídicas y explorar estas bibliotecas.

Para las presentes bibliotecas, se empleó un enfoque de bioinformática para determinar las preferencias de longitud de bucle y diversidad de motivos estructurales de Tn3 de origen natural (véase el Ejemplo 2). Durante este análisis, se emplearon las preferencias para longitud de bucle y diversidad de secuencia para desarrollar un enfoque de "distribución al azar restringida". En esta distribución al azar restringida, las preferencias relativas de longitud de bucle y secuencia se incorporaron en el desarrollo de una estrategia de biblioteca. Por ejemplo, se determinó que una preferencia de longitud de bucle para el bucle BC era de 9 restos. Tras análisis adicional de bucles BC que contenían 9 restos se determinó si había una preferencia para un aminoácido particular, o grupo de aminoácidos en esa posición o si la posición era completamente al azar. La integración del análisis de diversidad de longitud de bucle y secuencia en el desarrollo de bibliotecas dio como resultado una distribución al azar restringida (es decir, se limitaron determinadas posiciones dentro del bucle distribuido al azar en las que el aminoácido podría residir en esa posición). En los Ejemplos (véase el Ejemplo 2) se describen ejemplos del enfoque de distribución al azar restringida.

La invención también proporciona bibliotecas que comprenden armazones de la invención descrita en el presente documento. En una realización, las bibliotecas comprende armazones polipéptidos de origen no natural que comprenden una pluralidad de dominios de cadena beta unidos con una pluralidad de secuencias de región de bucle derivadas de una secuencia proteica de origen natural, en la que una o más de dichas secuencias de región de bucle varían por delección, sustitución o adición de al menos un aminoácido de las secuencias de bucle correspondientes en la secuencia proteica de origen natural, y en la que los dominios de cadena beta del armazón del polipéptido tienen al menos 50 % de homología con las secuencias de dominio correspondientes de una secuencia proteica de origen natural. En algunas realizaciones la secuencia de origen natural es la secuencia proteica correspondiente a la tenascina humana Tn3. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural es una secuencia proteica correspondiente a un motivo estructural Tn3 adicional de tenascina C humana. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural es una secuencia proteica correspondiente a un motivo estructural Tn3 de otra proteína de tenascina, o como alternativa, una proteína de tenascina de otro organismo (tal como, pero sin limitación, tenascinas murinas, porcinas, bovinas o equinas). En otra realización más, la secuencia de origen natural es una secuencia proteica correspondiente a un motivo estructural Tn3 de cualquier organismo. En otras realizaciones, la secuencia de origen natural corresponde a un motivo estructural Tn3 predicho de un organismo termófilo, por ejemplo, pero sin limitación, *Archaeoglobus fulgidus*, *Staphylothermus marinus*, *Sulfolobus acidocaldarius*, *Sulfolobus solfataricus*, y *Sulfolobus tokodaii*. En otra realización más, los armazones tienen una secuencia proteica que tiene al menos 30 %, al menos 35 %, al menos 40 %, al menos 45 %, al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 %, al menos 95 % o al menos 99 % de homología con cualquiera de las secuencias correspondientes a un motivo estructural Tn3 o a un motivo estructural Tn3 predicho como se ha descrito anteriormente.

La biblioteca se incuba con la diana inmovilizada, el soporte se lava para retirar agentes de unión no específicos, y los agentes de unión más firmes se eluyen en condiciones muy rigurosas y se someten a PCR para recuperar la información de secuencia o para crear una nueva biblioteca de agentes de unión que puede usarse para repetir el proceso de selección, con o sin mutagénesis adicional de la secuencia. Pueden realizarse varios ciclos de selección hasta que se obtengan agentes de unión de suficiente afinidad para el antígeno.

En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones descritos en el presente documento. En una realización, las bibliotecas comprenden armazones que además comprenden al menos siete cadenas beta, en las que dichas cadenas beta se denominan cadenas A, B, C, D, E, F y G de extremo N a extremo C. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones que además comprenden al menos siete cadenas beta, estando cada cadena separada por una región de bucle en la que las regiones de bucle se denominan bucles AB, BC, CD, DE, EF, y FG del extremo N terminal al C terminal. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones que además comprenden al menos siete cadenas beta, denominadas cadenas A, B, C, D, E, F y G del extremo N terminal al C terminal en las que cada cadena está conectada por una región de bucle en la que las regiones de bucle se denominan AB, BC, CD, DE, EF y FG del extremo N terminal al C terminal.

En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones que además comprenden una o más regiones de bucle del armazón basado en el dominio Tn3 de tenascina C humana que comprende los restos de aminoácidos:

- I. del 12 al 17 inclusive en un bucle AB;
- II. del 23 al 31 inclusive en un bucle BC;
- III. del 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
- IV. del 50 al 56 inclusive en un bucle DE;
- V. del 60 al 66 inclusive en un bucle EF; y
- VI. del 75 al 84 inclusive en un bucle FG.

En otra realización específica, las bibliotecas comprenden armazones que además comprenden una o más regiones de bucle del armazón basado en el dominio Tn3 de tenastina C humana que comprende los restos de aminoácidos:

- 5 I. Del 11 al 17 inclusive en un bucle AB;
 II. Del 23 al 31 inclusive en un bucle BC;
 III. Del 39 al 45 inclusive en un bucle CD;
 IV. Del 51 al 56 inclusive in a DE;
 V. Del 60 al 67 inclusive en un bucle EF; y
 10 VI. Del 75 al 84 inclusive en un bucle FG.

Se describen bibliotecas que comprenden armazones que comprenden una diversidad de secuencias de bucle. En una realización, las bibliotecas comprenden armazones con al menos un bucle que contiene al menos una posición que está distribuida al azar. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones con al menos un bucle que comprende al menos una posición que se distribuye al azar comprendiendo además al mismo tiempo al menos una posición que se mantiene constante. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle que comprende al menos una posición que se somete a una distribución al azar restringida. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones con al menos un bucle que comprende al menos una posición que se somete a una distribución al azar restringida y adicionalmente comprende al menos una posición que se mantiene constante. En otra realización, las bibliotecas comprenden armazones con al menos un bucle que comprende al menos una posición que se somete a una distribución al azar restringida y adicionalmente comprende al menos una posición que se distribuye al azar y al menos una posición que se mantiene constante.

Los bucles que conectan las diversas cadenas del armazón proteico pueden distribuirse al azar con respecto a la diversidad de longitud y/o secuencia. En una realización, las bibliotecas tienen armazones con al menos un bucle que se distribuye al azar con respecto a la longitud y/o diversidad de secuencia. En otra realización las bibliotecas tienen armazones en los que al menos un bucle se mantiene constante mientras que al menos un bucle adicional se distribuye al azar con respecto a longitud y/o diversidad de secuencia. En otra realización, las bibliotecas tienen armazones en los que al menos uno, al menos dos, o los tres bucles AB, CD y EF se mantienen constantes mientras que al menos uno, al menos dos o los tres bucles BC, DE y FG se distribuye al azar con respecto a la diversidad de longitud o secuencia. En otra realización, las bibliotecas tienen armazones en los que al menos uno, al menos dos, o los tres bucles AB, CD y EF se distribuyen al azar mientras que al menos uno, al menos dos, o los tres bucles BC, DE y FG se distribuyen al azar con respecto a longitud o diversidad de secuencia.

35 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle BC que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: S-X-a-X-b-X-X-G, en la X representa cualquiera aminoácido, en la que (a) representa prolina o alanina y en la que (b) representa alanina o glicina.

40 En otra realización específica, los armazones comprenden un bucle BC que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G (SEC ID N°: 257), en la que X representa cualquiera aminoácido, en la que (d) representa prolina, glutamato o lisina, en la que (e) representa asparagina o glicina, y en la que (f) representa serina o glicina.

45 En otra realización, las bibliotecas tienen un bucle BC que comprenden 11 aminoácidos que tienen una secuencia consenso: S-P-c-X-X-X-X-T-G (SEC ID N°: 258), en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (c) representa prolina, serina o glicina.

50 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-G-X-X-S, en la que X representa cualquiera aminoácido y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

55 En otra realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-X-X- b-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina y en la que (b) serina o glicina.

En otra realización específica, las bibliotecas comprenden un armazón con un bucle FG que se distribuye al azar con la siguiente secuencia consenso: X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A (SEC ID N°: 259), en la que X representa cualquier aminoácido, y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

60 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle AB que comprende 7 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: K-X-X-X-X-a, en la que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina, y en la que (a) representa serina, treonina, alanina o glicina.

65 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle AB que comprenden 9 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: K-X-X-X-X-X-X-a, en la que X representa

asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina, y en la que (a) representa serina, treonina, alanina o glicina.

5 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle CD, que comprenden 7, 8 o 9 restos, en los que cada resto en el bucle CD se distribuye al azar y en los que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina.

10 En una realización específica, las bibliotecas comprenden armazones con un bucle EF que comprende 8 restos, que se distribuyen al azar con la siguiente secuencia consenso: X-b-L-X-P-X-c-X, en la que X representa asparagina, ácido aspártico, histidina, tirosina, isoleucina, valina, leucina, fenilalanina, treonina, alanina, prolina o serina y en la que (b) representa asparagina, lisina, serina, arginina, ácido aspártico, ácido glutámico o glicina y en la que (c) representa isoleucina, treonina, serina, valina, alanina o glicina.

15 Una realización adicional descrita en el presente documento es una colección de moléculas de ácido nucleico aisladas que codifican una biblioteca que comprende los armazones de la invención y como se ha descrito anteriormente.

20 Una consideración práctica adicional en el diseño de estas bibliotecas de Tn3 era identificar una alternativa al esquema de codón "NNK" (N = A, G, T, C; K = G, T) mixto típicamente usado en oligonucleótidos degradados para codificar cualquier aminoácido. Aunque la mezcla "NNK" proporciona 32 codones diferentes que codifican los 20 aminoácidos, no se codifican igualmente (Tabla 11). Por ejemplo, 3/32 (3 de 32) codones en el esquema "NNK" codifican Leu (CTG, CTT, TTG), pero solo 1/32 codifica Asp (GAT). Además, la mezcla "NNK" codifica un codón de terminación (TAG) y un codón de Cys (TGT), ninguno de los cuales es deseable cuando se generan bibliotecas sin tratamiento previo. Al considerar un esquema alternativo, los inventores observaron el hecho de que se habían descrito bibliotecas de anticuerpos sintéticos que codifican secuencias de CDR compuestas de un subconjunto pequeño de aminoácidos. Se ha mostrado que las bibliotecas de anticuerpos con CDR compuestas de tan solo 4 aminoácidos (Tyr, Ala, Asp, Ser), o incluso de un par binario (Tyr, Ser), producen mAb de alta afinidad específicos para antígenos proteicos (Fellouse *et al*, Proc Natl Acad Sci, 2004, 101: 12467-72, Fellouse *et al*. J. Mol. Biol., 2005, 348: 1153-62). De forma similar, una biblioteca de proteínas de armazón 10Fn3 con secuencias de bucle distribuidas al azar que comprenden solo Tyr y Ser también produjeron agentes de unión específicos para una diana proteica (Koide *et al*. Proc Natl Acad, Sci, 2007, 104: 66-32-7). Aunque las bibliotecas que contienen conjuntos altamente restringidos de aminoácidos son capaces de producir proteínas de unión específica, es probable que la diversidad de los agentes de unión que se obtienen de una biblioteca esté limitada. Por tanto, los inventores diseñaron tanto un esquema de codón mixto "NHT" alternativo para introducir diversidad en una biblioteca de Tn3 (H = A, T, C). Las mezclas "NHT" codifican un subconjunto razonable de los 20 aminoácidos, pero evitan las desventajas descritas con codones "NNK" mixtos (Tabla 12). Este esquema genera 12 codones que codifican 12/20 aminoácidos, es decir, cada codón codifica un solo aminoácido. Además, no hay codones de terminación o Cys. En consecuencia, en algunas realizaciones, los armazones comprenden codones codificados por el esquema de codón NHT. En otras realizaciones, los armazones comprenden codones codificados por el esquema de codón NNK mixto.

40 En otras realizaciones, los armazones pueden someterse a maduración de afinidad. En este proceso aceptado en la técnica, una proteína de unión específica se somete a un esquema que selecciona afinidad aumentada por una diana específica (véase Wu *et al*. Proc Natl Aca Sci USA. 26 de mayo de 1998; 95(11): 6037-42). Los armazones resultantes pueden mostrar características de unión al menos tan altas en comparación con los armazones previos a la maduración de afinidad.

50 En otras realizaciones, los armazones pueden someterse a "injerto de bucles" análogo al injerto de CDR para anticuerpos. En este proceso aceptado en la técnica, una o más CDR de un anticuerpo se "injertan" en un anticuerpo aceptor (o, en este ejemplo, un armazón (véase, Ewert *et al*. Methods: oct 2004; 34(2): 184-99). En otra realización, en un armazón puede injertarse al menos un bucle de otro armazón.

55 Se describen métodos para identificar la secuencia de aminoácidos de un armazón proteico capaz de unirse con la diana para formar un complejo de armazón:diana. En una realización, el método comprende las etapas de: a) proporcionar una biblioteca de presentación de polipéptidos; b) poner en contacto la biblioteca de presentación de polipéptidos de (a) con una diana inmovilizada o separable; c) separar los complejos armazón:diana de los armazones libres; d) provocar la replicación de los armazones separados de (c) para dar como resultado una nueva biblioteca de presentación de polipéptidos distinta de la de (a) por tener una diversidad reducida y por estar enriquecida en armazones presentados capaces de unirse con la diana; e) opcionalmente repetir las etapas (b), (c) y (d) con la nueva biblioteca de (d); y f) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica el armazón presentado de una especie de (d) y de este modo deducir la secuencia peptídica capaz de unirse con la diana.

65 En otra realización, los armazones pueden adicionalmente distribuirse al azar después de la identificación de una exploración de biblioteca. En una realización, los métodos comprenden adicionalmente distribuir al azar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles de un armazón identificado a partir de una biblioteca usando un método descrito en el presente documento. En otra realización, el armazón adicionalmente distribuido al azar se somete a un método de identificación posterior de un armazón capaz

de unirse con una diana, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto dicho armazón adicionalmente distribuido al azar con una diana inmovilizada o separable, (b) separar los complejos de armazón adicionalmente distribuido al azar:diana de los armazones libres, (c) provocar la replicación de los armazones separados de (b), opcionalmente repetir las etapas (a)-(c) y (d) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica dicho armazón adicionalmente distribuido al azar, y de este modo, deducir la secuencia peptídica capaz de unirse con la diana. En una realización adicional, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles distribuidos al azar que se distribuyeron al azar previamente en la primera biblioteca. En una realización adicional alternativa, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles distribuidos al azar que no se habían distribuido al azar previamente en la primera biblioteca.

En otra realización, los armazones pueden adicionalmente distribuirse al azar después de la identificación de una exploración de biblioteca. En una realización, los métodos comprenden adicionalmente distribuir al azar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas de un armazón identificado a partir de una biblioteca usando un método descrito en el presente documento. En otra realización, el armazón adicionalmente distribuido al azar se somete a un método de identificación posterior de un armazón capaz de unirse con una diana, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto dicho armazón adicionalmente distribuido al azar con una diana inmovilizada o separable, (b) separar los complejos de armazón adicionalmente distribuido al azar:diana de los armazones libres, (c) provocar la replicación de los armazones separados de (b), opcionalmente repetir las etapas (a)-(c) y (d) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica dicho armazón adicionalmente distribuido al azar, y de este modo, deducir la secuencia peptídica capaz de unirse con la diana. En una realización adicional, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas distribuidas al azar que se distribuyeron previamente al azar en la primera biblioteca. En una realización adicional alternativa, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas distribuidas al azar que no se habían distribuido al azar previamente en la primera biblioteca.

En otra realización, los armazones pueden adicionalmente distribuirse al azar después de la identificación de una exploración de biblioteca. En una realización, los métodos comprenden adicionalmente distribuir al azar al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis y al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas de un armazón identificado a partir de una biblioteca usando un método descrito en el presente documento. En otra realización, el armazón adicionalmente distribuido al azar se somete a un método de identificación posterior de un armazón capaz de unirse con una diana, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto dicho armazón adicionalmente distribuido al azar con una diana inmovilizada o separable, (b) separar los complejos de armazón adicionalmente distribuido al azar:diana de los armazones libres, (c) provocar la replicación de los armazones separados de (b), opcionalmente repetir las etapas (a)-(c) y (d) determinar la secuencia de ácido nucleico de la región que codifica dicho armazón adicionalmente distribuido al azar, y de este modo, deducir la secuencia peptídica capaz de unirse con la diana. En una realización adicional, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles distribuidos al azar y al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas que se habían distribuido al azar previamente en la primera biblioteca. En una realización adicional alternativa, los armazones adicionalmente distribuidos al azar comprenden al menos uno, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis bucles distribuidos al azar y al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o al menos siete cadenas que no se habían distribuido al azar previamente en la primera biblioteca.

En otra realización, un método para obtener un armazón implica un primer bucle distribuido al azar seleccionado del grupo que consiste en los bucles BC, DE y FG y un segundo bucle no distribuido al azar en dicha biblioteca seleccionado del grupo que consiste en los bucles AB, CD y EF. En otra realización más, otro método para obtener un armazón implica un primer bucle distribuido al azar seleccionado del grupo que consiste en los bucles AB, CD, EF y un segundo bucle no distribuido al azar en dicha biblioteca seleccionado del grupo de consiste en los bucles BC, DE y FG.

Se describe un método para obtener al menos dos armazones que se unen con al menos una o más dianas. Este método permite la exploración de agentes que actúan de forma cooperativa para inducir una respuesta particular. Puede ser ventajoso usar dicha exploración cuando se requiere una actividad agonista que requiere la cooperación de más de un armazón (por ejemplo, pero sin limitación, agonismo de una tirosina quinasa receptora). Este método permite explorar agentes cooperativos sin reformatear la biblioteca para formar complejos multiméricos. En una realización, el método comprende poner en contacto un ligando diana con una biblioteca en condiciones que permitan que se forme un complejo de armazón:ligando diana, haciendo interaccionar dichos armazones con un agente reticulante (definido como un agente que pone en contacto, en estrecha proximidad, al menos dos armazones idénticos o distintos) en el que la reticulación de los armazones induce una respuesta detectable y obtener del complejo, dichos armazones que se unen con la diana. En una realización adicional, el agente

reticulante es un anticuerpo específico de armazón, o fragmento del mismo, un anticuerpo específico de etiqueta epitópica de un fragmento del mismo, un dominio de dimerización, tal como la región Fc, un motivo de cremallera de leucina, un reticulante químico u otro dominio de dimerización conocido en la técnica.

5 Se describen métodos para detectar un compuesto utilizando los armazones descritos en el presente documento. Basándose en las especificidades de unión de los armazones obtenidos por exploración de bibliotecas, es posible usar dichos armazones en ensayos para detectar la diana específica en una muestra, tal como para métodos de diagnóstico. En una realización, método para detectar un compuesto comprende poner en contacto dicho compuesto en una muestra con un armazón, en condiciones que permitan formar un complejo de compuesto:armazón y
10 detectar dicho armazón, detectando de este modo dicho compuesto en una muestra. En realizaciones adicionales, el armazón se marca (es decir, un radiomarcador, marcador fluorescente, ligado a enzima o colorimétrico) para facilitar la detección de dicho compuesto.

15 También se describen métodos para capturar un compuesto utilizando los armazones. Basándose en las especificidades de unión de los armazones obtenidos por exploración de bibliotecas, es posible usar dichos armazones en ensayos para capturar la diana específica en una muestra, tal como para métodos de purificación. En una realización, el método para capturar un compuesto en una muestra comprende poner en contacto dicho compuesto en una muestra con un armazón en condiciones que permitan la formación de un complejo de compuesto:armazón y retirar dicho complejo de la muestra, capturando de este modo dicho compuesto en dicha
20 muestra. En realizaciones adicionales, el armazón se inmoviliza para facilitar la retirada del complejo de compuesto:armazón.

En algunas realizaciones, los armazones aislados de bibliotecas comprenden al menos una, al menos dos, al menos cuatro, al menos cinco, al menos seis o más regiones de bucle distribuidas al azar. En algunas realizaciones, las
25 secuencias de bucle de armazón aislado pueden intercambiarse de un armazón donante a cualquier bucle en un armazón receptor (por ejemplo, una secuencia de bucle AB de un armazón donante puede transferirse a una región de bucle y en un armazón receptor). En realizaciones específicas, una secuencia de bucle aislada puede transferirse al bucle afín en el armazón receptor (por ejemplo, una secuencia de bucle AB de un armazón donante puede transferirse a un armazón receptor en la posición de bucle AB). En algunas realizaciones, las secuencias de bucle
30 aisladas pueden “mezclarse y emparejarse” al azar con diversos armazones receptores.

En otras realizaciones, pueden identificarse secuencias de armazones aislados por la secuencia de bucle. Por ejemplo, se usa una biblioteca para seleccionar frente a una diana particular y se aísla una colección de agentes de unión específicos. Las secuencias de bucle distribuidas al azar pueden caracterizarse como secuencias específicas
35 independientemente del fondo del armazón (es decir, el armazón que se une con la diana X en el que dicho armazón comprende una secuencia de bucle AB de SEC ID N°: x). En realizaciones alternativas, cuando un armazón muestra dos secuencias de bucle que se unen con la diana X, las secuencias de bucle pueden caracterizarse como diana X de unión en ausencia de la secuencia de armazón. En otras palabras, se contempla que los armazones aislados de una biblioteca que se unen con una diana particular puedan expresarse como las secuencias de bucle variable que
40 se unen con esa diana independientemente de la cadena principal del armazón. Este proceso sería análogo al concepto de las CDR en regiones variables de anticuerpos.

En algunas realizaciones, los armazones comprenden secuencias que se unen específicamente con SYNAGIS®. En dichas realizaciones, los armazones que se unen específicamente con SYNAGIS® pueden comprender una
45 secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 100, 102, 105, 107 y 109. En otras realizaciones, los armazones que se unen específicamente con SYNAGIS® pueden comprender una secuencia de bucle FG seleccionada de las SEC ID Nos: 101, 103, 104, 106, 108 o 110. En realizaciones adicionales, los armazones que se unen específicamente con SYNAGIS® pueden comprender al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 100, 102, 105, 107 y 109; y pueden comprender al menos una secuencia de bucle FG seleccionada
50 de las SEC ID Nos: 101, 103, 104, 106, 108 o 110. Se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen específicamente con SYNAGIS®, comprendiendo dichos agentes de unión a SYNAGIS® una secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 100, 102, 105, 107 y 109; y comprendiendo una secuencia de bucle FG seleccionada de las SEC ID Nos: 101, 103, 104, 106, 108 o 110. Pueden realizarse ensayos de competición como se presenta en este documento en los Ejemplos 11 y/o 14, o por otros ensayos conocidos en la técnica.
55

En algunas realizaciones, se describen armazones que comprenden secuencias que se unen específicamente con lisozima. En dichas realizaciones, los armazones que se unen específicamente con lisozima pueden comprender al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 111, 114, 102, 120 y 124. En otras
60 realizaciones, los armazones que se unen específicamente con lisozima pueden comprender al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de las SEC ID Nos: 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 o 125. En realizaciones adicionales, los armazones que se unen específicamente con lisozima pueden comprender al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 111, 114, 102, 120 y 124; y pueden comprender al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de las SEC ID Nos: 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 o
65 125. En otras realizaciones, se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen con

lisozima, comprendiendo dichos agentes de unión a lisozima al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de las SEC ID Nos: 111, 114, 102, 120 o 124; y al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de las SEC ID Nos: 112, 113, 115, 116, 117, 118, 119, 121, 122 o 125. Pueden realizarse ensayos de competición como se presenta en el este documento en los Ejemplos 11 y/o 14, o por otros ensayos conocidos en la técnica.

5

5.5. Armazones multiméricos

Además de los monómeros de armazones, puede generarse cualquiera de las construcciones de armazón descritas en el presente documento como dímeros o multímeros de armazones como un medio para aumentar la valencia y por lo tanto la avidéz de la unión al antígeno. Además, cualquiera de las construcciones de armazón descritas en el presente documento puede generarse como dímeros o multímeros de armazones como un medio para aumentar la especificidad de la unión al antígeno (por ejemplo, pueden generarse armazones que se unan con antígenos distintos). Dichos multímeros (armazones multiméricos o también conocidos en el presente documento como armazones multivalentes) pueden generarse mediante unión covalente entre módulos de armazones individuales, por ejemplo, mediante la inclusión de un enlazador de aminoácidos. En otros métodos, los armazones multiméricos pueden ensamblarse mediante el uso de dominios de dimerización conocidos en la técnica. En ejemplos particulares, pueden generarse armazones unidos por enlace covalente construyendo genes de fusión que codifican los armazones monoméricos o, como alternativa, modificando técnicamente codones para restos de cisteína en secuencias monoméricas y permitiendo que se produzca la formación de enlaces disulfuro entre los productos de expresión.

20

También pueden generarse armazones multiméricos unidos por enlace no covalente mediante una diversidad de técnicas. Éstas incluyen la introducción, en secuencias monoméricas, de codones correspondientes a restos con carga positiva y/o negativa y permitir que se produzcan interacciones entre estos restos en los productos de expresión (y por lo tanto entre los monómeros). Este enfoque puede simplificarse aprovechando los restos con carga presentes de forma natural en una subunidad monomérica. Otro medio para generar armazones unidos por enlace no covalente es introducir, en el gen del armazón monomérico (por ejemplo, en los extremos amino o carboxilo), las secuencias codificantes de proteínas o dominios proteicos que se sabe que interaccionan. Dichas proteínas o dominios proteicos incluyen motivos súper enrollados, motivos de cremallera de leucina y cualquiera de las numerosas subunidades proteicas (o fragmentos de las mismas) que se sabe que dirigen la formación de dímeros o multímeros de orden superior.

25

30

En algunas realizaciones, los armazones multiméricos comprenden al menos un armazón fusionado con cualquier dominio (o fragmento) de un anticuerpo. En algunas realizaciones, al menos un armazón está fusionado con un dominio variable de anticuerpo, un dominio CH1, un dominio Ckappa, un dominio Clambda, un dominio CH2 o uno CH3. En otras realizaciones, al menos un armazón está fusionado con el dominio CH2 de un anticuerpo Fc. En dichas realizaciones, cuando la proteína resultante se exprese, será bivalente para una diana particular mediante la dimerización de las regiones CH2 y CH3 del fragmento Fc de anticuerpo. En realizaciones adicionales, el armazón reemplaza la región variable de anticuerpo conectada con el fragmento Fc. En realizaciones alternativas, el armazón no reemplaza la región variable de anticuerpo conectada con el fragmento CH1-Fc, dominios Ckappa o Clambda.

35

40

En realizaciones adicionales, se construyen armazones multiméricos fusionando armazones con las regiones CH1 y la Ckappa o Clambda de un anticuerpo. En algunas realizaciones, los armazones reemplazan las regiones variables de anticuerpo fusionadas con las regiones CH1 y la Ckappa o Clambda de un anticuerpo. En realizaciones adicionales, los armazones pueden fusionarse con el extremo C de la cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo. En otras realizaciones, los armazones pueden fusionarse con el extremo N de una cadena ligera o cadena pesada de un anticuerpo.

45

En algunas realizaciones, los armazones multiméricos comprenden armazones que son específicos para el mismo epítipo. En otras realizaciones, los armazones multiméricos comprenden armazones que son específicos para diferentes epítipos conocidos de otro modo como un dominio de unión a epítipo. Pueden ensamblarse armazones multiméricos y utilizarse como se muestra en "Multispecific epitope binding proteins and uses thereof" Solicitud de Estados Unidos N° de serie 12/182,975, presentada el 30 julio de 2008. Dichos dominios de unión a epítipo pueden seleccionarse de un anticuerpo, un fragmento de anticuerpo, un diacuerpo, un scFv, un Fab, un Fv o un péptido de unión.

50

55

En otras realizaciones, el dominio de unión a epítipo será específico para la misma diana que la del armazón.

En otra realización, el dominio de unión a epítipo será específico para una diana diferente a la del armazón.

60

La elección de un enlazador adecuado para un caso específico en el que van a conectarse dos o más armazones puede depender de una diversidad de parámetros incluyendo, por ejemplo, la naturaleza de los dominios monoméricos y/o la estabilidad del enlazador peptídico hacia la proteólisis y la oxidación.

El polipéptido enlazador puede incluir predominantemente restos de aminoácidos seleccionados del grupo de consiste en Gly, Ser, Ala y Thr. Por ejemplo, el enlazador peptídico puede contener al menos 75 % (calculado

65

basándose en el número total de restos presentes en el enlazador peptídico), tal como al menos 80 %, por ejemplo, al menos 85 % o al menos 90 % de restos de aminoácidos seleccionados del grupo de consiste en Gly, Ser, Ala y Thr. El enlazador peptídico también puede consistir solo en los restos Gly, Ser, Ala y/o Thr. El polipéptido enlazador debería tener una longitud, que fuese adecuada para unir dos o más dominios monoméricos o dos o más armazones multiméricos, de tal modo que adopten la conformación correcta uno en relación con el otro de modo que conserven la actividad deseada.

Una longitud adecuada para este fin es una longitud de al menos uno y típicamente menos de aproximadamente 50 restos de aminoácidos, tal como 2-25 restos de aminoácidos, 5-20 restos de aminoácidos, 5-15 restos de aminoácidos, 8-12 restos de aminoácidos u 11 restos. De forma similar, el polipéptido que codifica un enlazador puede variar en tamaño, por ejemplo, de aproximadamente 2 a aproximadamente 15 aminoácidos, de aproximadamente 3 a aproximadamente 15, de aproximadamente 4 a aproximadamente 12, de aproximadamente 10, aproximadamente 8 o aproximadamente 6 aminoácidos. En métodos y composiciones que implican ácidos nucleicos, tales como ADN, ARN o combinaciones de ambos, el polinucleótido que contiene la secuencia enlazadora puede tener, por ejemplo, de entre aproximadamente 6 nucleótidos y aproximadamente 45 nucleótidos, entre aproximadamente 9 nucleótidos y aproximadamente 45 nucleótidos, entre aproximadamente 12 nucleótidos y aproximadamente 36 nucleótidos, aproximadamente 30 nucleótidos, aproximadamente 24 nucleótidos o aproximadamente 18 nucleótidos. De forma similar, los restos de aminoácidos seleccionados para su inclusión en el polipéptido enlazador deberían mostrar propiedades que no interfiriesen significativamente con la actividad o función del multímero polipeptídico. Por lo tanto, el enlazador peptídico no debería mostrar en general una carga que no fuera coherente con la actividad o función del multímero polipeptídico, o que interfiera con el plegamiento interno, o forme enlaces u otras alteraciones con restos de aminoácidos en uno o más de los dominios monoméricos que impidieran gravemente la unión del multímero polipeptídico con dianas específicas.

El enlazador peptídico también puede seleccionarse de una biblioteca en la que los restos de aminoácidos en el enlazador peptídico se distribuyen al azar para un conjunto específico de dominios monoméricos en un multímero polipeptídico particular. Podría usarse un enlazador flexible para encontrar combinaciones adecuadas de dominios monoméricos, que después se optimiza usando esta biblioteca al azar de enlazadores variables para obtener enlazadores con longitud y geometría óptimas. Los enlazadores óptimos pueden contener el número mínimo de restos de aminoácidos del tipo correcto que participe en la unión con la diana y limite el movimiento de los dominios monoméricos entre sí en el multímero polipeptídico cuando no estén unidos a dianas específicas.

El uso de enlazadores peptídicos de origen natural así como artificiales para conectar polipéptidos en nuevos polipéptidos de fusión unidos se conoce bien en la bibliografía (Hallewell *et al.* (1989), *J. Biol. Chem.* 264, 5260-5268; Alfthan *et al.* (1995), *Protein Eng.* 8, 725-731; Robinson y Sauer (1996), *Biochemistry* 35, 109-116; Khandekar *et al.* (1997), *J. Biol. Chem.* 272, 32190-32197; Fares *et al.* (1998), *Endocrinology* 139, 2459-2464; Smallshaw *et al.* (1999), *Protein Eng.* 12, 623-630; Patente de Estados Unidos N° 5.856.456).

Como se ha mencionado anteriormente, se prefiere en general que el enlazador peptídico posea al menos algo de flexibilidad. En consecuencia, en algunas realizaciones, el enlazador peptídico contiene 1-25 restos de glicina, 5-20 restos de glicina, 5-15 restos de glicina u 8-12 restos de glicina. El enlazador peptídico contendrá típicamente al menos 50 % de restos de glicina, tal como al menos 75 % de restos de glicina. En algunas realizaciones, el enlazador peptídico comprende solo restos de glicina. En realizaciones específicas, las secuencias enlazadoras pueden comprender una secuencia de (G-G-G-G-S)_x (SEC ID N°: 260) en la que x es un número entero positivo. En otra realización específica, las secuencias enlazadoras pueden comprender una secuencia de (G-A)_x en la que x es un número entero positivo. En otra realización específica, las secuencias enlazadoras pueden comprender una secuencia de (G-G-G-T-P-T)_x (SEC ID N°: 261) en la que x es un número entero positivo.

En algunos casos puede ser deseable o necesario proporcionar algo de rigidez al enlazador peptídico. Esto puede conseguirse incluyendo restos de prolina en la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico. Por tanto, en otra realización, el enlazador peptídico puede comprender al menos un resto de prolina en la secuencia de aminoácidos del enlazador peptídico. Por ejemplo, el enlazador peptídico tiene una secuencia de aminoácidos, en la que al menos el 25 %, tal como al menos el 50 %, por ejemplo al menos el 75 %, de los restos de aminoácidos son restos de prolina. En una realización particular, el enlazador peptídico comprende solo restos de prolina.

En algunas realizaciones, el enlazador peptídico se modifica de tal modo que se introduzca un resto de aminoácido que comprenda un grupo de unión para una fracción no polipeptídica. Los ejemplos de dichos restos de aminoácidos pueden ser un resto de cisteína (con el que se une posteriormente la fracción no polipeptídica) o la secuencia de aminoácidos puede incluir un sitio de N- glucosilación *in vivo* (uniendo este modo una fracción de azúcar *in vivo*) con el enlazador peptídico). Una opción adicional es incorporar genéticamente aminoácidos no naturales usando ARNt evolucionados y ARNt sintetasas (véase, por ejemplo, la Publicación de Solicitud de Patente de Estados Unidos N° de Serie 2003/0082575) en los dominios monoméricos o enlazadores. Por ejemplo, la inserción de cetotirosina permite el acoplamiento específico de sitio con dominios monoméricos o multímeros expresados.

En ocasiones, las secuencias de aminoácidos de todos los enlazadores peptídicos presentes en el multímero polipeptídico serán idénticas. Como alternativa, las secuencias de aminoácidos de todos los enlazadores peptídicos presentes en el multímero polipeptídico pueden ser diferentes.

5.6. Fusiones

Los armazones descritos en el presente documento pueden fusionarse con otros dominios proteicos. Por ejemplo, estos armazones pueden integrarse con la respuesta inmunitaria humana fusionando la región constante de una IgG (Fc) con un armazón, mediante el extremo N o C. La molécula de fusión Fc activa el componente del complemento de la respuesta inmunitaria y aumenta el valor terapéutico de armazón proteico. De forma similar, una fusión entre un armazón y una proteína del complemento, tal como Clq, puede usarse para dirigirse a células, y puede usarse una fusión entre un armazón y una toxina para destruir específicamente células que portan un antígeno particular.

Adicionalmente, diversas publicaciones describen métodos para obtener moléculas fisiológicamente activas cuyas semividas se modifican introduciendo en las moléculas un polipéptido de unión a FcRn (documento WO 97/43316; Patente de Estados Unidos N° 5.869.046; Patente de Estados Unidos N° 5.747.035; documentos WO 96/32478; WO 91/14438) o fusionando las moléculas con anticuerpos cuyas afinidades de unión a FcRn están conservadas pero las afinidades por otros receptores de Fc se han reducido enormemente (documento WO 99/43713) o fusionando con dominios de anticuerpos de unión a FcRn (documento WO 00/09560; Patente de Estados Unidos N° 4.703.039). También pueden encontrarse técnicas y métodos específicos para aumentar la semivida de moléculas fisiológicamente activas en la Patente de Estados Unidos N° 7.083.784 concedida el 1 de agosto de 2006 titulada "Antibodies with Increased Half-lives". Específicamente, se contempla que los armazones puedan fusionarse con una región de Fc de una IgG, donde dicha región Fc comprende mutaciones de restos de aminoácidos (como se enumera por el índice EU en Kabat): M252Y/S254T/T256E o H433K/N434F/Y436H.

Además, los armazones pueden fusionarse con moléculas que aumentan o prolongan la semivida *in vivo* o en suero. En algunas realizaciones, los armazones se asocian con albúmina, tal como albúmina de suero humano (HSA), polietilenglicol (PEG), polisacáridos, moléculas de inmunoglobulina (IgG), complemento, hemoglobina, un péptido de unión, lipoproteínas y otros factores para aumentar su semivida en el torrente sanguíneo y/o su penetración tisular. Cualquiera de estas fusiones puede generarse por técnicas convencionales, por ejemplo, por expresión de la proteína de fusión a partir de un gen de fusión recombinante construido usando secuencias génicas disponibles al público.

Además, los armazones pueden unirse o asociarse con moléculas que aumentan o prolongan la semivida *in vivo* o en suero. En algunas realizaciones, los armazones se asocian con albúmina, polietilenglicol (PEG), polisacáridos, moléculas de inmunoglobulina o moléculas de inmunoglobulina que tienen mutaciones de Fc que aumenta la semivida en suero, complemento, hemoglobina, lipoproteínas y otros factores para aumentar la semivida en suero. Cualquiera de estas fusiones puede generarse por técnicas convencionales, por ejemplo, por expresión de la proteína de fusión a partir de un gen de fusión recombinante construido usando secuencias génicas disponibles al público.

El término "polietilenglicol" o "PEG" significa un compuesto de polietilenglicol o un derivado del mismo, con o sin agentes de acoplamiento, fracciones de acoplamiento o activación (por ejemplo, con tiol, triflato, tresilato, azirdina, oxirano, *N*-hidroxisuccinimida o una fracción de maleimida). Se entiende que el término "PEG" indica polietilenglicol de un peso molecular entre 500 y 150.000 Da, incluyen análogos del mismo, en los que, por ejemplo, el grupo OH terminal se ha reemplazado por un grupo metoxi (denominado mPEG).

En una realización, los armazones se derivatizan con polietilenglicol (PEG). PEG es un polímero lineal, soluble en agua de unidades de repetición de óxido de etileno con dos grupos hidroxilo terminales. Los PEG se clasifican por sus pesos moleculares que típicamente varían de aproximadamente 500 Dalton a aproximadamente 40.000 Dalton. En una realización actualmente preferida, los PEG empleados tienen pesos moleculares que varían de 5.000 Dalton a aproximadamente 20.000 Dalton. Los PEG acoplados a los armazones pueden ser ramificados o no ramificados. (Véase, por ejemplo, Monfardini, C. *et al.* 1995 *Bioconjugate Chem* 6: 62-69). Los PEG están disponibles en el comercio de Nektar Inc., Sigma Chemical Co. y otras compañías. Dichos PEG incluyen, pero sin limitación, monometoxipolietilenglicol (MePEG-OH), monometoxipolietilenglicol-succinato (MePEG-S), monometoxipolietilenglicol-succinimidil succinato (MePEG-S--NHS), monometoxipolietilenglicol-amina (MePEG-NH₂), monometoxipolietilenglicol-tresilato (MePEG-TRES), y monometoxipolietilenglicol-imidazolil-carbonilo (MePEG-IM).

Brevemente, en una realización, el polímero hidrófilo que se emplea, por ejemplo, PEG, está protegido en un extremo por un grupo no reactivo tal como un grupo metoxi o etoxi. A continuación, el polímero se activa en el otro extremo por reacción con un agente activador adecuado, tal como haluros cianúricos (por ejemplo, cloruro, bromuro o fluoruro cianúrico), diimidazol, un agente anhídrido (por ejemplo, un anhídrido dihalosuccínico, tal como anhídrido dibromosuccínico), acil azida, *p*-diazoniobencil éter, 3-(*p*-diazoniufenoxi)-2-hidroxiopropiléter) y similares. El polímero activado se hace reaccionar después con un polipéptido como se describe en el presente documento para producir un polipéptido derivatizado con un polímero. Como alternativa, puede activarse un grupo funcional en los armazones para reacción con el polímero, o los dos grupos pueden unirse en una reacción de acoplamiento concertada usando

métodos de acoplamiento conocidos. Se apreciará fácilmente que los polipéptidos pueden derivatizarse con PEG usando una miríada de otros esquemas de reacción conocidos y usados por los expertos en la técnica.

5 En algunas realizaciones, los armazones se modifican técnicamente para proporcionar grupos reactivos para conjugación. En dichos armazones, el extremo N y/o C también pueden actuar para proporcionar grupos reactivos para la conjugación. En otras realizaciones, el extremo N puede conjugarse con una fracción (tal como, pero sin limitación, PEG) mientras que el extremo C se conjuga con otra fracción (tal como, pero sin limitación, biotina) o viceversa.

10 La expresión "semivida *in vivo*" se usa en su significado normal, es decir, el momento en el que aún está presente el 50 % de la actividad biológica del polipéptido en el cuerpo/órgano diana, o el momento en el que la actividad del polipéptido es el 50 % de su valor inicial. Como alternativa para determinar la semivida *in vivo* funcional, puede determinarse la "semivida en suero", es decir, el momento en el que el 50 % de las moléculas polipeptídicas circulan en el plasma o en el torrente sanguíneo antes de eliminarse. La determinación de la semivida en suero es con frecuencia más sencilla que la determinación de la semivida funcional y la magnitud de la semivida suero es habitualmente un buen indicio de la magnitud de la semivida *in vivo* funcional. Las expresiones alternativas a la semivida en suero incluyen semivida en plasma, semivida en circulación, semivida circulatoria, eliminación del suero, eliminación del plasma y semivida de eliminación. La funcionalidad para conservar normalmente se selecciona de actividad procoagulante, proteolítica, de unión a co-factor, de unión receptor, u otro tipo de actividad biológica asociada con la proteína particular.

25 El término "aumentada" con respecto a la semivida *in vivo* funcional o semivida en plasma se usa para indicar que la semivida relevante del polipéptido está estadísticamente de modo significativo aumentada en relación con la de una molécula de referencia (por ejemplo, un polipéptido no modificado), determinada en condiciones comparables. Por ejemplo la semivida relevante puede aumentarse en al menos aproximadamente 25 %, tal como en al menos aproximadamente 50 %, por ejemplo, en al menos aproximadamente 100 %, al menos aproximadamente 150 %, al menos aproximadamente 200 %, al menos aproximadamente 250 %, o al menos aproximadamente 500 % en comparación con una molécula de referencia no modificada. En otras realizaciones, la semivida puede aumentarse en al menos aproximadamente 1 vez, al menos 2 veces, al menos 3 veces, al menos 4 veces, al menos 5 veces, al menos 10, al menos 20 veces, o al menos 50 veces en comparación con una molécula de referencia no modificada.

5.7 Realizaciones de distribución al azar

35 En un aspecto, se describen armazones distribuidos al azar. En otra realización, se describen armazones multiméricos distribuidos al azar. En otra realización, se describen armazones distribuidos al azar modificados técnicamente con disulfuro. En otra realización más, se describen bibliotecas que comprenden armazones distribuidos al azar. Más adelante se proporciona el esquema de distribución al azar de los armazones y las bibliotecas de presentación que comprenden dichos armazones.

40 En una realización, los armazones comprenden al menos 1, al menos 2, al menos 3, al menos 4, al menos 5 o al menos 6 bucles distribuidos al azar. En otra realización, los armazones comprenden al menos un bucle distribuido al azar en el que, al menos el bucle AB, o al menos el BC, o al menos el CD, o al menos DE, o al menos EF, o al menos FG, se distribuye al azar.

45 En una realización, los armazones comprenden un bucle distribuido al azar. Por ejemplo, los armazones pueden comprender un bucle AB distribuido al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender un bucle BC distribuido al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender un bucle CD distribuido al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender un bucle DE distribuido al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender un bucle EF distribuido al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender un bucle FG distribuido al azar.

50 En una realización, los armazones comprenden dos bucles distribuidos al azar. Por ejemplo, los armazones pueden comprender los bucles AB y BC distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles AB y CD distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles AB y DE distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles AB y EF distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles AB y FG distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles BC y CD distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles BC y DE distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles BC y DE distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles BC y EF distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles BC y FG distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles CD y DE distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles CD y EF distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles CD y FG distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles DE y EF distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles DE y FG distribuidos al azar. En otra realización, los armazones pueden comprender los bucles EF y FG distribuidos al azar.

armazones pueden comprender bucles BC, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, DE y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles CD, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. . En otra realización, los armazones pueden comprender bucles CD, DE y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles CD, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia.

En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD y DE distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, CD, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, CD, DE y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, CD, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, CD, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, CD, DE y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, CD, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles CD, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia

En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD, DE y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, CD, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles AB, BC, CD, DE y EF distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia. En otra realización, los armazones pueden comprender bucles BC, CD, DE, EF y FG distribuidos al azar con respecto a longitud y diversidad de secuencia.

5.8 Conjugados de armazones

Se describe el uso de armazones conjugados o fusionados con una o más fracciones, incluyendo pero sin limitación, péptidos, polipéptidos, proteínas, proteínas de fusión, moléculas de ácido nucleico, moléculas pequeñas, agentes miméticos, fármacos sintéticos, moléculas inorgánicas y moléculas orgánicas. Se describe el uso de armazones fusionados de forma recombinante o conjugados de forma química (incluyendo conjugaciones tanto covalentes como no covalentes) con una proteína o un polipéptido heterólogo (o fragmento del mismo, hasta un polipéptido de al menos 10, al menos 20, al menos 30, al menos 40, al menos 50, al menos 60, al menos 70, al menos 80, al menos 90 o al menos 100 aminoácidos) para generar proteínas de fusión. No es estrictamente necesario que la fusión sea directa, sino que puede producirse mediante secuencias enlazadoras descritas en el presente documento. Por ejemplo, pueden usarse armazones para dirigir polipéptidos heterólogos a tipos de células particulares, bien *in vitro* o *in vivo*, fusionando o conjugando los armazones con anticuerpos específicos para receptores de superficie celular particulares. También pueden usarse armazones fusionados o conjugados con polipéptidos heterólogos en inmunoensayos *in vitro* y métodos de purificación usando métodos conocidos en la técnica. Véase, por ejemplo, la Publicación Internacional N° WO 93/21232; la Patente Europea N° EP 439,095; Naramura *et al.*, 1994, Immunol. Lett. 39: 91-99; la Patente de Estados Unidos N° 5.474.981; Gillies *et al.*, 1992, PNAS 89: 1428-1432; y Fell *et al.*, 1991, J. Immunol. 146 :2446-2452.

Pueden generarse armazones que comprenden proteínas de fusión adicionales mediante las técnicas de redistribución de genes, redistribución de motivos, redistribución de exones y/o redistribución de codones (denominadas en su conjunto "redistribución de ADN"). La redistribución de ADN puede emplearse para alterar las actividades de los armazones (por ejemplo, armazones con mayores afinidades y menores velocidades de disociación). Véanse, las Patentes de Estados Unidos Nos 5.605.793; 5.811.238; 5.830.721; 5.834.252 y 5.837.458, y Patten *et al.*, 1997, Curr. Opinion Biotechnol. 8: 724-33; Harayama, 1998, Trends Biotechnol. 16(2): 76-82; Hansson, *et al.*, 1999, J. Mol. Biol. 287: 265-76; y Lorenzo y Blasco, 1998, Biotechniques 24(2): 308-313. Los armazones, o los armazones codificados de los mismos, pueden alterarse sometiéndose a mutagénesis al azar por PCR propensa a error, inserción de nucleótidos al azar u otros métodos antes de la recombinación. Una o más

partes de un polinucleótido que codifica un armazón, que se une con una diana específica, pueden recombinarse con uno o más componentes, motivos, secciones, partes, dominios, fragmentos, etc. de una o más moléculas heterólogas.

Además, los armazones pueden fusionarse con secuencias marcadoras, tales como un péptido, para facilitar la purificación. En algunas realizaciones, la secuencia de aminoácidos marcadora es un péptido de hexa-histidina (etiqueta de his), tal como la etiqueta proporcionada en un vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), entre otras, muchas de las cuales están disponibles en el comercio. Como se describe en Gentz *et al.*, 1989, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86:821-824, por ejemplo, la hexa-histidina posibilita una purificación conveniente de la proteína de fusión. Otras etiquetas peptídicas útiles para la purificación incluyen, pero sin limitación, la etiqueta de hemaglutinina "HA", que corresponde a un epítipo derivado de la proteína de hemaglutinina gipal (Wilson *et al.*, 1984, Cell 37:767) y la etiqueta "flag".

En otras realizaciones, los armazones, análogos o derivados de los mismos, pueden conjugarse con un agente de diagnóstico o detectable. Dichos armazones pueden ser útiles para controlar o pronosticar el desarrollo o progresión de una enfermedad como parte de un procedimiento de ensayo clínico, tal como determinar la eficacia de una terapia particular. Dicho diagnóstico y detección puede realizarse acoplado el armazón con sustancias detectables incluyendo, pero sin limitación, diversas enzimas, tales como, pero sin limitación, peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa, o acetilcolinesterasa; grupos prostéticos, tales como, pero sin limitación, estreptavidina/biotina y avidina/biotina; materiales fluorescentes, tales como, pero sin limitación, umbeliferona, fluoresceína, isotiocianato de fluoresceína, rodamina, diclorotriazinilamina fluoresceína, cloruro de dansilo o ficoeritrina; materiales luminiscentes, tales como, pero sin limitación, luminol; materiales bioluminiscentes, tales como, pero sin limitación, luciferasa, luciferina y aequorina; materiales radiactivos, tales como, pero sin limitación, yodo (^{131}I , ^{125}I , ^{123}I , ^{121}I), carbono (^{14}C), azufre (^{35}S), tritio (^3H), indio (^{115}In , ^{113}In , ^{112}In , ^{111}In), y tecnecio (^{99}Tc), talio (^{201}Tl), galio (^{68}Ga , ^{67}Ga), paladio (^{103}Pd), molibdeno (^{99}Mo), xenón (^{133}Xe), flúor (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , y ^{117}Tn ; metales emisores de positrones usando diversas tomografías de emisión de positrones, iones metálicos paramagnéticos no radiactivos y moléculas que están radiomarcadas o conjugadas con radioisótopos específicos.

Se describen usos de armazones conjugados con una fracción terapéutica. Un armazón puede conjugarse con una fracción terapéutica tal como una citotoxina, por ejemplo, un agente citostático o citocida, un agente terapéutico o un ión metálico radioactivo, por ejemplo, emisores alfa. Una citotoxina o agente citotóxico incluye cualquier agente que sea perjudicial para células. Las fracciones terapéuticas incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tiogunina, citarabina, 5-fluorouracilo dacarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa, cloramubucilo, melfalan, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicina C y cidisclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramycin (AMC)), moléculas de Auristatina (por ejemplo, auristatina PHE, briostatina 1 y solostatina 10; véase Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 46:3802-8 (2002), Woyke *et al.*, Antimicrob. Agents Chemother. 45: 3580-4 (2001), Mohammad *et al.*, Anticancer Drugs 12: 735-40 (2001), Wall *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun. 266: 76-80 (1999), Mohammad *et al.*, Int. J. Oncol. 15: 367-72 (1999)), hormonas (por ejemplo, glucocorticoides, progestinas, andrógenos y estrógenos), inhibidores de enzimas de reparación de ADN (por ejemplo, etopósido o topotecán), inhibidores de quinasas (por ejemplo, compuesto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian *et al.*, Clin Cancer Res. 8(7): 2167-76 (2002)), agentes citotóxicos (por ejemplo, paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotosterona, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol, y puomicina y análogos u homólogos de los mismos) y los compuestos desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.245.759, 6.399.633, 6.383.790, 6.335.156, 6.271.242, 6.242.196, 6.218.410, 6.218.372, 6.057.300 6.034.053, 5.985.877, 5.958.769, 5.925.376, 5.922.844, 5.911.995, 5.872.223, 5.863.904, 5.840.745, 5.728.868, 5.648.239, 5.587.459), inhibidores de farnesil transferasa (por ejemplo, R115777, BMS-214662 y los desvelados, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.458.935, 6.451.812, 6.440.974, 6.436.960, 6.432.959, 6.420.387, 6.414.145, 6.410.541, 6.410.539, 6.403.581, 6.399.615, 6.387.905, 6.372.747, 6.369.034, 6.362.188, 6.342.765, 6.342.487, 6.300.501, 6.268.363, 6.265.422, 6.248.756, 6.239.140, 6.232.338, 6.228.865, 6.228.856, 6.225.322, 6.218.406, 6.211.193, 6.187.786, 6.169.096, 6.159.984, 6.143.766, 6.133.303, 6.127.366, 6.124.465, 6.124.295, 6.103.723, 6.093.737, 6.090.948, 6.080.870, 6.077.853, 6.071.935, 6.066.738, 6.063.930, 6.054.466, 6.051.582, 6.051.574, y 6.040.305), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina; irinotecan; SN-38; topotecan; 9-aminocamptotecina; GG-211 (GI 147211); DX-8951f; IST-622; rubitecan; pirazoloacridina; XR-5000; saintopina; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN-1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; y rebecamicina); bulgareína; agentes de unión al surco menor de ADN, tales como colorante de Hoescht 33342 y colorante de Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta-lapachona; BC-4-1; bisfosfonatos (por ejemplo, alendronato, cimadronato, clodronato, tiludronato, etidronato, ibandronato, neridronato, olpandronato, risedronato, piridronato, pamidronato, zolendronato), inhibidores de HMG-CoA (por ejemplo, lovastatina, simvastatina, atorvastatina, pravastatina, fluvastatina, estatina, cerivastatina, lescol, lupitor, rosuvastatina y atorvastatina) y sales, solvatos, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Véase, por ejemplo, Rothenberg, M. L., Annals of Oncology 8: 837-855(1997); y Moreau, P., *et al.*, J. Med. Chem. 41: 1631-1640(1998)), oligonucleótidos

antisentido (por ejemplo, los desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.277.832, 5.998.596, 5.885.834, 5.734.033 y 5.618.709), inmunomoduladores (por ejemplo, anticuerpos y citocinas), anticuerpos e inhibidores de adenosina desaminasa (por ejemplo, fosfato de fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina). Los ejemplos incluyen paclitaxel, citocalasina B, gramicidina D, bromuro de etidio, emetina, mitomicina, etopósido, tenopósido, vincristina, vinblastina, colchicina, doxorubicina, daunorubicina, dihidroxi antracina diona, mitoxantrona, mitramicina, actinomicina D, 1-deshidrotestosterona, glucocorticoides, procaína, tetracaína, lidocaína, propranolol y puomicina y análogos u homólogos de los mismos. Los productos terapéuticos incluyen, pero sin limitación, antimetabolitos (por ejemplo, metotrexato, 6-mercaptopurina, 6-tioguanina, citarabina, 5-fluorouracil decarbazina), agentes alquilantes (por ejemplo, mecloretamina, tioepa clorambucilo, melfalan, carmustina (BCNU) y lomustina (CCNU), ciclotosfamida, busulfan, dibromomanitol, estreptozotocina, mitomicin C y cisdiclorodiamina de platino (II) (DDP) cisplatino), antraciclinas (por ejemplo, daunorubicina (anteriormente daunomicina) y doxorubicina), antibióticos (por ejemplo, dactinomicina (anteriormente actinomicina), bleomicina, mitramicina y antramicina (AMC)), moléculas de Auristatina (por ejemplo, auristatina PHE, briostatina 1, solastatina 10, véase Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 46: 3802-8 (2002), Woyke *et al.*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 45: 3580-4 (2001), Mohammad *et al.*, *Anticancer Drugs* 12: 735-40 (2001), Wall *et al.*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 266: 76-80 (1999), Mohammad *et al.*, *Int. J. Oncol.* 15: 367-72 (1999)), agentes antimetabólicos (por ejemplo, vincristina y vinblastina), hormonas (por ejemplo, glucocorticoides, progestatinas, andrógenos y estrógenos), inhibidores de enzima de reparación de ADN (por ejemplo, etopósido o topotecán), inhibidores de quinasa (por ejemplo, compuesto ST1571, mesilato de imatinib (Kantarjian *et al.*, *Clin Cancer Res.* 8(7): 2167-76 (2002)), y los compuestos desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.245.759, 6.399.633, 6.383.790, 6.335.156, 6.271.242, 6.242.196, 6.218.410, 6.218.372, 6.057.300, 6.034.053, 5.985.877, 5.958.769, 5.925.376, 5.922.844, 5.911.995, 5.872.223, 5.863.904, 5.840.745, 5.728.868, 5.648.239, 5.587.459), inhibidores de farnesil transferasa (por ejemplo, R115777, BMS-214662, y los desvelados, por ejemplo, en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.458.935, 6.451.812, 6.440.974, 6.436.960, 6.432.959, 6.420.387, 6.414.145, 6.410.541, 6.410.539, 6.403.581, 6.399.615, 6.387.905, 6.372.747, 6.369.034, 6.362.188, 6.342.765, 6.342.487, 6.300.501, 6.268.363, 6.265.422, 6.248.756, 6.239.140, 6.232.338, 6.228.865, 6.228.856, 6.225.322, 6.218.406, 6.211.193, 6.187.786, 6.169.096, 6.159.984, 6.143.766, 6.133.303, 6.127.366, 6.124.465, 6.124.295, 6.103.723, 6.093.737, 6.090.948, 6.080.870, 6.077.853, 6.071.935, 6.066.738, 6.063.930, 6.054.466, 6.051.582, 6.051.574, y 6.040.305), inhibidores de topoisomerasa (por ejemplo, camptotecina; irinotecan; SN-38; topotecan; 9-aminocamptotecina; GG-211 (GI 147211); DX-8951f; IST-622; rubitecan; pirazoloacridina; XR-5000; saintopina; UCE6; UCE1022; TAN-1518A; TAN-1518B; KT6006; KT6528; ED-110; NB-506; ED-110; NB-506; y rebecamicina; bulgareína; agentes de unión al surco menor de ADN tales como colorante de Hoescht 33342 y colorante de Hoechst 33258; nitidina; fagaronina; epiberberina; coralina; beta-lapachona; BC-4-1; y sales, solvatos, clatratos y profármacos farmacéuticamente aceptables de los mismos. Véase, por ejemplo, Rothenberg, M. L. *Annals of Oncology* 8: 837-855(1997); y Moreau, P., *et al.*, *J. Med. Chem.* 41: 1631-1640(1998)), oligonucleótidos antisentido (por ejemplo, los desvelados en las Patentes de Estados Unidos Nos 6.277.832, 5.998.596, 5.885.834, 5.734.033, y 5.618.709), inmunomoduladores (por ejemplo, anticuerpos y citocinas), anticuerpos (por ejemplo, rituximab (Rituxan®), calicamicina (Mylotarg®, ibritumomab tiuxetan (Zevalin®), y tositumomab (Bexxar®)), e inhibidores de adenosina desaminasa (por ejemplo, fosfato de Fludarabina y 2-clorodesoxiadenosina).

Además, un armazón puede conjugarse con un resto terapéutico o resto farmacológico que modifica una respuesta biológica dada. Los restos terapéuticos o restos farmacológicos no deben interpretarse como limitados a agentes terapéuticos químicos clásicos. Por ejemplo, el resto farmacológico puede ser una proteína o polipéptido que posea una actividad biológica deseada. Dichas proteínas pueden incluir, por ejemplo, una toxina tal como abrina, ricina A, exotoxina de *Pseudomonas*, toxina del cólera o toxina diftérica; una proteína tal como factor de necrosis tumoral, interferón α , interferón β , factor de crecimiento nervioso, factor de crecimiento derivado de plaquetas, activador del plasminógeno tisular, un agente apoptótico, por ejemplo, TNF- α , TNF- β , AIM I (véase, Publicación Internacional N° WO 97/33899), AIM II (véase, Publicación Internacional N° WO 97/34911), ligando de Fas (Takahashi *et al.*, 1994, *J. Immunol.*, 6:1567-1574) y VEGF (véase, Publicación Internacional N° WO 99/23105), un agente trombótico o un agente anti-angiogénico, por ejemplo, angiostatina, endostatina o un componente de la ruta de coagulación (por ejemplo, factor tisular); o un modificador de una respuesta biológica tal como, por ejemplo, una lincocina (por ejemplo, interleucina-1 ("IL-1"), interleucina-2 ("IL-2"), interleucina-6 ("IL-6")), factor estimulante de colonias de macrófagos y granulocitos ("GM-CSF"), y factor estimulante de colonias de granulocitos ("G-CSF"), un factor de crecimiento (por ejemplo, hormona del crecimiento ("GH")), o un agente de coagulación (por ejemplo, calcio, vitamina K, factores tisulares, tales como, pero sin limitación, factor de Hageman (factor XII), quinínogeno de alto peso molecular (HMWK), precalicreína (PK), factores de proteínas de coagulación II (protrombina), factor V, XIIa, VIII, XIIIa, XI, XIa, IX, IXa, X, fosfolípido, fibrinopéptidos A y B de las cadenas α y β de fibrinógeno, monómero de fibrina).

Además, puede conjugarse un armazón con restos terapéuticos tales como ion metálico radiactivo, tales como emisores alfa tales como ^{213}Bi o quelantes macrocíclicos útiles para conjugar iones radiometálicos, incluyendo pero sin limitación, ^{131}In , ^{131}Lu , ^{131}Y , ^{131}Ho , ^{131}Sm , con polipéptidos. En ciertas realizaciones, el quelante macrocíclico es ácido 1,4,7,10-tetraazaciclododecano-N,N',N",N"-tetraacético (DOTA) que puede unirse con el armazón mediante una molécula enlazadora. Dichas moléculas enlazadoras se conocen habitualmente en la técnica y se describen en Denardo *et al.*, 1998, *Clin Cancer Res.* 4(10):2483-90; Peterson *et al.*, 1999, *Bioconjug. Chem.* 10(4):553-7; y Zimmerman *et al.*, 1999, *Nucl. Med. Biol.* 26(8):943-50.

Se conocen bien técnicas para conjugar restos terapéuticos con anticuerpos, véase, por ejemplo, Arnon *et al.*, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld *et al.* (eds.), pp. 243-56. (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom *et al.*, "Antibodies For Drug Delivery", en *Controlled Drug Delivery (2ª Ed.)*, Robinson *et al.* (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", en *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera *et al.* (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", en *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin *et al.* (eds.), pp. 303-16 (Academic Press 1985), y Thorpe *et al.*, 1982, *Immunol. Rev.* 62:119-58. Pueden adaptarse enfoques similares para su uso con armazones descritos en el presente documento.

El resto terapéutico o fármaco conjugado con un armazón debería elegirse para conseguir el efecto o los efectos profilácticos o terapéuticos deseados para un trastorno particular en un sujeto. Un especialista clínico u otro personal médico debería considerar lo siguiente cuando decida acerca de qué resto terapéutico o fármaco conjugar con un armazón: la naturaleza de la enfermedad, la gravedad de la enfermedad y la afección del sujeto.

Los armazones también pueden unirse con soportes sólidos, que son particularmente útiles para inmunoensayos o purificación del antígeno diana. Dichos soportes sólidos incluyen, pero sin limitación, vidrio, celulosa, poliácridamida, nylon, poliestireno, cloruro de polivinilo o polipropileno.

5.9 Producción

La expresión recombinante de un armazón requiere construcción de un vector de expresión que contiene un polinucleótido que codifica el armazón. Una vez que se ha obtenido un polinucleótido que codifica un armazón, el vector para la producción del armazón puede producirse por tecnología de ADN recombinante usando técnicas bien conocidas en este campo. Por lo tanto, se describen en el presente documento métodos para preparar una proteína expresando un polinucleótido que contiene una secuencia de nucleótidos que codifica un armazón. Pueden usarse métodos que se conocen bien por los expertos en la materia para construir vectores de expresión que contienen secuencias codificantes de armazón y señales de control de la transcripción y de la traducción apropiadas. Estos métodos incluyen, por ejemplo, técnicas de ADN recombinante *in vitro*, técnicas sintéticas y recombinación genética *in vivo*. Se describen vectores replicables que comprenden una secuencia de nucleótidos que codifica un armazón, unido operativamente con un promotor.

El vector de expresión se transfiere a una célula hospedadora por técnicas convencionales y las células transfectadas se cultivan después por técnicas convencionales para producir un armazón. Por lo tanto, se describen células hospedadoras que contienen un polinucleótido que codifica un armazón, unido operativamente con un promotor heterólogo. Las células hospedadoras adecuadas incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*).

Puede utilizarse una diversidad de sistemas de vector de expresión-hospedador para expresar los armazones. Dichos sistemas de expresión-hospedador representan vehículos por los que las secuencias codificantes de interés pueden producirse y posteriormente purificarse, pero también representan células que pueden, cuando se transforman o transfectan con las secuencias codificantes de nucleótidos apropiadas, expresar un armazón *in situ*. Estos incluyen, pero sin limitación, microorganismos tales como bacterias (por ejemplo, *E. coli* y *B. subtilis*) transformadas con ADN de bacteriófago recombinante, ADN plasmídico o vectores de expresión de ADN cósmico que contienen secuencias codificantes de armazón; levadura (por ejemplo, *Saccharomyces*, *Pichia*) transformada con vectores de expresión de levadura recombinantes que contienen secuencias codificantes de armazones; sistemas de células de insecto infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, baculovirus) que contienen secuencias codificantes de armazón; sistemas de células vegetales infectados con vectores de expresión de virus recombinantes (por ejemplo, virus del mosaico de la coliflor, CaMV; virus del mosaico del tabaco, TMV) o transformados con vectores de expresión de plásmidos recombinantes (por ejemplo, plásmido Ti) que contienen secuencias codificantes de armazón; o sistemas de células de mamíferos (por ejemplo, células COS, CHO, BHK, 293, NS0 y 3T3) que albergan construcciones de expresión recombinantes que contienen promotores derivados del genoma de células de mamífero (por ejemplo, promotor de metalotioneína) o de virus de mamífero (por ejemplo, el promotor tardío de adenovirus; el promotor de 7,5 K de virus vaccinia).

Pueden identificarse vectores de expresión que contienen insertos de un gen que codifica un armazón por tres enfoques generales: (a) hibridación de ácido nucleico, (b) presencia o ausencia de funciones génicas "marcadoras" y (c) expresión de secuencias insertadas. En el primer enfoque, la presencia de un gen que codifica un péptido, polipéptido, proteína o una proteína de fusión en un vector de expresión puede detectarse por hibridación de ácido nucleico usando sondas que comprenden secuencias que son homólogas de un gen insertado que codifica el péptido, polipéptido, proteína o la proteína de fusión, respectivamente. En el segundo enfoque, el sistema del hospedador/vector recombinante puede identificarse y seleccionarse basándose en la presencia o ausencia de ciertas funciones génicas "marcadoras" (por ejemplo, actividad timidina quinasa, resistencia a antibióticos, fenotipo de transformación, formación de cuerpos de inclusión en baculovirus, etc.) provocado por la inserción de una secuencia de nucleótidos que codifica un anticuerpo o proteína de fusión en el vector. Por ejemplo, si la secuencia de nucleótidos que codifica el armazón se inserta dentro de la secuencia génica marcadora del vector, pueden

identificarse recombinantes que contienen el gen que codifica el inserto de armazón por la ausencia de la función génica marcadora. En el tercer enfoque, pueden identificarse vectores de expresión recombinante ensayando el producto génico (por ejemplo, armazón o multímero del mismo) expresado por el recombinante. Dichos ensayos pueden basarse, por ejemplo, en las propiedades físicas o funcionales de la proteína en sistemas de ensayo *in vitro*, por ejemplo, propiedades de unión, agonistas o antagonistas del armazón.

En algunas realizaciones los armazones pueden sintetizarse químicamente al menos parcialmente. En otras realizaciones, los armazones pueden producirse de forma semi-sintética.

5.10 Purificación de armazones

Una vez que se ha producido un armazón por expresión recombinante, puede purificarse por cualquier método conocido en la técnica para purificación de una proteína, por ejemplo, por cromatografía (por ejemplo, cromatografía de quelato metálico, intercambio iónico, afinidad y cromatografía en columna de separación por tamaños), centrifugación, solubilidad diferencial o por cualquier otra técnica convencional para la purificación de proteínas.

La naturaleza altamente estable de los armazones permite variaciones en esquemas de purificación. Por ejemplo, la estabilidad térmica mostrada por los armazones permite el calentamiento del lisado en bruto que comprende los armazones para retirar el grueso de las proteínas de células hospedadoras por desnaturalización. En otra realización, la alta resistencia a proteasa mostrada por los armazones permite la degradación rápida de proteínas de células hospedadoras en lisados en bruto antes de cualquier etapa de purificación. Además, la tolerancia a pH mostrada por los armazones permite la precipitación selectiva de proteínas de células hospedadoras en el lisado en bruto reduciendo o aumentando el pH antes de cualquier etapa de purificación. En algunas realizaciones, la purificación de los armazones se facilita por un alto desplazamiento de temperatura, un tratamiento de proteasa, un desplazamiento del pH hacia arriba o hacia abajo, o una combinación de cualquiera de los anteriores en un intento de retirar proteínas de células hospedadoras a granel del lisado en bruto. En algunas realizaciones, la proteína restante después de la desnaturalización por calor, tratamiento con proteasa, del desplazamiento de pH es de al menos 50 %, al menos 55 %, al menos 60 %, al menos 65 %, al menos 70 %, al menos 75 %, al menos 80 %, al menos 85 %, al menos 90 % o al menos 95 % de proteína de armazón específica.

En algunas realizaciones, los métodos de purificación de los armazones comprenden reducir el pH del lisado en bruto que contiene dicho armazón a aproximadamente 6,5, a aproximadamente 6,0, a aproximadamente 5,5, a aproximadamente 5,0, a aproximadamente 4,5, a aproximadamente 4,0, a aproximadamente 3,5, a aproximadamente 3,0, a aproximadamente 2,5 o a aproximadamente 2,0 en un intento de precipitar la proteína de la célula hospedadora. En otras realizaciones, los métodos de purificación comprenden elevar el pH del lisado en bruto que contiene dicho armazón a aproximadamente 8,0, a aproximadamente 8,5, a aproximadamente 9,0, a aproximadamente 9,5, a aproximadamente 10,0, a aproximadamente 10,5, a aproximadamente 11,0, a aproximadamente 11,5, a aproximadamente 12,0, o a aproximadamente 12,5 en un intento de precipitar la proteína de célula hospedadora.

5.11 Producción redimensionable de armazones

En un intento de obtener grandes cantidades, pueden producirse armazones por un proceso redimensionable. En algunas realizaciones, pueden producirse armazones por un proceso redimensionable en el laboratorio de investigación que puede aumentarse de escala para producir los armazones en biorreactores de escala analítica (por ejemplo, pero sin limitación, biorreactores de 5 l, 10 l, 15 l, 30 l o 50 l). En otras realizaciones, los armazones pueden producirse por un proceso redimensionable en el laboratorio de investigación que puede aumentarse de escala para producir los armazones en biorreactores de escala de producción (por ejemplo, pero sin limitación 75 l, 100 l, 150 l, 300 l o 500 l). En algunas realizaciones, el proceso redimensionable da como resultado poca o ninguna reducción en la eficacia de producción en comparación con el proceso de producción realizado en el laboratorio de investigación.

En algunas realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones a una eficacia de producción de aproximadamente 1 g/l, aproximadamente 2 g/l, aproximadamente 3 g/l, aproximadamente 5 g/l, aproximadamente 7,5 g/l, aproximadamente 10 g/l, aproximadamente 12,5 g/l, aproximadamente 15,0 g/l, aproximadamente 17,5 g/l, aproximadamente 20 g/l, aproximadamente 25 g/l, aproximadamente 30 g/l o mayor.

En otras realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones a una eficacia de producción de al menos aproximadamente 1 g/l, al menos aproximadamente 2 g/l, al menos aproximadamente 3 g/l, al menos aproximadamente 5 g/l al menos aproximadamente 7,5 g/l, al menos aproximadamente 10 g/l, al menos aproximadamente 12,5 g/l al menos aproximadamente 15 g/l, al menos aproximadamente 17,5 g/l, al menos aproximadamente 20 g/l, al menos aproximadamente 25 g/l, al menos aproximadamente 30 g/l o más.

En otras realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones a una eficacia de producción de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 250 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 200 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 175 g/l, de

5 aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 150 g/l, de aproximadamente 10 g/l a aproximadamente 100 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 250 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 200 g/l, de 20 g/l a aproximadamente 175 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 150 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 125 g/l, de aproximadamente 20 g/l a aproximadamente 100 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 250 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 200 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 175 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 150 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 125 g/l, de aproximadamente 30 g/l a aproximadamente 100 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 300 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 250 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 200 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 175 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 150 g/l, de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 125 g/l, o de aproximadamente 50 g/l a aproximadamente 100 g/l.

15 En algunas realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones multiméricos a una eficacia de producción de aproximadamente 10 mg/l, aproximadamente 20 mg/L, aproximadamente 30 mg/l, aproximadamente 50 mg/l, aproximadamente 75 mg/l, aproximadamente 100 mg/l, aproximadamente 125 mg/l, aproximadamente 150 mg/l, aproximadamente 175 mg/l, aproximadamente 200 mg/l, aproximadamente 250 mg/l, aproximadamente 300 mg/l o más.

20 En otras realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones multiméricos a una eficacia de producción de al menos aproximadamente 10 mg/l, al menos aproximadamente 20 mg/L, al menos aproximadamente 30 mg/l, al menos aproximadamente 50 mg/l, al menos aproximadamente 75 mg/l, al menos aproximadamente 100 mg/l, al menos aproximadamente 125 mg/l, al menos aproximadamente 150 mg/l, al menos aproximadamente 175 mg/l, al menos aproximadamente 200 mg/l, al menos aproximadamente 250 mg/l, al menos aproximadamente 300 mg/l o más.

30 En otras realizaciones, el proceso redimensionable produce armazones multiméricos a una eficacia de producción de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 200 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 10 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 200 mg/l, de 20 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 125 mg/l, de aproximadamente 20 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 200 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 125 mg/l, de aproximadamente 30 mg/l a aproximadamente 100 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 300 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 250 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 200 mg/l, de 50 mg/l a aproximadamente 175 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 150 mg/l, de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 125 mg/l o de aproximadamente 50 mg/l a aproximadamente 100 mg/l.

5.12 Producción de armazones secretados

45 También se describen métodos para la producción de armazones intracelularmente o como una forma secretada. En algunas realizaciones, el almacén secretado se produce a niveles descritos en el presente documento. En otras realizaciones, los armazones secretados se pliegan apropiadamente y son completamente funcionales. En otras realizaciones, la producción de armazones secretados comprende el uso de un promotor Ptac. En otras realizaciones, la producción de armazones secretados comprende el uso de una señal oppA. En otras realizaciones más, el almacén secretado se expresa en una célula hospedadora procariota. En realizaciones adicionales, el almacén se secreta al espacio periplásmico de una célula hospedadora procariota. En otras realizaciones más, el almacén se secreta directamente al medio. En más realizaciones adicionales, los armazones pueden explorarse a partir de medios de cultivo celular en bruto o extractos periplásmicos.

55 También se describen métodos para la secreción de proteínas en tándem o fusiones usando armazones proteicos. En algunas realizaciones, los armazones pueden actuar como moléculas vehículo para la secreción de péptidos y/o proteínas al medio de cultivo celular o espacio periplásmico de una célula procariota.

60 En otra realización, los métodos para purificar armazones comprenden calentar el lisado en bruto que comprende dicho almacén a 70 °C durante 15 minutos y posteriormente retirar los compuestos agregados por centrifugación. En otras realizaciones, los métodos para purificar armazones comprenden calentar el lisado en bruto que comprende dicho almacén hasta aproximadamente 50 °C, aproximadamente 55 °C, aproximadamente 60 °C, aproximadamente 65 °C, aproximadamente 70 °C, aproximadamente 75 °C, aproximadamente 80 °C, aproximadamente 85 °C o aproximadamente 90 °C y posteriormente retirar los compuestos agregados por centrifugación. En otras realizaciones, los métodos para purificar armazones comprenden calentar el lisado en bruto durante al menos

aproximadamente 1 minuto, aproximadamente 2 minutos, aproximadamente 3 minutos, aproximadamente 4 minutos, aproximadamente 5 minutos, aproximadamente 6 minutos, aproximadamente 7 minutos, aproximadamente 8 minutos, aproximadamente 9 minutos, aproximadamente 10 minutos, aproximadamente 11 minutos, aproximadamente 12 minutos, aproximadamente 13 minutos, aproximadamente 14 minutos, aproximadamente 15 minutos, aproximadamente 20 minutos o aproximadamente 30 minutos y posteriormente retirar compuestos agregados por centrifugación.

En otra realización específica, los métodos para purificar armazones comprenden desplazar el pH del lisado en bruto a 3,0 y calentar el lisado en bruto para comprender dicho armazón 70 °C durante 15 minutos y posteriormente retirar los compuestos agregados por centrifugación.

5.13 Ensayos de los armazones

Los armazones pueden ensayarse con respecto unión específica con una diana por cualquier método conocido en la técnica. Los ensayos representativos que pueden usarse incluyen, pero sin limitación, sistemas de ensayo competitivos y no competitivos usando técnicas tales como transferencias de western, radioinmunoensayos, ELISA (ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas), inmunoensayos de tipo "sándwich", ensayos de inmunoprecipitación, reacciones de precipitación, reacciones de precipitación de difusión en gel, ensayos de inmunodifusión, ensayos de aglutinación, ensayos de fijación del complemento, ensayos inmunoradiométricos, inmunoensayos fluorescentes, por nombrar solamente algunos. Dichos ensayos son rutinarios y se conocen en la técnica (véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York).

Los ELISA comprenden preparar al antígeno (por ejemplo, un armazón), recubrir el pocillo de una placa de microtitulación de 96 pocillos con el antígeno, añadir la proteína de unión a epítipo de interés (por ejemplo un anticuerpo específico de armazón) conjugada con un compuesto detectable tal como un sustrato enzimático (por ejemplo, peroxidasa de rábano rusticano o fosfatasa alcalina) al pocillo e incubar durante un periodo de tiempo, y detectar la presencia del antígeno. En ELISA la proteína de unión a epítipo de interés no tiene que estar conjugada con un compuesto detectable; en su lugar, puede añadirse al pocillo un segundo anticuerpo (que reconoce la proteína de interés) conjugado con un compuesto detectable. Además, en lugar de recubrir el pocillo con el antígeno, la proteína de interés puede recubrir el pocillo. En este caso, puede añadirse un segundo anticuerpo conjugado con un compuesto detectable después de la adición del antígeno de interés al pocillo recubierto. Un experto en la materia conocerá los parámetros que parámetros pueden modificarse para aumentar la señal detectada así como otras variaciones de ELISA conocidas en la técnica. Para análisis adicional con respecto a ELISA véase, por ejemplo, Ausubel *et al*, eds, 1994, Current Protocols in Molecular Biology, Vol. 1, John Wiley & Sons, Inc., Nueva York en 11.2.1.

La afinidad de unión y otras propiedades de unión de un armazón con un antígeno puede determinarse por una diversidad de métodos de ensayo *in vitro* conocidos en la materia incluyendo, por ejemplo, métodos de equilibrio (por ejemplo, ensayo inmunoabsorbente ligado a enzimas (ELISA; o radioinmunoensayo (RIA)), o cinética (por ejemplo, análisis de BIAcore®), y otros métodos tales como ensayos de unión indirecta, ensayos de unión competitiva, transferencia de energía por resonancia de fluorescencia (TERF), electroforesis en gel y cromatografía (por ejemplo, filtración en gel). Estos y otros métodos pueden utilizar un marcador en uno o más de los componentes que se examinan y/o emplear una diversidad de métodos de detección incluyendo pero sin limitación marcadores cromogénicos, fluorescentes, luminiscentes o isotópicos. Puede encontrarse una descripción detallada de afinidades y cinética de unión en Paul, W.E., ed., Fundamental Immunology, 4ª Ed., Lippincott-Raven, Filadelfia (1999).

La estabilidad de los armazones puede aumentarse por muchos enfoques diferentes. En una realización, los armazones comprenden un enlace disulfuro de origen no natural, como se describe en el presente documento. En otra realización, los armazones comprenden una elongación de las regiones N y/o C terminales. En otra realización, los armazones comprenden una adición, delección o sustitución de al menos un resto de aminoácido para ajustar la carga superficial del armazón. En otra realización, los armazones comprenden una alteración para aumentar la semivida en suero, como se describe en el presente documento. En otra realización más, los armazones comprenden una adición, delección o sustitución de al menos un resto de aminoácido para estabilizar el núcleo hidrófobo del armazón.

La estabilidad de los armazones puede evaluarse por muchas técnicas diferentes. Una selección de técnicas conocidas en este campo incluye temperatura de fusión, calorimetría de exploración diferencial (CED), dicroísmo circular (DC), electroforesis en gel de poliacrilamida (PAGE), resistencia a proteasa, calorimetría isotérmica (CIT), resonancia magnética nuclear (RMN), fluorescencia interna y actividad biológica. En una realización, los armazones obtenidos por ingeniería genética muestran estabilidad aumentada en comparación con el mismo armazón antes de su modificación técnica.

5.14 Composiciones farmacéuticas

En otro aspecto, se describe una composición, por ejemplo, pero sin limitación, una composición farmacéutica, que contiene uno o una combinación de armazones o proteínas de unión a diana descritos en el presente documento,

formulados junto con un vehículo farmacéuticamente aceptable. Dichas composiciones pueden incluir uno o una combinación de, por ejemplo, pero sin limitación dos o más armazones diferentes. Por ejemplo, una composición farmacéutica puede comprender una combinación de armazones que se unen a diferentes epítomos en el antígeno diana o que tienen actividades complementarias.

También pueden administrarse composiciones farmacéuticas en terapia de combinación, tal como combinadas con otros agentes. Por ejemplo, la terapia de combinación puede incluir un armazón descrito en el presente documento combinado con al menos otra terapia en el que la terapia puede ser inmunoterapia, quimioterapia, tratamiento con radiación o terapia farmacológica.

Los compuestos farmacéuticos pueden incluir una o más sales farmacéuticamente aceptables. Los ejemplos de dichas sales incluyen sales de adición de ácidos y sales de adición de bases. Las sales de adición de ácidos incluyen las derivadas de ácidos inorgánicos no tóxicos, tales como clorhídrico, nítrico, fosfórico, sulfúrico, bromhídrico, yodhídrico, fosforoso y similares, así como de ácidos orgánicos no tóxicos tales como ácidos mono- y dicarboxílicos alifáticos, ácidos alcanóicos fenil sustituidos, ácidos hidroxí alcanóicos, ácidos aromáticos, ácidos sulfónicos alifáticos y aromáticos y similares. Las sales de adición de bases incluyen las derivadas de metales alcalinotérreos, tales como sodio, potasio, magnesio, calcio y similares, así como de aminas orgánicas no tóxicas, tales como N,N'-dibenciletilendiamina, N-metilglucamina, cloroprocaína, colina, dietanolamina, etilendiamina, procaína y similares.

Una composición farmacéutica también puede incluir un antioxidante farmacéuticamente aceptable. Los ejemplos de antioxidantes farmacéuticamente aceptables incluyen: (1) antioxidantes solubles en agua, tales como ácido ascórbico, clorhidrato de cisteína, bisulfato sódico, metabisulfito sódico, sulfito sódico y similares; (2) antioxidantes solubles en aceite, tales como ascorbil palmitato, hidroxianisol butilado (BHA), hidroxitolueno butilado (BHT), lecitina, propilo galato, alfa-tocoferol y similares; y (3) agentes quelantes metálicos, tales como ácido cítrico, ácido etilendiamintetraacético (EDTA), sorbitol, ácido tartárico, ácido fosfórico y similares.

Los ejemplos de vehículos acuosos y no acuosos adecuados que pueden emplearse en las composiciones farmacéuticas incluyen agua, etanol, polioles (tales como glicerol, propilenglicol, polietilenglicol y similares) y mezclas adecuadas de los mismos, aceites vegetales, tales como aceite de oliva y ésteres orgánicos inyectables, tales como etilo oleato. Puede mantenerse la fluidez apropiada, por ejemplo, mediante el uso de materiales de recubrimiento, tales como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersiones, y mediante el uso de tensioactivos.

Estas composiciones también pueden contener adyuvantes tales como conservantes, agentes humectantes, agentes emulsionantes y agentes de dispersión. La prevención de la presencia de microorganismos puede asegurarse tanto por procedimientos de esterilización como por la inclusión de diversos agentes antibacterianos y antifúngicos, por ejemplo, parabeno, clorobutanol, ácido fenol sódico, y similares. También puede ser deseable incluir agentes isotónicos, tales como azúcares, cloruro sódico, y similares en las composiciones. Además, puede proporcionarse absorción prolongada de la forma farmacéutica inyectable por la inclusión de agentes que retardan la absorción tales como monoestearato de aluminio y gelatina.

Las composiciones farmacéuticas típicamente deben ser estériles y estables en las condiciones de fabricación y almacenamiento. La composición puede formularse como una solución, microemulsión, liposoma, u otra estructura ordenada adecuada para alta concentración farmacológica. El vehículo puede ser un disolvente o medio de dispersión que contiene, por ejemplo, agua, etanol, polioliol (por ejemplo, glicerol, propilenglicol y polietilenglicol líquido, y similares), y mezclas adecuadas de los mismos. La fluidez apropiada puede mantenerse, por ejemplo, mediante el uso de un recubrimiento tal como lecitina, mediante el mantenimiento del tamaño de partícula requerido en el caso de dispersión y mediante el uso de tensioactivos. En muchos casos, será adecuado incluir agentes isotónicos, por ejemplo, azúcares, polialcoholes tales como manitol, sorbitol, o cloruro sódico en la composición. La absorción prolongada de las composiciones inyectables puede proporcionarse incluyendo en la composición un agente que retarde la absorción, por ejemplo, sales de monoestearato y gelatina.

Pueden prepararse soluciones inyectables estériles incorporando el compuesto activo en la cantidad requerida en un disolvente apropiado con uno o una combinación de ingredientes enumerados anteriormente, según se requiera, seguido de esterilización por microfiltración. En general, se preparan dispersiones incorporando el compuesto activo en un vehículo estéril que contiene un medio de dispersión básico y los otros ingredientes requeridos de los enumerados anteriormente. En el caso de polvos estériles para la preparación de soluciones inyectables estériles, los métodos preferidos de preparación son secado al vacío y criodesecación (liofilización) que produce un polvo del principio activo más cualquier ingrediente deseado adicional de una solución previamente esterilizada por filtración del mismo.

En una realización las composiciones (por ejemplo, formulaciones líquidas) son formulaciones sin pirógenos que están sustancialmente sin endotoxinas y/o sustancias pirogénicas relacionadas. Las endotoxinas incluyen toxinas que están confinadas dentro de un microorganismo y se liberan cuando los microorganismos se rompen o mueren. Las sustancias pirogénicas también incluyen sustancias termoestables, inductoras de fiebre (glucoproteínas) de la

membrana externa de bacterias y otros microorganismos. Ambas de estas sustancias pueden provocar fiebre, hipotensión y choque si se administran a seres humanos. Debido a los efectos perjudiciales potenciales, es ventajoso retirar incluso cantidades pequeñas de endotoxinas de soluciones farmacológicas farmacéuticas administradas por vía intravenosa. La Administración de Fármacos y Alimentos ("FDA") ha establecido un límite superior de 5 unidades de endotoxina (UE) por dosis por kilogramo de peso corporal en un único periodo de una hora para aplicaciones farmacológicas intravenosas (The United States Pharmacopeial Convention, Pharmacopeial Forum 26 (1):223 (2000)). Cuando se administran proteínas terapéuticas en cantidades de varios cientos o miles de miligramos por kilogramo de peso corporal es ventajoso retirar incluso cantidades traza de la endotoxina. En una realización, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son menores de 10 UE/mg, menores de 5 UE/mg, menores de 1 UE/mg, menores de 0,1 UE/mg, menores de 0,01 UE/mg o menores de 0,001 UE/mg. En otra realización, los niveles de endotoxinas y pirógenos en la composición son menores de aproximadamente 10 UE/mg, menores de aproximadamente 5 UE/mg, menores de aproximadamente 1 UE/mg, menores de aproximadamente 0,1 UE/mg, menores de aproximadamente 0,01 UE/mg o menores de aproximadamente 0,001 UE/mg.

15 5.15 Dosificación/Administración

Para preparar composiciones farmacéuticas o estériles incluyendo un armazón, el armazón se mezcla con un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable. Pueden prepararse formulaciones de agentes terapéuticos y de diagnóstico mezclando con vehículos, excipientes o estabilizadores fisiológicamente aceptables en forma de, por ejemplo, polvos liofilizados, pastas, soluciones acuosas, lociones o suspensiones (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, y Wilkins, Nueva York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner y Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., Nueva York, N.Y.).

La selección de un régimen de administración para un producto terapéutico depende de varios factores, incluyendo la tasa de renovación en suero o tisular de la entidad, el nivel de los síntomas, la inmunogenicidad de la entidad, y la accesibilidad de las células diana en la matriz biológica. En ciertas realizaciones, un régimen de administración maximiza la cantidad de producto terapéutico suministrado al paciente coherente con un nivel aceptable de efectos secundarios. En consecuencia, la cantidad de producto biológico suministrado depende en parte de la entidad particular y la gravedad de la afección que se trate. Está disponible orientación para seleccionar las dosis apropiadas de anticuerpos, citocinas y molécula pequeñas (véase, por ejemplo, Wawrzynczak (1996) Antibody Therapy, Bios Scientific Pub. Ltd, Oxfordshire, Reino Unido; Kresina (ed.) (1991) Monoclonal Antibodies, Cytokines and Arthritis, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Bach (ed.) (1993) Monoclonal Antibodies and Peptide Therapy in Autoimmune Diseases, Marcel Dekker, Nueva York, N.Y.; Baert, *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348: 601-608; Milgrom, *et al.* (1999) New Engl. J. Med. 341: 1966-1973; Slamon, *et al.* (2001) New Engl. J. Med. 344: 783-792; Beniaminovitz, *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 342: 613-619; Ghosh, *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 348: 24-32; Lipsky, *et al.* (2000) New Engl. J. Med. 343: 1594-1602).

La determinación de la dosis apropiada se realiza por el especialista clínico, por ejemplo, usando parámetros o factores que se sabe o se sospecha en la técnica que afectan al tratamiento o se predice que afectan al tratamiento. En general, la dosis comienza con una cantidad algo menor que la dosis óptima y se aumenta en incrementos pequeños en lo sucesivo hasta que se consigue el efecto deseado u óptimo en relación con cualquier efecto secundario negativo. Las medidas de diagnóstico importantes incluyen las de síntomas de, por ejemplo, la inflamación o nivel de citocinas inflamatorias producidas.

Los niveles de dosificación reales de los principios activos en las composiciones farmacéuticas pueden variarse para obtener una cantidad del principio activo que es eficaz para conseguir la respuesta terapéutica deseada para un paciente, composición y modo de administración particular, sin ser tóxico para el paciente. El nivel de dosificación seleccionado dependerá de una diversidad de factores farmacocinéticos incluyendo la actividad de las composiciones particulares empleadas, o el éster, la sal o la amida de las mismas, la vía de administración, el momento de administración, la tasa de excreción del compuesto particular que se emplee, la duración del tratamiento, otros fármacos, compuestos y/o materiales usados en combinación con las composiciones particulares empleadas, la edad, el sexo, el peso, la condición, la salud general y el historial médico anterior del paciente que se trate, y factores similares bien conocidos en la técnica médica.

Pueden proporcionarse armazones por infusión continua, o por dosis a intervalos de, por ejemplo, un día, una semana, o 1-7 veces por semana. Las dosis pueden proporcionarse por vía intravenosa, por vía subcutánea, por vía tópica, por vía oral, por vía nasal, por vía rectal, por vía intramuscular, por vía intracerebral o por inhalación. Un protocolo de dosis específico es uno que implica la dosis o frecuencia de dosis máxima que evita efectos secundarios indeseables significativos. Una dosis semanal total puede ser de al menos 0,05 µg/kg de peso corporal, al menos 0,2 µg/kg, al menos 0,5 µg/kg, al menos 1 µg/kg, al menos 10 µg/kg, al menos 100 µg/kg, al menos 0,2 mg/kg, al menos 1,0 mg/kg, al menos 2,0 mg/kg, al menos 10 mg/kg, al menos 25 mg/kg, o al menos 50 mg/kg (véase, por ejemplo, Yang, *et al.* (2003) New Engl. J. Med. 349: 427-434; Herold, *et al.* (2002) New Engl. J. Med.

- 346: 1692-1698; Liu, *et al.* (1999) *J. Neurol. Neurosurg. Psych.* 67:451-456; Portielji, *et al.* (2003) *Cancer Immunol. Immunother.* 52: 133-144). La dosis deseada de una molécula pequeña terapéutica, por ejemplo, un péptido mimético, armazón proteico, producto natural o producto químico orgánico, es aproximadamente la misma que para un anticuerpo o polipéptido, en moles/kg de peso corporal. La concentración en plasma deseada de una molécula pequeña o armazón terapéutico es aproximadamente la misma que para un anticuerpo, en moles/kg de peso corporal. La dosis puede ser de al menos 15 µg, al menos 20 µg, al menos 25 µg, al menos 30 µg, al menos 35 µg, al menos 40 µg, al menos 45 µg, al menos 50 µg, al menos 55 µg, al menos 60 µg, al menos 65 µg, al menos 70 µg, al menos 75 µg, al menos 80 µg, al menos 85 µg, al menos 90 µg, al menos 95 µg o al menos 100 µg. Las dosis administradas a un sujeto pueden sumar al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11 o 12, o más.
- Para los armazones, la dosificación administrada a un paciente puede ser 0,0001 mg/kg a 100 mg/kg del peso corporal del paciente. La dosificación puede estar entre 0,0001 mg/kg y 20 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 10 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 5 mg/kg, 0,0001 y 2 mg/kg, 0,0001 y 1 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,75 mg/kg, 0,0001 mg/kg y 0,5 mg/kg, 0,0001 mg/kg a 0,25 mg/kg, 0,0001 a 0,15 mg/kg, 0,0001 a 0,10 mg/kg, 0,001 a 0,5 mg/kg, 0,01 a 0,25 mg/kg o 0,01 a 0,10 mg/kg del peso corporal del paciente.
- La dosificación de los armazones puede calcularse usando el peso del paciente en kilogramos (kg) multiplicado por la dosis para administrar en mg/kg. La dosificación de los armazones puede ser de 150 µg/kg o menos, 125 µg/kg o menos, 100 µg/kg o menos, 95 µg/kg o menos, 90 µg/kg o menos, 85 µg/kg o menos, 80 µg/kg o menos, 75 µg/kg o menos, 70 µg/kg o menos, 65 µg/kg o menos, 60 µg/kg o menos, 55 µg/kg o menos, 50 µg/kg o menos, 45 µg/kg o menos, 40 µg/kg o menos, 35 µg/kg o menos, 30 µg/kg o menos, 25 µg/kg o menos, 20 µg/kg o menos, 15 µg/kg o menos, 10 µg/kg o menos, 5 µg/kg o menos, 2,5 µg/kg o menos, 2 µg/kg o menos, 1,5 µg/kg o menos, 1 µg/kg o menos, 0,5 µg/kg o menos o 0,5 µg/kg o menos del peso corporal de un paciente.
- La dosis unitaria de los armazones puede ser de 0,1 mg a 20 mg, 0,1 mg a 15 mg, 0,1 mg a 12 mg, 0,1 mg a 10 mg, 0,1 mg a 8 mg, 0,1 mg a 7 mg, 0,1 mg a 5 mg, 0,1 a 2,5 mg, 0,25 mg a 20 mg, 0,25 a 15 mg, 0,25 a 12 mg, 0,25 a 10 mg, 0,25 a 8 mg, 0,25 mg a 7 mg, 0,25 mg a 5 mg, 0,5 mg a 2,5 mg, 1 mg a 20 mg, 1 mg a 15 mg, 1 mg a 12 mg, 1 mg a 10 mg, 1 mg a 8 mg, 1 mg a 7 mg, 1 mg a 5 mg o 1 mg a 2,5 mg.
- La dosificación de los armazones puede conseguir un título en suero de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml, o al menos 400 µg/ml en un sujeto.
- Como alternativa, la dosificación de los armazones puede conseguir un título en suero de al menos 0,1 µg/ml, al menos 0,5 µg/ml, al menos 1 µg/ml, al menos 2 µg/ml, al menos 5 µg/ml, al menos 6 µg/ml, al menos 10 µg/ml, al menos 15 µg/ml, al menos 20 µg/ml, al menos 25 µg/ml, al menos 50 µg/ml, al menos 100 µg/ml, al menos 125 µg/ml, al menos 150 µg/ml, al menos 175 µg/ml, al menos 200 µg/ml, al menos 225 µg/ml, al menos 250 µg/ml, al menos 275 µg/ml, al menos 300 µg/ml, al menos 325 µg/ml, al menos 350 µg/ml, al menos 375 µg/ml o al menos 400 µg/ml en el sujeto.
- Las dosis de armazones pueden repetirse y las administraciones pueden separarse por al menos 1 día, 2 días, 3 días, 5 días, 10 días, 15 días, 30 días, 45 días, 2 meses, 75 días, 3 meses o al menos 6 meses.
- Una cantidad eficaz para un paciente particular puede variar dependiendo de factores tales como la afección que se trate, la salud general del paciente, el método, vía y dosis de administración y la gravedad de los efectos secundarios (véase, por ejemplo, Maynard, *et al.* (1996) *A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice*, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) *Good Laboratory and Good Clinical Practice*, Urch Publ., Londres, Reino Unido).
- La vía de administración puede ser, por ejemplo, por aplicación tópica o cutánea, inyección o infusión por vía intravenosa, intraperitoneal, intracerebral, intramuscular, intraocular, intraarterial, intracerebroespinal, intralesional o por sistemas de liberación sostenida o un implante (véase, por ejemplo, Sidman *et al.* (1983) *Biopolymers* 22: 547-556; Langer, *et al.* (1981) *J. Biomed. Mater. Res.* 15:167-277; Langer (1982) *Chem. Tech.* 12: 98-105; Epstein, *et al.* (1985) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 3688-3692; Hwang, *et al.* (1980) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77: 4030-4034; Patentes de Estados Unidos N° 6.350.466 y 6.316.024). Cuando sea necesario, la composición también puede incluir un agente de solubilización y un anestésico total tal como lidocaína para calmar el dolor en el sitio de la inyección. Además, también puede emplearse administración pulmonar, por ejemplo, mediante el uso de un inhalador o nebulizador, y formulación con un agente de aerosolización. Véase, por ejemplo, Patentes de Estados Unidos N° 6.019.968, 5.985.320, 5.985.309, 5.934.272, 5.874.064, 5.855.913, 5.290.540 y 4.880.078; y Publicación de PCT N° WO 92/19244, WO 97/32572, WO 97/44013, WO 98/31346 y WO 99/66903. En una realización, un anticuerpo, terapia de combinación, o una composición se administra usando tecnología de suministro farmacológico pulmonar Alkermes AIR™ (Alkermes, Inc., Cambridge, Mass.).

Una composición descrita en el presente documento también puede administrarse mediante una o más vías de administración usando uno o más de una diversidad de métodos conocidos en la técnica. Como se apreciará por el experto en la materia, la vía y/o el modo de administración variarán dependiendo de los resultados deseados. Las rutas seleccionadas de administración para armazones incluyen intravenosa, intramuscular, intradérmica, intraperitoneal, subcutánea, espinal u otras vías parenterales de administración, por ejemplo por inyección o infusión. La administración parenteral puede representar modos de administración distintos de administración entérica y tópica, habitualmente por inyección, e incluye, sin limitación, inyección e infusión intravenosa, intramuscular, intraarterial, intratecal, intracapsular, infraorbital, intracardiaca, intradérmica, intraperitoneal, transtraqueal, subcutánea, subcuticular, intraarticular, subcapsular, subaracnoidea, intraespinal, epidural e intraesternal. Como alternativa, una composición puede administrarse mediante una vía no parenteral, tal como una vía de administración tópica, epidérmica o mucosa, por ejemplo, por vía intranasal, por vía oral, por vía vaginal, por vía rectal, por vía sublingual o por vía tópica.

Si los armazones se administran en un sistema de liberación controlada o liberación sostenida, puede usarse una bomba para conseguir liberación controlada o sostenida (véase Langer, mencionado anteriormente; Sefton, 1987, *CRC Crit. Ref. Biomed. Eng.* 14: 20; Buchwald *et al.*, 1980, *Surgery* 88: 507; Saudek *et al.*, 1989, *N. Engl. J. Med.* 321: 574). Pueden usarse materiales poliméricos para conseguir liberación controlada o sostenida de las terapias (véase, por ejemplo, *Medical Applications of Controlled Release*, Langer y Wise (eds.), CRC Pres., Boca Raton, Fla. (1974); *Controlled Drug Bioavailability, Drug Product Design and Performance*, Smolen y Ball (eds.), Wiley, Nueva York (1984); Ranger y Peppas, 1983, J., *Macromol. Sci. Rev. Macromol. Chem.* 23: 61; véase también Levy *et al.*, 1985, *Science* 228: 190; During *et al.*, 1989, *Ann. Neurol.* 25:351; Howard *et al.*, 1989, *J. Neurosurg.* 7 1:105); Patente de Estados Unidos Nº 5.679.377; Patente de Estados Unidos Nº 5.916.597; Patente de Estados Unidos Nº 5.912.015; Patente de Estados Unidos Nº 5.989.463; Patente de Estados Unidos Nº 5.128.326; Publicación de PCT Nº WO 99/15154; y Publicación de PCT Nº WO 99/20253. Los ejemplos de polímeros usados en formulaciones de liberación sostenida incluyen, pero sin limitación poli(2-hidroxi etil metacrilato), poli(metil metacrilato), poli(ácido acrílico), poli(etilen-co-vinil acetato), poli(ácido metacrílico), poliglicólidos (PLG), polianhídridos, poli(N-vinil pirrolidona), poli(vinil alcohol), poliacrilamida, poli(etilenglicol), polilactidas (PLA), poli(lactida-co-glicolidas) (PLGA), y poliortoésteres. En una realización, el polímero usado en una formulación de liberación sostenida es inerte, sin impurezas lixiviables, estable en el almacenamiento, estéril y biodegradable. Puede colocarse un sistema de liberación controlada o sostenida próximo a la diana profiláctica o terapéutica, requiriendo de este modo solamente una fracción de la dosis sistémica (véase, por ejemplo, Goodson, in *Medical Applications of Controlled Release*, mencionado anteriormente, vol. 2, pp. 115-138 (1984)).

Se analizan sistemas de liberación controlada en la revisión por Langer (1990, *Science* 249: 1527-1533). Puede usarse cualquier técnica conocida por un experto en la materia para producir formulaciones de liberación sostenida que comprenden uno o más armazones. Véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos Nº 4.526.938, Publicación de PCT WO 91/05548, Publicación de PCT WO 96/20698, Ning *et al.*, 1996, "Intratamoral Radioimmunotherapy of a Human Colon Cancer Xenograft Using a Sustained-Release Gel", *Radiotherapy & Oncology* 39: 179-189, Song *et al.*, 1995, "Antibody Mediated Lung Targeting of Long-Circulating Emulsions", *PDA Journal of Pharmaceutical Science & Technology* 50: 372-397, Cleek *et al.*, 1997, "Biodegradable Polymeric Carriers for a bFGF Antibody for Cardiovascular Application", *Pro. Int'l. Symp. Control. Rel. Bioact. Mater.* 24: 853-854, y Lam *et al.*, 1997, "Microencapsulation of Recombinant Humanized Monoclonal Antibody for Local Delivery" *Proc. Int'l. Symp. Control Rel. Bioact. Mater.* 24: 759-760.

Si el armazón se administra por vía tópica, puede formularse en forma de una pomada, crema, parche transdérmico, loción, gel, champú, pulverización, aerosol, solución, emulsión u otra forma bien conocida por un experto en materia. Véase, por ejemplo, Remington's Pharmaceutical Sciences and Introduction to Pharmaceutical Dosage Forms, 19ª ed., Mack Pub. Co. Easton, Pa. (1995). Para formas de dosificación tópica no pulverizables, se emplean formas viscosas a semisólidas o sólidas que comprenden un vehículo o uno o más excipientes compatibles con la aplicación tópica que tienen una viscosidad dinámica, en algunos casos, mayor que el agua. Las formulaciones adecuadas incluyen, sin limitación, soluciones, suspensiones, emulsiones, cremas, ungüentos, polvos, linimentos, pomadas y similares, que, si se desea, se esterilizan o se mezclan con agentes adyuvantes (por ejemplo, conservantes, estabilizadores, agentes humectantes, tampones o sales) para influir en diversas propiedades, tales como, por ejemplo, la presión osmótica. Otras formas de dosificación tópica adecuadas incluyen preparaciones de aerosol pulverizables en las que el principio activo, en algunos casos, en combinación con un vehículo inerte, sólido o líquido se envasan en una mezcla con un compuesto volátil presurizado (por ejemplo, un propulsor gaseoso, tal como freón) o en un envase a presión. También pueden añadirse hidratantes o humectantes a composiciones farmacéuticas y formas de dosificación si se desea. Se conocen en la técnica ejemplos de dichos ingredientes adicionales.

Si el armazón se administra por vía intranasal, puede formularse en una forma de aerosol, pulverización, nebulización o en forma de gotas. En particular, los agentes profilácticos o terapéuticos pueden suministrarse convenientemente en forma de una presentación de pulverización de aerosol a partir de envases presurizados o un nebulizador, con el uso de un propulsor adecuado (por ejemplo, diclorodifluorometano, triclorofluorometano, diclorotetrafluoroetano, dióxido de carbono u otro gas adecuado). En el caso de un aerosol presurizado la unidad de dosificación puede determinarse proporcionando una válvula para suministrar una cantidad medida. Pueden

formularse cápsulas y cartuchos (compuestos de, por ejemplo, gelatina) para su uso en un inhalador o insuflador que contiene una mezcla en polvo del compuesto y una base de polvo adecuada tal como lactosa o almidón.

Se conocen bien en la técnica métodos para co-administración o tratamiento con un segundo agente terapéutico, por ejemplo, una citocina, esteroide, agente quimioterapéutico, antibiótico o radiación (véase, por ejemplo, Hardman, *et al.* (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10^a ed., McGraw-Hill, Nueva York, N.Y.; Poole y Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams y Wilkins, Fila., Pa.; Chabner y Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams y Wilkins, Fila., Pa.). Una cantidad eficaz de producto terapéutico puede reducir los síntomas en al menos 10 %; en al menos 20 %; al menos aproximadamente 30 %; al menos 40 % o al menos 50 %.

Pueden administrarse terapias adicionales (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos), que pueden administrarse en combinación con los armazones, con menos de 5 minutos de diferencia, con menos de 30 minutos de diferencia, 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, de aproximadamente 12 horas a 18 horas de diferencia, de 18 horas a 24 horas de diferencia, de 24 horas a 36 horas de diferencia, de 36 horas a 48 horas de diferencia, de 48 horas a 52 horas de diferencia, de 52 horas a 60 horas de diferencia, de 60 horas a 72 horas de diferencia, de 72 horas a 84 horas de diferencia, de 84 horas a 96 horas de diferencia, o de 96 horas a 120 horas de diferencia de los armazones. Las dos o más terapias pueden administrarse en una misma visita del paciente.

Los armazones y las otras terapias pueden administrarse de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, opcionalmente, seguido de la administración de una tercera terapia, (por ejemplo, agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y así sucesivamente, y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias, para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

En ciertas realizaciones, los armazones pueden formularse para asegurar la distribución apropiada *in vivo*. Por ejemplo, la barrera hematoencefálica (BBB) excluye muchos compuestos altamente hidrófilos. Para asegurar que los compuestos terapéuticos crucen la BBB (si se desea), pueden formularse, por ejemplo, en liposomas. Para métodos de fabricación de liposomas, véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 4.522.811; 5.374.548; y 5.399.331. Los liposomas pueden comprender uno o más restos que se transportan de forma selectiva a células u órganos específicos, potenciando de este modo el suministro farmacológico dirigido (véase, por ejemplo, V.V. Ranade (1989) *J. Clin. Pharmacol.* 29: 685). Los restos de dirección ejemplares incluyen folato o biotina (véase, por ejemplo, Patente de Estados Unidos 5.416.016 de Low *et al.*); manósidos (Umezawa *et al.*, (1988) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 153: 1038); anticuerpos (P.G. Bloeman *et al.* (1995) *FEBS Lett.* 357: 140; M. Owais *et al.* (1995) *Antimicrob. Agents Chemother.* 39: 180); receptor de proteína A tensioactivo (Briscoe *et al.* (1995) *Am. J. Physiol.* 1233: 134); p120 (Schreier *et al.* (1994) *J. Biol. Chem.* 269: 9090); véase también K. Keinanen; M.L. Laukkanen (1994) *FEBS Lett.* 346: 123; J.J. Killion; I.J. Fidler (1994) *Immunomethods* 4: 273.

Se describen protocolos para la administración de una composición farmacéutica que comprende armazones sola o en combinación con otras terapias a un sujeto que lo necesite. Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación descritas en el presente documento pueden administrarse conjuntamente o secuencialmente a un sujeto. La terapia (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación descritas en el presente documento también pueden administrarse de forma cíclica. La terapia cíclica implica la administración de una primera terapia (por ejemplo, un primer agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo, seguido de la administración de una segunda terapia (por ejemplo, un segundo agente profiláctico o terapéutico) durante un periodo de tiempo y repetir esta administración secuencial, es decir, el ciclo, para reducir el desarrollo de resistencia a una de las terapias (por ejemplo, agentes) para evitar o reducir los efectos secundarios de una de las terapias (por ejemplo, agentes), y/o para mejorar la eficacia de las terapias.

Las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) de las terapias de combinación pueden administrarse a sujetos simultáneamente. El término "simultáneamente" no se limita a la administración de terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) exactamente en el mismo momento, sino que más bien se entiende que una composición farmacéutica que comprende armazones se administra a un sujeto en una secuencia y en un intervalo temporal de modo que los armazones puedan actuar juntos con la otra terapia o las otras terapias para proporcionar un beneficio aumentado que si se administraran de otro modo. Por ejemplo, cada terapia puede administrarse a un

sujeto en el mismo momento o secuencialmente en cualquier orden en diferentes puntos en el tiempo; sin embargo, si no se administran al mismo tiempo, deberían administrarse suficientemente cerca en el tiempo para proporcionar el efecto terapéutico o profiláctico deseado. Cada terapia puede administrarse a un sujeto por separado, en cualquier forma apropiada y por cualquier vía adecuada. En diversas realizaciones, las terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) se administran a un sujeto con menos de 15 minutos, menos de 30 minutos, menos de 1 hora de diferencia, a aproximadamente 1 hora de diferencia, de aproximadamente 1 hora a aproximadamente 2 horas de diferencia, de aproximadamente 2 horas a aproximadamente 3 horas de diferencia, de aproximadamente 3 horas a aproximadamente 4 horas de diferencia, de aproximadamente 4 horas a aproximadamente 5 horas de diferencia, de aproximadamente 5 horas a aproximadamente 6 horas de diferencia, de aproximadamente 6 horas a aproximadamente 7 horas de diferencia, de aproximadamente 7 horas a aproximadamente 8 horas de diferencia, de aproximadamente 8 horas a aproximadamente 9 horas de diferencia, de aproximadamente 9 horas a aproximadamente 10 horas de diferencia, de aproximadamente 10 horas a aproximadamente 11 horas de diferencia, de aproximadamente 11 horas a aproximadamente 12 horas de diferencia, 24 horas de diferencia, 48 horas de diferencia, 72 horas de diferencia o 1 semana de diferencia. En otras realizaciones, se administran dos o más terapias (por ejemplo, agentes profilácticos o terapéuticos) en la misma visita del paciente.

Los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse a un sujeto en la misma composición farmacéutica. Como alternativa, los agentes profilácticos o terapéuticos de las terapias de combinación pueden administrarse simultáneamente a un sujeto en composiciones farmacéuticas separadas. Los agentes profilácticos o terapéuticos pueden administrarse a un sujeto por la misma o diferentes vías de administración.

5.16 Métodos para usar armazones

Los armazones descritos en el presente documento tienen utilidades de diagnóstico y terapéuticas *in vitro* e *in vivo*. Por ejemplo, estas moléculas pueden administrarse a células en cultivo, por ejemplo *in vitro* o *ex vivo*, o en un sujeto, por ejemplo *in vivo*, para tratar, prevenir o diagnosticar una diversidad de trastornos.

Se describen métodos para usar los armazones descritos en el presente documento. Se describe el uso de los armazones para la prevención, diagnóstico, control, tratamiento o alivio de uno o más síntomas asociados con enfermedades, trastornos de enfermedades o trastornos, incluyendo pero sin limitación cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, enfermedades infecciosas solas o en combinación con otras terapias. Se describe el uso de los armazones conjugados o fusionados con un resto (por ejemplo, agente terapéutico o fármaco) para la prevención, el control, tratamiento o alivio de uno o más síntomas asociados con enfermedades, trastornos o infecciones, incluyendo pero sin limitación cáncer, enfermedades inflamatorias y autoinmunitarias, enfermedades infecciosas solas o en combinación con otras terapias.

Además, muchos receptores de superficie celular se activan o desactivan como consecuencia del entrecruzamiento de subunidades. Las proteínas pueden usarse para estimular o inhibir una respuesta en una célula diana entrecruzando receptores de superficie celular. En otra realización, los armazones pueden usarse para bloquear la interacción de múltiples receptores de superficie celular con antígenos. En otra realización, los armazones pueden usarse para fortalecer la interacción de múltiples receptores de superficie celular con antígenos. En otra realización, puede ser posible entrecruzar homo o heterodímeros de un receptor de superficie celular usando los armazones que contienen dominios de unión que comparten especificidad por el mismo antígeno, o se unen con dos antígenos diferentes. En otra realización, las proteínas podrían usarse para suministrar un ligando, o análogo de ligando a un receptor de superficie celular.

Se describen métodos para dirección de epítopos que no se consigue fácilmente con anticuerpos tradicionales. Por ejemplo, en una realización, los armazones pueden usarse para dirigirse en primer lugar a un antígeno adyacente y mientras se unen, otro dominio de unión puede interactuar con el antígeno críptico.

Se describen métodos para usar los armazones para unir distintos tipos celulares. En una realización, las proteínas pueden unirse con una célula diana con un dominio de unión y reclutar otra célula mediante otro dominio de unión. En otra realización, la primera célula puede ser una célula cancerosa y la segunda célula es una célula efectora inmunitaria tal como un linfocito NK. En otra realización, los armazones pueden usarse para fortalecer la interacción entre dos células distintas, tal como una célula presentadora de antígenos y un linfocito T para posiblemente reforzar la respuesta inmunitaria.

También se describen métodos para usar las proteínas de armazones para aliviar, tratar, o prevenir cáncer o síntomas del mismo. En una realización, los métodos son útiles en el tratamiento de cánceres de la cabeza, cuello, ojo, boca, garganta, esófago, pecho, piel, hueso, pulmón, colon, recto, colorrectal, estómago, bazo, riñón, músculo esquelético, tejido subcutáneo, melanoma metastásico, endometrio, próstata, mama, ovarios, testículos, tiroides, sangre, ganglios linfáticos, riñón, hígado, páncreas, cerebro o sistema nervioso central.

También se describen métodos para usar los armazones para reducir una población celular. En una realización, los métodos son útiles en la reducción de los siguientes tipos celulares: eosinófilos, basófilos, neutrófilos, linfocitos T, linfocitos B, mastocitos, monocitos y células tumorales.

5 5.17 Armazones específicos de TRAIL-R2

La proteína TRAIL-R2 se codifica por un miembro de la superfamilia génica del receptor de TNF y contiene un dominio de muerte intracelular. En algunas casos, también puede conocerse como TNFRSF10B; CD262, DR5, KILLER< KILLER/DR5, TRAILR2, TRICK2, TRICK2A, TRICK2B, TRICKB o ZTNFR9. Este receptor puede activarse por ligando inductor de apoptosis relacionado con factor de necrosis tumoral (TNFSF10/TRAIL/APO-2L), y transduce una señal apoptótica. Además, la apoptosis inducida por TRAIL-R2 implica caspasas y la molécula adaptadora intracelular FADD/MORT1 (Walczak *et al.* EMBOJ, (1997), 16, 5386-97).

Se describen armazones que se unen específicamente con TRAIL-R2. En realizaciones específicas los armazones se unen específicamente con TRAIL-R2 humano. En otras realizaciones específicas, los armazones se unen con homólogos de TRAIL-R2 de ratón, pollo, rhesus, cynomolgus, rata o conejo. En algunas realizaciones, los armazones se unen con un epítipo expuesto de TRAIL-R2. Dichas realizaciones incluyen TRAIL-R2 expresado de forma endógena en células y/o células transfectadas para expresar de forma ectópica el receptor. En otras realizaciones, los armazones reconocen epítipos presentados en un TRAIL-R2 monomérico. En otras realizaciones, los armazones reconocen epítipos presentados en una forma homodimérica de TRAIL-R2. En otras realizaciones más, los armazones se unen con TRAIL-R2 monomérico y facilitan la dimerización u oligomerización de 2 o más moléculas de TRAIL-R2 (por ejemplo, pero sin limitación, armazones multiméricos). En otras realizaciones más, los armazones reducen o inhiben la interacción de TRAIL-R2 con el ligando TRAIL. En otras realizaciones, los armazones imitan la interacción del ligando de TRAIL con TRAIL-R2. En realizaciones adicionales, los armazones agonizan la señalización celular por TRAIL-R2.

Se describen métodos para modular la actividad del TRAIL-R2 usando los armazones descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula que expresa TRAIL-R2 con armazones específicos de TRAIL-R2 y que bloquean la interacción con el ligando TRAIL. En otras realizaciones, los métodos comprenden poner en contacto una célula que expresa TRAIL-R2 con un armazón específico de TRAIL-R2 e imitar la interacción del ligando TRAIL con TRAIL-R2. En otras realizaciones, los métodos comprenden agonizar TRAIL-R2 poniendo en contacto con un armazón específico de TRAIL-R2. En otras realizaciones, los métodos comprenden dimerizar u oligomerizar TRAIL-R2 poniendo en contacto un monómero de TRAIL-R2 expresado en células con un armazón específico de TRAIL-R2 y facilitar la dimerización u oligomerización. En realizaciones adicionales, puede conseguirse dimerización de TRAIL-R2 mediante el uso de, por ejemplo, pero sin limitación, armazones multiméricos, armazones que imitan los dímeros de TRAIL-R2, armazones que estabilizan la formación de dímeros TRAIL-R2, armazones que desestabilizan los monómeros de TRAIL-R2 o armazones que solamente reconocen dímeros de TRAIL-R2 presentados en células.

En otras realizaciones, puede conseguirse dimerización u oligomerización de TRAIL-R2 mediante el uso de armazones monoméricos acoplados con un agente de dimerización u oligomerización de armazones. Dichos agentes de dimerización u oligomerización de armazones pueden incluir, por ejemplo, pero sin limitación, un anticuerpo anti-armazón, uso de armazones con marcadores epítipos acoplados con anticuerpos para el marcador epítipo, o la incorporación de diversos motivos de dimerización u oligomerización de proteínas descritos en el presente documento y conocidos en la técnica. En una realización adicional, pueden inducirse dímeros u oligómeros de TRAIL-R2 mediante la administración de armazones monoméricos seguido de la administración de un agente de dimerización u oligomerización de armazón.

En algunas realizaciones, los métodos comprenden la administración de un armazón específico de TRAIL-R2 que reduce la viabilidad celular como se mide por ensayos rutinarios conocidos en la técnica. En realizaciones adicionales, la reducción de la viabilidad celular es la activación de apoptosis como se mide por ensayos conocidos en la técnica. En otras realizaciones, la reducción de la viabilidad celular es la inhibición de división celular como se mide por métodos aceptados en la técnica. En algunas realizaciones, la viabilidad celular se reduce en al menos 10 %, al menos 20 %, al menos 30 %, al menos 40 %, al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o más en comparación con la viabilidad celular en ausencia de tratamiento. En algunas realizaciones, la viabilidad celular se mide usando el procedimiento perfilado en el Ejemplo 15 y/o 17 en el presente documento u otros métodos conocidos en la técnica.

En algunas realizaciones, los armazones de unión a TRAIL-R2 agonizan TRAIL-R2 con actividad similar al ligando para TRAIL-R2, conocido como TRAIL (ligando Apo-2). En otras realizaciones, los armazones de unión a TRAIL-R2 son capaces de activar suficientemente TRAIL-R2 para dar como resultado la activación de una o más rutas de señalización intracelular, incluyendo la activación de caspasa 3, caspasa 8, caspasa 10, o FADD. En otras realizaciones, los armazones de unión a TRAIL-R2 activan la apoptosis en al menos un tipo de célula cancerosa. En realizaciones adicionales, los armazones de unión a TRAIL-R2 demuestran una actividad potenciada de la apoptosis en al menos un tipo celular en comparación con TRAIL. En otras realizaciones, los armazones de unión a TRAIL-R2 pueden unirse o competir con la unión por el mismo epítipo en TRAIL-R2 como TRAIL (ligando). En dichas

realizaciones, los armazones de unión a TRAIL-R2 son capaces de bloquear o inhibir la interacción de TRAIL-R2 con TRAIL en al menos 50 %, al menos 60 %, al menos 70 %, al menos 80 %, al menos 90 % o más lo que puede determinarse en un ensayo competitivo *in vitro* usando el ligando TRAIL soluble (tal como el fragmento 114-281 del ligando TRAIL), estudios cristalográficos u otros estudios *in vitro* o *in vivo* conocidos.

5 5.17.1 Métodos para usar agentes de unión a TRAIL-R2 en terapia

Se sabe que TRAIL-R2 media en la señalización de apoptosis. Aunque varios tipos de células normales expresan TRAIL-R2, la señalización de apoptosis mediante este receptor parece restringirse principalmente a células tumorales, que se hacen más susceptibles a apoptosis mediada por receptor de muerte en el contexto de su transformación por oncogenes tales como Myc o Ras (Wang *et al.*, Cancer Cell 5: 501-12 (2004); Nesterov *et al.*, Cancer Res. 64: 3922-7 (2004)). TRAIL-R2 se expresa frecuentemente por líneas celulares del cáncer humano así como tumores primarios.

Los armazones específicos de TRAIL-R2 descritos en el presente documento pueden ser útiles en la prevención, el tratamiento, el mantenimiento o el alivio del cáncer. En algunas realizaciones, el cáncer puede implicar células cancerosas que expresan TRAIL-R2. En otras realizaciones, las células cancerosas sobreexpresan TRAIL-R2 en comparación con células no cancerosas. En algunas realizaciones, el cáncer es, por ejemplo, carcinoma, linfoma, blastoma, sarcoma o leucemia. En otras realizaciones, el cáncer puede incluir cáncer de células escamosas, cáncer de pulmón de células pequeñas, cáncer de pulmón de células no pequeñas (NSCLC), linfoma no de Hodgkin, blastoma, cáncer gastrointestinal, cáncer renal, cáncer ovárico, cáncer de hígado, cáncer de estómago, cáncer de vejiga, hepatoma, cáncer de mama, cáncer de colon, cáncer colorrectal, cáncer pancreático, carcinoma endometrial, carcinoma de las glándulas salivales, cáncer de riñón, cáncer de hígado, cáncer de próstata, cáncer de vulva, cáncer de tiroides, carcinoma hepático, cáncer de cabeza y cuello, cáncer de pulmón, adenocarcinoma, carcinoma de células renales, carcinoma hepatocelular u otros cánceres descritos en el presente documento.

En algunas realizaciones, se administran armazones específicos de TRAIL-R2 a un sujeto que necesite tratamiento (es decir, un paciente con cáncer). En dicha realizaciones, se administra una composición sin pirógenos, estéril, que comprende un armazón específico de TRAIL-R2 a un sujeto que lo necesite. La eficacia del tratamiento puede medirse usando una diversidad de ensayos *in vitro* e *in vivo* bien conocidos en la técnica, tales como, pero sin limitación, actividad apoptótica, usando activación por caspasa de unión de Anexina V, así como una reducción en la carga o el volumen tumoral.

En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 son útiles para el diagnóstico y detección de cáncer u otras enfermedades asociadas con TRAIL-R2. En dichas realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 se unen con un agente de detección, tal como, pero sin limitación, un radioisótopo, marcador fluorescente o quimioluminiscente. Dichos agentes de unión ligados son útiles en métodos que detectan o diagnostican el cáncer o enfermedades asociadas con TRAIL-R2 en un sujeto, o en una muestra tomada de dicho sujeto. Además, los armazones específicos de TRAIL-R2 son útiles en el diagnóstico y tratamiento de otras afecciones patológicas asociadas con TRAIL-R2, tales como enfermedades relacionadas con el sistema inmunitario en mamíferos, incluyendo seres humanos.

5.17.2. Secuencias de unión a TRAIL-R2 específicas

En un intento de identificar armazones específicos de TRAIL-R2, se exploraron una biblioteca de dos bucles y una biblioteca de tres bucles. Se identificaron varios clones que se unían específicamente con TRAIL-R2.

En algunas realizaciones los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis secuencias de bucles que se unen con TRAIL-R2. En algunas realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis secuencias de bucle de clones de armazón de unión a TRAIL-R2 seleccionados de 2F4, 5B10, 10D9, 6F11, 8B3, 5E5, 2H6, 7G11 o 6C7. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle seleccionada de SEC ID N°: 126-143. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 o 142. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 o 143. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 o 142; y una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 o 143. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 126 y una secuencia de bucle FG de 127. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 128 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 129. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 130 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 131. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 132 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 133. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 134 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 135. En una realización

específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 136 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 137. En otra realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 140 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 141. En otra realización específica más, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 138 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 139.

Se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen específicamente con TRAIL-R2, seleccionándose dichos agentes de unión a TRAIL-R2 del grupo que consiste en 2F4, 5B10, 10D9, 6F11, 8B3, 5E5, 2Hb, 7G11 o 6C7. Se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen específicamente con TRAIL-R2, comprendiendo dichos agentes de unión a TRAIL-R2 una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 126, 128, 130, 132, 134, 136, 138, 140 o 142; y una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 127, 129, 131, 133, 135, 137, 139, 141 o 143. Pueden realizarse ensayos de competición como se presenta en el presente documento en los Ejemplos 11 y/o 14, o por otros ensayos conocidos en la técnica.

En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una, al menos dos, al menos tres, al menos cuatro, al menos cinco o al menos seis secuencias de bucle de clones de almacén de unión a TRAIL-R2 seleccionados de 1E03, 2B04, 1C12, 1A03, 1C10, 1B12, 2G03, 2D3, 1C06, 2F08, 1B04, 3B11, 1D8, 2A12, 1E05, 2F02, 1H05, 2A11 o 1G11. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos un bucle de SEC ID N°: 144-200. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195 o 198. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle DE seleccionada de SEC ID N°: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196 o 199. En otras realizaciones, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197 o 200. En realizaciones adicionales, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden al menos una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195 o 198; al menos una secuencia de bucle DE seleccionada de SEC ID N°: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196 o 199; y al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197 o 200.

En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 144, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 145 y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 146. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 147, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 148, y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 149. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 150, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 151, y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 152. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 153, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 154, y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 155. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 165, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 166, y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 167. En una realización específica, los armazones específicos de TRAIL-R2 comprenden una secuencia de bucle BC de SEC ID N°: 198, una secuencia de bucle DE de SEC ID N°: 199, y una secuencia de bucle FG de SEC ID N°: 200.

Se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen específicamente con TRAIL-R2, seleccionándose dichos agentes de unión a TRAIL-R2 del grupo que consiste en 1E03, 2B04, 1C12, 1A03, 1C10, 1B12, 2G03, 2D3, 1C06, 2F08, 1B04, 3B11, 1D8, 2A12, 1E05, 2F02, 1H05, 2A11 o 1G11. Se describen armazones que compiten por la unión con armazones que se unen específicamente con TRAIL-R2, comprendiendo dichos agentes de unión a TRAIL-R2 una secuencia de bucle BC seleccionada de SEC ID N°: 144, 147, 150, 153, 156, 159, 162, 165, 168, 171, 174, 177, 180, 183, 186, 189, 192, 195 o 198; al menos una secuencia de bucle DE seleccionada de SEC ID N°: 145, 148, 151, 154, 157, 160, 163, 166, 169, 172, 175, 178, 181, 194, 187, 190, 193, 196 o 199; y al menos una secuencia de bucle FG seleccionada de SEC ID N°: 146, 149, 152, 155, 158, 161, 164, 167, 170, 173, 179, 182, 185, 188, 191, 194, 197 o 200. Pueden realizarse ensayos de competición como se presenta en el presente documento en los Ejemplos 11 y/o 14, o por otros ensayos conocidos en la técnica.

5.18. Métodos de uso de los armazones

Se describen también métodos para usar armazones para inactivar, inhibir o agotar citocinas. En una realización, los métodos son útiles en la inactivación, inhibición o agotamiento de al menos una de las siguientes citocinas: TNF- α , TGF- β , C5a, fMLP, Interferón alfa (incluyendo subtipos, 1, 2a, 2b, 4, 4b, 5, 6, 7, 8, 10, 14, 16, 17 y 21), Interferón beta, Interferón omega, Interferón gamma, interleucinas IL-1-33, CCL1-28, CXCL 1-17, y CX3CL1.

Se desvelan métodos para usar los armazones para inactivar diversos agentes de infecciones tales como virus, hongos, microbios eucariotas y bacterias. En algunas realizaciones los armazones pueden usarse para inactivar virus VSR, hMPV, PIV o de la gripe. En otras realizaciones, los armazones pueden usarse para inactivar patógenos fúngicos, tales como, pero sin limitación, miembros de los géneros *Naegleria*, *Aspergillus*, *Blastomyces*,

Histoplasma, *Candida* o *Tinea*. En otras realizaciones, los armazones pueden usarse para inactivar microbios eucariotas, tales como, pero sin limitación, miembros de los géneros *Giardia*, *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma*, y *Entamoeba*. En otras realizaciones, los armazones pueden usarse para inactivar patógenos bacterianos, tales como, pero sin limitación, miembros de los géneros *Staphylococcus*, *Streptococcus*, *Pseudomonas*, *Clostridium*, *Borrelia*, *Vibro* y *Neisseria*.

También se describen métodos para usar proteínas de armazones como reactivos de diagnóstico. Las proteínas pueden ser útiles en kits o reactivos en los que es necesario capturar de forma eficaz simultáneamente diferentes antígenos.

Las proteínas y composiciones que las comprenden son útiles para muchos fines, por ejemplo, como productos terapéuticos contra una amplia serie de enfermedades y trastornos crónicos y agudos incluyendo, pero sin limitación, cáncer. Los ejemplos de cánceres que pueden prevenirse, controlarse, tratarse o aliviarse de acuerdo con los métodos descritos en el presente documento incluyen, pero sin limitación, cáncer de la cabeza, cuello, ojos, boca, garganta, esófago, pecho, hueso, pulmón, colon, recto, estómago, próstata, mama, ovarios, riñón, hígado, páncreas y cerebro. Los cánceres adicionales incluyen, pero sin limitación, los siguientes: leucemias tales como pero sin limitación, leucemia aguda, leucemia linfocítica aguda, leucemias mielocíticas agudas tales como leucemias mieloblástica, promielocítica, mielomonocítica, monocítica, eritroleucemia y síndrome mielodisplásico, leucemias crónicas tales como pero sin limitación, leucemia mielocítica crónica (granulocítica), leucemia linfocítica crónica, leucemia por tricoleucitos, policitemia vera, linfomas tales como pero sin limitación enfermedad de Hodgkin, enfermedad no de Hodgkin; mielomas múltiples tales como pero sin limitación mieloma múltiple ardiente, mieloma no secretor, mieloma osteosclerótico, leucemia de células plasmáticas, plasmacitoma solitario y plasmacitoma extramedular; macroglobulinemia de Waldenstrom, gammapatía monoclonal de significación indeterminada; gammapatía monoclonal benigna; enfermedad de cadena pesada; cáncer de hueso y sarcomas de tejido conectivo tales como pero sin limitación sarcoma de hueso, enfermedad de mieloma de hueso, mieloma múltiple, osteosarcoma de hueso inducido por colesteatoma, enfermedad de hueso de Paget, osteosarcoma, condrosarcoma, sarcoma de Ewing, tumor de células gigantes maligno, fibrosarcoma de hueso, cordoma, sarcoma periósteo, sarcoma de tejido blando, angiosarcoma (hemangiosarcoma), fibrosarcoma, sarcoma de Kaposi, leiomiomasarcoma, liposarcoma, linfangiosarcoma, neurilemmoma, rabdomiosarcoma y sarcoma sinovial; tumores cerebrales tales como, pero sin limitación, glioma, astrocitoma, glioma del tronco encefálico, ependimoma, oligodendroglioma, tumor no glial, neurinoma acústico, craneofaringioma, meduloblastoma, meningioma, pineocitoma, pineoblastoma y linfoma cerebral primario; cáncer de mama incluyendo pero sin limitación adenocarcinoma, carcinoma lobular (células pequeñas), carcinoma intraductal, cáncer de mama medular, cáncer de mama mucinoso, cáncer de mama tubular, cáncer de mama papilar, enfermedad de Paget (incluyendo enfermedad de Paget juvenil) y cáncer de mama inflamatorio; cáncer adrenal tal como pero sin limitación feocromocitoma y carcinoma adrenocortical; cáncer tiroideo tal como pero sin limitación cáncer tiroideo papilar o folicular, cáncer tiroideo medular y cáncer tiroideo anaplásico; cáncer pancreático tal como pero sin limitación, insulinoma, gastrinoma, glucagonoma, vipoma, tumor secretor de somatostatina y tumor carcinoide o de células de islotes; cáncer de hipófisis tal como pero sin limitación enfermedad de Cushing, tumor secretor de prolactina, acromegalia y diabetes insípida; cánceres oculares tales como pero sin limitación melanoma ocular tal como melanoma del iris, melanoma coroidal y melanoma de cuerpos ciliales y retinoblastoma; cánceres vaginales tales como carcinoma de células escamosas, adenocarcinoma y melanoma; cáncer vulvar tal como carcinoma de células escamosas, melanoma, adenocarcinoma, carcinoma de células basales, sarcoma y enfermedad de Paget; cánceres cervicales tales como pero sin limitación, carcinoma de células escamosas y adenocarcinoma; cánceres uterinos tales como pero sin limitación carcinoma endometrial y sarcoma uterino; cánceres de ovario tales como pero sin limitación, carcinoma epitelial ovárico, tumor límite, tumor de células germinales y tumor del estroma; cánceres esofágicos tales como pero sin limitación, cáncer escamoso, adenocarcinoma, carcinoma adenoide cístico, carcinoma mucoepidermoide, carcinoma adenoescamoso, sarcoma, melanoma, plasmacitoma, carcinoma verrugoso y carcinoma de células en granos de avena (células pequeñas); cánceres de estómago tales como pero sin limitación, adenocarcinoma, linfoma fungoso (polipoide), ulcerante, de dispersión superficial, de dispersión difusa, maligno, liposarcoma, fibrosarcoma y carcinosarcoma; cánceres de colon; cánceres rectales; cánceres de hígado tales como pero sin limitación carcinoma hepatocelular y hepatoblastoma, cánceres de vesícula biliar tales como adenocarcinoma, colangiocarcinomas tales como pero sin limitación papilar, nodular y difuso; cánceres de pulmón tales como cáncer de pulmón de células no pequeñas, carcinoma de células escamosas (carcinoma epidermoide), adenocarcinoma, carcinoma de células grandes y cáncer pulmonar de células pequeñas; cánceres testiculares tales como pero sin limitación tumor germinal, seminoma, carcinoma anaplásico, clásico (típico), espermatocítico, no seminoma, embrionario, carcinoma teratoma, coriocarcinoma (tumor del saco vitelino), cánceres de próstata tales como pero sin limitación, adenocarcinoma, leiomiomasarcoma, y rabdomiosarcoma; cánceres del pene; cánceres orales tales como pero sin limitación carcinoma de células escamosas; cánceres basales; cánceres de glándulas salivales tales como pero sin limitación adenocarcinoma, carcinoma mucoepidermoide y carcinoma adenoidecístico; cánceres de faringe tales como pero sin limitación cáncer de células escamosas y verrugoso; cánceres cutáneos tales como pero sin limitación, carcinoma de células basales, carcinoma de células escamosas y melanoma, melanoma de dispersión superficial, melanoma nodular, melanoma maligno de lentigo, melanoma lentiginoso acral; cánceres de riñón tales como pero sin limitación cáncer de células renales, adenocarcinoma, hipernefoma, fibrosarcoma, cáncer de células transicionales (pelvis renal y/o uréter); tumor de Wilms; cánceres de vejiga tales como pero sin limitación carcinoma de células transicionales, cáncer de células escamosas, adenocarcinoma, carcinosarcoma. Además, los cánceres

incluyen mixosarcoma, sarcoma osteogénico, endoteliosarcoma, linfangioendoteliosarcoma, mesotelioma, sinovioma, hemangioblastoma, carcinoma epitelial, cistadenocarcinoma, carcinoma broncogénico, carcinoma de glándulas sudoríparas, carcinoma de glándulas sebáceas, carcinoma papilar y adenocarcinomas papilares (para una revisión de dichos trastornos, véase Fishman *et al.*, 1985, Medicine, 2ª Ed., J. B. Lippincott Co., Filadelfia y Murphy *et al.*, 1997, Informed Decisions: The Complete Book of Cancer Diagnosis, Treatment, y Recovery, Viking Penguin, Penguin Books U.S.A., inc., Estados Unidos de América). También se contempla que los cánceres provocados por aberraciones en apoptosis también pueden tratarse por los métodos y composiciones. Dichos cánceres pueden incluir, pero sin limitación, linfomas foliculares, carcinomas con mutaciones de p53, tumores dependientes de hormonas de mama, próstata y ovario, y lesiones precancerosas tales como poliposis adenomatosa familiar y síndromes mielodisplásicos.

Las proteínas y composiciones que las comprenden son útiles para muchos fines, por ejemplo, como productos terapéuticos contra una amplia serie de enfermedades y trastornos crónicos y agudos incluyendo, pero sin limitación, enfermedades autoinmunitarias y/o inflamatorias. Las composiciones y métodos descritos en el presente documento son útiles para la prevención o tratamiento de trastornos autoinmunitarios y/o trastornos inflamatorios. Los ejemplos de trastornos autoinmunitarios y/o inflamatorios incluyen, pero sin limitación, alopecia areata, espondilitis anquilosante, síndrome antifosfolípídico, enfermedad de Addison autoinmunitaria, enfermedades autoinmunitarias de la glándula adrenal, anemia hemolítica autoinmunitaria, hepatitis autoinmunitaria, ooforitis autoinmunitaria y orquitis, síndrome de Sjogren, psoriasis, aterosclerosis, retinopatías diabéticas y otras, fibroplasia retrolental, degeneración macular relacionada con la edad, glaucoma neovascular, hemangiomas, hiperplasias tiroideas (incluyendo enfermedad de Graves), trasplante de tejido corneano y otros, e inflamación crónica, septicemia, artritis reumatoide, peritonitis, enfermedad de Crohn, lesión por reperfusión, septicemia, choque endotóxico, fibrosis quística, endocarditis, psoriasis, artritis (por ejemplo, artritis psoriásica), choque anafiláctico, isquemia de órgano, lesión por reperfusión, lesión de la médula espinal y rechazo de aloinjertos, trombocitopenia autoinmunitaria, enfermedad de Behcet, penfigoide ampolloso, cardiomiopatía, dermatitis de esprúe celíaco, síndrome de disfunción inmunitaria por fatiga crónica (CFIDS), polineuropatía desmielizante inflamatoria crónica, síndrome de Churg-Strauss, penfigoide cicatricial, síndrome de CREST, enfermedad de aglutinina fría, enfermedad de Crohn, lupus discoide, crioglobulinemia mixta esencial, fibromialgia-fibromiositis, glomerulonefritis, enfermedad de Graves, Guillain-Barre, tiroiditis de Hashimoto, fibrosis pulmonar idiopática, púrpura trombocitopénica idiopática (IPT), neuropatía de IgA, artritis juvenil, liquen plano, lupus eritematoso, enfermedad de Meniere, enfermedad de tejido conectivo mixto, esclerosis múltiple, diabetes mellitus de tipo 1 o inmuno-mediada, miastenia grave, pénfigo vulgar, anemia perniciosa, poliarteritis nodosa, policondritis, síndromes poliglandulares, polimialgia reumática, polimiositis y dermatomiositis, agammaglobulinemia primaria, cirrosis biliar primaria, psoriasis, artritis psoriásica, fenómeno de Raynaud, síndrome de Reiter, artritis reumatoide, sarcoidosis, esclerodermia, síndrome de Sjogren, síndrome de la persona rígida, lupus eritematoso sistémico, lupus eritematoso, arteritis de takayasu, arteritis temporal/arteritis de células gigantes, colitis ulcerosa, uveítis, vasculitis tales como vasculitis herpetiforme dermatítica, vitiligo y granulomatosis de Wegener. Los ejemplos de trastornos inflamatorios incluyen, pero sin limitación, asma, encefalitis, enfermedad inflamatoria del intestino, enfermedad pulmonar obstructiva crónica (EPOC), trastornos alérgicos, choque séptico, fibrosis pulmonar, espondiloartropatía indiferenciada, artropatía indiferenciada, artritis, osteólisis inflamatoria e inflamación crónica resultante de infecciones virales o bacterianas crónicas. Las composiciones y métodos pueden usarse con una o más terapias convencionales que se usan para prevenir, controlar o tratar las enfermedades anteriores.

Las proteínas y composiciones que las comprenden son útiles para muchos fines, por ejemplo, como productos terapéuticos contra una amplia serie de enfermedades y trastornos crónicos y agudos, incluyendo, pero sin limitación, enfermedad infecciosa, incluyendo enfermedades virales, bacterianas y fúngicas. Los ejemplos de patógenos virales incluyen pero sin limitación: adenoviridae (por ejemplo, mastadenovirus y aviadenovirus), herpesviridae (por ejemplo, virus del herpes simple 1, virus del herpes 2, virus del herpes 5, y virus del herpes 6), leviviridae (por ejemplo, levivirus, MS2 de fase enterobacteriana, aolevirus), poxviridae (por ejemplo, chordopoxvirinae, parapoxvirus, avipoxvirus, capripoxvirus, leporiipoxvirus, suipoxvirus, molluscipoxvirus, y entomopoxvirinae), papovaviridae (por ejemplo, polioma virus y papillomavirus), paramyxoviridae (por ejemplo, paramyxovirus, virus paragripal 1, morbillivirus (por ejemplo, virus del sarampión), rubulavirus (por ejemplo, virus de las paperas), pneumonovirinae (por ejemplo, pneumovirus, virus sincitial respiratorio humano), y metapneumovirus (por ejemplo, pneumovirus aviar y metapneumovirus humano)), picornaviridae (por ejemplo, enterovirus, rinovirus, hepatovirus (por ejemplo, virus de la hepatitis A humano), cardiovirus, y aphtovirus), reoviridae (por ejemplo, orthoreovirus, orbivirus, rotavirus, cypovirus, fijivirus, phytoreovirus, y oryzavirus), retroviridae (por ejemplo, retrovirus de tipo B de mamífero, retrovirus de tipo C de mamífero, retrovirus de tipo C aviar, grupo de retrovirus de tipo D, retrovirus BLV-HTLV, lentivirus (por ejemplo, virus de la inmunodeficiencia humana 1 y virus de la inmunodeficiencia humana 2), spumavirus), flaviviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis C), hepadnaviridae (por ejemplo, virus de la hepatitis B), togaviridae (por ejemplo, alphavirus (por ejemplo, virus sindbis) y rubivirus (por ejemplo, virus de la rubéola)), rhabdoviridae (por ejemplo, vesiculovirus, lyssavirus, ephemerovirus, cytorhabdovirus, y necleorhabdovirus), arenaviridae (por ejemplo, arenavirus, virus de la coriomeningitis linfocítica, virus lpp, y virus lassa), y coronaviridae (por ejemplo, coronavirus y torovirus). Los ejemplos de patógenos bacterianos incluyen pero sin limitación: la familia de *Aquaspirillum*, la familia de *Azospirillum*, la familia de *Azotobacteraceae*, la familia de *Bacteroidaceae*, especies de *Bartonella*, la familia de *Bdellovibrio*, especies de *Campylobacter*, especies de *Chlamydia* (por ejemplo, *Chlamydia pneumoniae*), *clostridium*, familia *Enterobacteriaceae* (por ejemplo, especies de

5 *Citrobacter*, *Edwardsiella*, *Enterobacter aerogenes*, especies de *Erwinia*, *Escherichia coli*, especies de *Hafnia*, especies de *Klebsiella*, especies de *Morganella*, *Proteus vulgaris*, *Providencia*, especies de *Salmonella*, *Serratia marcescens*, y *Shigella flexneri*), familia de *Gardinella*, *Haemophilus influenzae*, familia Halobacteriaceae, familia de *Helicobacter*, familia Legionellaceae, especies de *Listeria*, familia Methylococcaceae, micobacterias (por ejemplo, *Mycobacterium tuberculosis*), familia Neisseriaceae, familia de *Oceanospirillum*, familia Pasteurellaceae, especies de *Pneumococcus*, especies de *Pseudomonas*, familia Rhizobiaceae, familia de *Spirillum*, familia Spirosomaceae, *Staphylococcus* (por ejemplo, *Staphylococcus aureus* resistente a meticilina y *Staphylococcus pyrogenes*), *Streptococcus* (por ejemplo, *Streptococcus enteritidis*, *Streptococcus fasciae*, y *Streptococcus pneumoniae*), familia de *Vampirovibr Helicobacter*, y familia *Vampirovibrio*. Los ejemplos de patógenos fúngicos incluyen, pero sin limitación: especies de *Absidia* (por ejemplo, *Absidia corymbifera* y *Absidia ramosa*), especies de *Aspergillus*, (por ejemplo, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumigatus*, *Aspergillus nidulans*, *Aspergillus niger*, y *Aspergillus terreus*), *Basidiobolus ranarum*, *Blastomyces dermatitidis*, especies de *Candida* (por ejemplo, *Candida albicans*, *Candida glabrata*, *Candida kerr*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis*, *Candida pseudotropicalis*, *Candida quillermontii*, *Candida rugosa*, *Candida stellatoidea*, y *Candida tropicalis*), *Coccidioides immitis*, especies de *Conidiobolus*, *Cryptococcus neoforms*, especies de *Cunninghamella*, dermatofitos, *Histoplasma capsulatum*, *Microsporium gypseum*, *Mucor pusillus*, *Paracoccidioides brasiliensis*, *Pseudallescheria boydii*, *Rhinosporidium seeberi*, *Pneumocystis carinii*, especies de *Rhizopus* (por ejemplo, *Rhizopus arrhizus*, *Rhizopus oryzae*, y *Rhizopus microsporus*), especies de *Saccharomyces*, *Sporothrix schenckii*, cigomicetes y clases tales como *Zygomycetes*, *Ascomycetes*, los *Basidiomycetes*, *Deuteromycetes*, y *Oomycetes*.

20 Se describen métodos para prevenir, controlar, tratar o aliviar cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas o uno o más síntomas de las mismas, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que lo necesite una dosis de una cantidad profiláctica o terapéuticamente eficaz de uno o más armazones en combinación con cirugía, solo o en combinación adicional con la administración de una quimioterapia convencional o
 25 experimental, una terapia hormonal, una terapia/inmunoterapia biológica y/o una radioterapia. De acuerdo con estas realizaciones, los armazones utilizados para prevenir, controlar, tratar o aliviar el cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas o uno o más síntomas de los mismos, pueden conjugarse o fusionarse o no con un resto (por ejemplo, agente terapéutico o fármaco).

30 Se describen métodos para prevenir, controlar, tratar o aliviar cáncer, enfermedades autoinmunitarias, inflamatorias o infecciosas o uno o más síntomas de los mismos, comprendiendo dichos métodos administrar a un sujeto que lo necesite uno o más armazones en combinación con uno o más agentes terapéuticos que no son productos terapéuticos de cáncer (por ejemplo, terapias no de cáncer). Los ejemplos de dichos agentes incluyen, pero sin limitación, agentes anti-eméticos, agentes anti-fúngicos, agentes anti-bacterianos, tales como antibióticos, agentes
 35 anti-inflamatorios y agentes anti-virales. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-eméticos incluyen metopimazina y metoclopramida. Los ejemplos no limitantes de agentes antifúngicos incluyen fármacos de azol, imidazol, triazoles, polieno, anfotericina y ririmidina. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-bacterianos incluyen dactinomicina, bleomicina, eritromicina, penicilina, mitramicina, cefalosporina, imipenem, axtreonam, vancomicina, cicloserina, bacitracina, cloranfenicol, clindamicina, tetraciclina, estreptomina, tobramicina, gentamicina, amikacina, kanamicina, neomicina, espectinomina, trimetoprim, norfloxacin, refampina, polimixina, anfotericina B, nistatina, ketoconazol, isoniazida, metronidazol y pentamidina. Los ejemplos no limitantes de agentes antivirales incluyen análogos nucleosídicos (por ejemplo, zidovudina, aciclovir, gangciclovir, vidarbina, idoxuridina, trifluridina y ribavirina), foscaret, amantadina, rimantadina, saquinavir, indinavir, ritonavir, interferón ("IFN") - α , β o γ y AZT. Los ejemplos no limitantes de agentes anti-inflamatorios incluyen fármacos anti-inflamatorios no esteroideos ("AINE"), fármacos anti-inflamatorios esteroideos, beta-agonistas, agentes anti-colinérgicos y metilxantinas.
 45

50 Se describen composiciones capaces de inhibir un fenotipo de célula cancerosa. En una realización, el fenotipo de célula cancerosa es crecimiento celular, unión celular, pérdida de la unión celular, expresión de receptor reducida (tal como, por ejemplo, pero sin limitación receptores de Eph), expresión de receptor aumentada (tal como, por ejemplo, pero sin limitación receptores de Eph), potencial metastásico, inhibición del ciclo celular, activación/inhibición de tirosina quinasa receptora u otros.

55 Se describen composiciones capaces de tratar la inflamación crónica. En una realización, las composiciones son útiles en la dirección a células inmunitarias para destrucción o desactivación. En una realización, las composiciones son útiles en dirección a linfocitos T activados, linfocitos T durmientes, linfocitos B, neutrófilos, eosinófilos, basófilos, mastocitos o células dendríticas. Se describen composiciones capaces de reducir la función celular inmunitaria. En otra realización, las composiciones son capaces de anular la función celular inmunitaria.

60 Se describen composiciones capaces de inhibir o reducir la angiogénesis. En otra realización, la angiogénesis está relacionada con el crecimiento tumoral, artritis reumatoide, SLE, síndrome de Sjogren u otros.

65 Se describen composiciones útiles para el tratamiento de enfermedades del tracto gastrointestinal. Los armazones muestran un alto nivel de estabilidad en condiciones de pH bajo. La estabilidad a pH bajo sugiere que la composición será adecuada para administración oral para una diversidad de trastornos gastrointestinales, tales como síndrome del intestino irritable, reflujo gastroesofágico, pseudo obstrucciones intestinales, síndrome de vaciamiento rápido, náuseas intratables, úlcera péptica, apendicitis, colitis isquémica, colitis ulcerosa, gastritis,

enfermedad de *Helico pylori*, enfermedad de Crohn, enfermedad de Whipple, esprúe celíaco, diverticulitis, diverticulosis, disfagia, hernia de hiato, trastornos esofágicos por infecciones, hipo, mericismo y otros.

5 Se describen composiciones combinatorias y métodos para usar dichas composiciones en la prevención, tratamiento, reducción o alivio de enfermedades o síntomas de las mismas. Los armazones pueden combinarse con terapias convencionales adecuadas para la prevención, el tratamiento, la reducción o el alivio de la enfermedad o síntomas de la misma. Pueden encontrarse terapias convencionales ejemplares en el Physician's Desk Reference (56ª ed., 2002 y 57ª ed., 2003). En algunas realizaciones, pueden combinarse armazones con quimioterapia, radioterapia, cirugía, inmunoterapia con un producto biológico (anticuerpo o péptido), moléculas pequeñas, u otra
10 terapia conocida en la técnica. En algunas realizaciones, la terapia combinatoria se administra junta. En otras realizaciones, la terapia combinatoria se administra por separado.

15 Se describen métodos para diagnosticar enfermedades. Los armazones que se unen con una diana específica asociada con una enfermedad pueden implementarse en un método usado para diagnosticar dicha enfermedad. En una realización, los armazones se usan en un método para diagnosticar una enfermedad en un sujeto, comprendiendo dicho método obtener una muestra del sujeto, poner en contacto la diana con el armazón en dicha muestra en condiciones que permitan que se forme la interacción diana: armazón, identificar el complejo de diana: armazón y de este modo detectar la diana en la muestra. En algunas realizaciones, la diana es un antígeno asociado con la enfermedad. En otra realización, la diana es una citocina, mediador inflamatorio, y antígeno intracelular, un autoantígeno, un antígeno no propio, un antígeno intranuclear, un antígeno de superficie celular, un antígeno bacteriano, un antígeno viral o un antígeno fúngico. En otras realizaciones, la enfermedad para diagnosticar se describe en el presente documento.

25 También se describen métodos para detectar dianas específicas. En una realización, los armazones conjugados con agentes de detección tales como proteínas verdes fluorescentes, otras etiquetas fluorescentes (Cy3, Cy5, rodamina y otros), biotina o radionúclidos en métodos para detectar la presencia, localización o progresión de una diana específica. En algunas realizaciones, el método para detectar una diana que comprende un armazón se realiza *in vitro*. En otras realizaciones, el método para detectar una diana que comprende un armazón se realiza *in vivo*. En otras realizaciones, el método para detectar una diana que comprende un armazón se realiza por MRI, exploración de PET, rayos X, detección de fluorescencia o por otros métodos de detección conocidos en la técnica.

También se describen métodos para controlar la progresión de enfermedad, recaída, tratamiento, o alivio usando los armazones descritos en el presente documento. En una realización, se consiguen métodos de control de la progresión de enfermedad, recaída, tratamiento o alivio por los métodos de detección, diagnóstico o contacto de un compuesto/diana con un armazón como se presenta en el presente documento.

5.19 Kits

40 También se describen kits que comprenden las composiciones (por ejemplo armazones) desvelados en el presente documento e instrucciones para su uso. El kit puede contener además al menos un reactivo adicional, o uno o más armazones adicionales. Los kits típicamente incluyen un marcador que indica el uso pretendido de los contenidos del kit. El término marcador incluye cualquier material escrito, o registrado proporcionado en o con el kit, o que acompañe de otro modo al kit.

45 6. Secuencias

Bucles de tipo silvestre de Tn3 (primera realización):

50 AB (SEC ID N°: 201) = DVTDTT
BC (SEC ID N°: 202) = FKPLAEIDG
CD (SEC ID N°: 203) = KDVPGDR
DE (SEC ID N°: 204) = LTEDENQ
EF (SEC ID N°: 205) = GNLKPD
55 FG (SEC ID N°: 206) =RRGDMSSNPA

Cadenas beta de tipo silvestre de Tn3 (primera realización)

60 A (SEC ID N°: 228) = RLDAPSQIEVK
B (SEC ID N°: 229) = ALITW
C (SEC ID N°: 230) = IELTYGI
D (SEC ID N°: 231) = TTID
E (SEC ID N°: 232) = YSI
F (SEC ID N°: 233) = TEYEVSLIS
G (SEC ID N°: 234) = KETFTT

65 Bucles de tipo silvestre de Tn3 (segunda realización):

AB (SEC ID N°: 207) = KDVTDTT

BC (SEC ID N°: 202) = FKPLAEIDG
 CD (SEC ID N°: 203) = KDVPGDR
 DE (SEC ID N°: 208) = TEDENQ
 EF (SEC ID N°: 209) = GNLKPDTE
 5 FG (SEC ID N°: 206) =RRGDMSSNPA

Cadenas beta de tipo silvestre de Tn3 (segunda realización)

A (SEC ID N°: 235) =RLDAPSQIEV
 B (SEC ID N°: 229) = ALITW
 10 C (SEC ID N°: 230) = IELTYGI
 D (SEC ID N°: 236) = TTIDL
 E (SEC ID N°: 232) = YSI
 F (SEC ID N°: 237) = YEVSLLIS
 G (SEC ID N°: 234) = KETFTT
 15

Secuencias Proteicas

Las letras en mayúsculas corresponden al motivo estructural Tn3, mientras que las letras en minúsculas son apéndices de secuencias flanqueantes derivados del ADNc sintético y vector de expresión.

20 1P:
 SEC ID N°: 5
 aaLEVVAATPTSLLISWDAPA VTVRYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKP
 GVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTgggtlehhhhh

SEC ID N°: 6
 LEVVAATPTSLLISWDAPA VTVRYYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG
 25 VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT

2P:
 SEC ID N°: 7
 aaPTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPG
 VQYNITIYAVEENQESTPVVIQQETgggtlehhhhh

30 SEC ID N°: 8
 PTVDQVDDTSIVVRWSRPQAPITGYRIVYSPSVEGSSTELNLPETANSVTLSDLQPGV
 QYNITIYAVEENQESTPVVIQQET

35 3P:
 SEC ID N°: 9
 aaPYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYV
 YTIQVLRDQQRDAPIVNKVVTgggtlehhhhh

SEC ID N°: 10
 PYNTEVTETTIVITWTPAPRIGFKLGVRPSQGGEAPREVTSDSGSIVVSGLTPGVEYVY
 40 TIQVLRDQQRDAPIVNKVVT

4P:
 SEC ID N°: 11
 aaPPIALNWTLNLSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETKW
 KMMDPILTTSPVYSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLPgggtlehhhhh

45 SEC ID N°: 12
 PPIALNWTLNLSLTGIHADIQVRWEAPRNADIQKGWMVLEYELQYKEVNETKWK
 MMDPILTTSPVYSLKVDKEYEVRVRSKQRNSGNYGEFSEVLYVTLP

5P:
 SEC ID N°: 13

aaPPSLNVTKDGDYSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHS
MALPALEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTEgggglehthhhh

SEC ID N°: 14

PPSLNVTKDGDYSYSLRWETMKMRYEHIDHTFEIQYRKDTATWKDSKTETLQNAHSM
ALPALEPSTRYWARVRVRTSRTGYNGIWSEWSEARSWDTE

5

6P:

SEC ID N°: 15

aaPPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKIV
TILHKGFSASVRTILQNDHSSLASSWASAELHAgggglehthhhh

10

SEC ID N°: 16

PPVNFTIKVTGLAQVLLQWKPNPDQEQRNVNLEYQVKINAPKEDDYETRITESKIVTI
LHKGFSASVRTILQNDHSSLASSWASAELHA

7P:

SEC ID N°: 17

aaLSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPTLEPHPRPLLQRELMVPGTRHS
AVLRDLRSGTLYSLTLYGLRGPHKADSIQGTARTgggglehthhhh

15

SEC ID N°: 18

LSVTDVTTSSLRLNWEAPPGAFDSFLLRFGVPSPTLEPHPRPLLQRELMVPGTRHSA
VLRDLRSGTLYSLTLYGLRGPHKADSIQGTART

20

8P:

SEC ID N°: 19

aaLRALNLTEGFAVLHWKPPQNPVDTYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVL
HTNYTATVRGLRGPNTSPASITFTTgggglehthhhh

25

SEC ID N°: 20

LRALNLTEGFAVLHWKPPQNPVDTYDIQVTAPGAPPLQAETPGSAVDYPLHDLVLHT
NYTATVRGLRGPNTSPASITFTT

30

9P:

SEC ID N°: 21

aaLEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTS
YNARLQAMWGQSLLPPVSTSFTTgggglehthhhh

35

SEC ID N°: 22

LEAKEVTPRTALLTWTEPPVRPAGYLLSFHTPGGQTQEILLPGGITSHQLLGLFPSTSY
NARLQAMWGQSLLPPVSTSFTT

40

10P:

SEC ID N°: 23

aaIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGRRTTIDLTE DENQYSIGNLKPD
TEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTTgggglehthhhh

45

SEC ID N°: 24

IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGRRTTIDLTE DENQYSIGNLKPD
EYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT

50

11P:

SEC ID N°: 25

aaPKFTKCRSPERETF SCHWTDDEVHHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEW TQEWKECPDYV
SAGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLT SNGGTVDEKCF SVggggleh hhhhh

SEC ID Nº: 26

PKFTKCRSPERETF SCHWTDDEVHHGTKNLGPIQLFYTRRNTQEW TQEWKECPDYVS
AGENSCYFNSSFTSIWIPYCIKLT SNGGTVDEKCF SV

5

12P:

SEC ID Nº: 27

aaPSGFPQNLHVTGLTTSTTE LAWDPPVLAERNGR IISYTVVFRDINSQQELQNIT TDT
RFTLTGLKPD TTYDIKVRAW TSKGSGPLSPSIQ SRTMPVEggggleh hhhhh

10

SEC ID Nº: 28

PSGFPQNLHVTGLTTSTTE LAWDPPVLAERNGR IISYTVVFRDINSQQELQNIT TDT
RFTLTGLKPD TTYDIKVRAW TSKGSGPLSPSIQ SRTMPVE

13P:

SEC ID Nº: 29

aaPKPPIDL VVTETTAT SVTLTWDSGNSEPV TYYGIQYRAAGTEGPFQE VDGVA TTRY
SIGGLSPFSEYAFR VLA VNSIGR GPPSEAVRARTGEQA gggleh hhhhh

15

SEC ID Nº: 30

PKPPIDL VVTETTAT SVTLTWDSGNSEPV TYYGIQYRAAGTEGPFQE VDGVA TTRY
SIGGLSPFSEYAFR VLA VNSIGR GPPSEAVRARTGE

20

14P:

SEC ID Nº: 31

aaLSPPRNL RISNVGSNSARL TWDP T SRQINGYRIVYNNADGTEINEVE VDPITTFPLKG
LTPLTEY TIAIFSIYDEGQSEPLTG VFTTggggleh hhhhh

SEC ID Nº: 32

LSPPRNL RISNVGSNSARL TWDP T SRQINGYRIVYNNADGTEINEVE VDPITTFPLKGL
TPLTEY TIAIFSIYDEGQSEPLTG VFTT

25

Secuencias de ADN

Las letras en mayúsculas corresponden al motivo estructural Tn3, mientras que las letras en minúsculas son apéndices de secuencias flanqueantes.

30

1D:

SEC ID Nº: 33

gcatggccgccCTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGG
ATGCGCCGGCGGTGACCGTGCGCTATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGG
CAATAGCCCGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGGCAGCAAAGCACCGCGACCAT
TAGCGGCCTGAAACCGGGCGTGGATTATACCATTACCGTGTATGCGGTGACCGGC
CGTGGCGATAGCCCGGCGAGCAGCAAACCGATTAGCATTAACTATCGTACCggtgg
cgtacc

35

SEC ID Nº: 34

CTGGAAGTGGTGGCGGCGACCCCGACCAGCCTGCTGATTAGCTGGGATGCGCCG
GCGGTGACCGTGCGCTATTATCGTATTACCTATGGCGAAACCGGCGGCAATAGCC
CGGTGCAGGAATTTACCGTGCCGGGCAGCAAAGCACCGCGACCATAGCGGCC
TGAAACCGGGCGTGGATTATACCATTACCGTGTATGCGGTGACCGGCCGTGGCG
ATAGCCCGGCGAGCAGCAAACCGATTAGCATTAACTATCGTACC

2D:

SEC ID N°: 35

gcatggccgcccCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGCCTGGA
GCCGTCCGCAGGCGCCGATTACCGGCTATCGTATTGTGTATAGCCCAGCGTGGA
AGGCAGCAGCACCGAACTGAACCTGCCGAAACCGCGAATAGCGTGACCCTGAG
CGATCTGCAGCCGGGCGTGCAGTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAA
CCAGGAAAGCACCCCGGTGGTGATTCAGCAGGAAACCggtggcggtacc

5

SEC ID N°: 36

CCGACCGTGGATCAGGTGGATGATACCAGCATTGTGGTGCCTGGAGCCGTCCG
CAGGCGCCGATTACCGGCTATCGTATTGTGTATAGCCCAGCGTGGAAGGCAGC
AGCACCGAACTGAACCTGCCGAAACCGCGAATAGCGTGACCCTGAGCGATCTG
CAGCCGGGCGTGCAGTATAACATTACCATTTATGCGGTGGAAGAAAACCAGGAA
AGCACCCCGGTGGTGATTCAGCAGGAAACC

3D:

SEC ID N°: 37

gcatggccgcccCGTATAACACCGAAGTGACCGAAACCACCATTGTGATTACCTGGAC
CCCGGCGCCGCGTATTGGCTTTAACTGGGCGTGCCTCCGAGCCAGGGCGGTGA
AGCGCCGCGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAGCATTGTGGTGAAGCGCCTGAC
CCCGGCGTGGAAATATGTGTATACCATTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGT
GATGCGCCGATTGTGAACAAAGTGGTGACCggtggcggtacc

10

SEC ID N°: 38

CGTATAACACCGAAGTGACCGAAACCACCATTGTGATTACCTGGACCCCGGCG
CCGCGTATTGGCTTTAACTGGGCGTGCCTCCGAGCCAGGGCGGTGAAGCGCCG
CGCGAAGTGACCAGCGATAGCGGCAGCATTGTGGTGAAGCGCCTGACCCCGGGC
GTGGAATATGTGTATACCATTCAGGTGCTGCGTGATGGCCAGGAACGTGATGCGC
CGATTGTGAACAAAGTGGTGACC

15

4D:

SEC ID N°: 39

gcatggccgcccCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGG
TATTCATGCCGATATTCAGGTGCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAG
AAAGGCTGGATGGTGTGGAATATGAACTGCAGTATAAAGAAGTGAATGAAACC
AAATGGAAAATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTG
AAAGTGGATAAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAACAGCGTAATAGCGGC
AATTATGGTGAATTTAGTGAAGTCCTGTATGTTACCCTGCCggtggcggtacc

20

SEC ID N°: 40

CCGCCGATCGCTCTGAATTGGACCCTGCTGAATGTTTCGCTGACCGGTATTCATG
CCGATATTCAGGTGCGTTGGGAAGCGCCGCGTAACGCCGATATTCAGAAAGGCT
GGATGGTGTGGAATATGAACTGCAGTATAAAGAAGTGAATGAAACCAAATGGA
AAATGATGGACCCGATTCTGACCACCAGCGTGCCGGTGTACAGCCTGAAAGTGG
ATAAAGAATACGAAGTCCGTGTGCGTTCTAACAGCGTAATAGCGGCAATTATG
GTGAATTTAGTGAAGTCCTGTATGTTACCCTGCC

5D:

SEC ID N°: 41

gccatggccgccCCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCITGC
GCTGGGAAACCATGAAAATGCGCTATGAACATATTGATCATAACCTTTGAAATTCA
GTATCGCAAAGATACCGCGACCTGGAAAGATAGCAAACCGAAACCCTGCAGAA
CGCGCATAGCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCGCG
TGTGCGTGTGCGTACCAGCCGTACCGGCTATAATGGCATTGGAGCGAATGGAGC
GAAGCGCGTAGCTGGGATACCGAAggtggcggtacc

CCGCCGAGCCTGAACGTGACCAAAGATGGCGATAGCTATAGCCTGCGCTGGGAA
ACCATGAAAATGCGCTATGAACATATTGATCATAACCTTTGAAATTCAGTATCGCA
AAGATACCGCGACCTGGAAAGATAGCAAACCGAAACCCTGCAGAACGCGCATA
GCATGGCGCTGCCGGCGCTGGAACCGAGCACCCGTTATTGGGCGCGTGTGCGTGT
GCGTACCAGCCGTACCGGCTATAATGGCATTGGAGCGAATGGAGCGAAGCGCG
TAGCTGGGATACCGAA

5

6D:

SEC ID N°: 42

gccatggccgccCCGCCGGTGAAC TTTACCATTA AAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCT
GCTGCAGTGGAACCGAACCCGGATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATA
TCAGGTGAAAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGATTATGAAACCCGCATTACCGA
AAGCAAAC TGGTGACCATTTCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATT
CTGCAGAACGATCATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGGAACTGCAT
GCGggtggcggtacc

10

SEC ID N°: 43

CCGCCGGTGAAC TTTACCATTA AAGTGACCGGCCTGGCGCAGGTGCTGCTGCAGT
GGAAACCGAACCCGGATCAGGAACAGCGTAACGTGAACCTGGAATATCAGGTGA
AAATTAACGCGCCGAAAGAAGATGATTATGAAACCCGCATTACCGAAAGCAAAC
TGGTGACCATTTCTGCATAAAGGCTTTAGCGCGAGCGTGCGTACCATTCTGCAGAA
CGATCATAGCCTGCTGGCGAGCAGCTGGGCGAGCGCGGAACTGCATGCG

7D:

15 SEC ID N°: 44

gccatggccgccCTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGG
AAGCGCCGCGGGCGCGTTTGATAGCTTTCTGCTGCGTTTTGGCGTGCCGAGCCC
GAGCACCTGGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCTGCAGCGTGAAC T GATGGTGCC
GGGACCCGT CATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCTGTATAGC
CTGACCCTGTATGGCCTGCGTGGCCCGCATAAAGCGGATAGCATT CAGGGCACC
GCGCGTACCggtggcggtacc

SEC ID N°: 45

CTGAGCGTGACCGATGTGACCACCAGCAGCCTGCGTCTGAACTGGGAAGCGCCG
CCGGGCGCGTTTGATAGCTTTCTGCTGCGTTTTGGCGTGCCGAGCCCGAGCACCC
TGGAACCGCATCCGCGTCCGCTGCTGCAGCGTGAAC T GATGGTGCCGGGCACCC
GTCATAGCGCGGTGCTGCGTGATCTGCGTAGCGGCACCCTGTATAGCCTGACCCT
GTATGGCCTGCGTGGCCCGCATAAAGCGGATAGCATT CAGGGCACCGCGCGTAC
C

20

8D:

SEC ID Nº: 46

gccatggccgccCTGCGCGCGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAA
ACCGCCGCAGAACCCGGTGGATACCTATGATATTCAGGTGACCGCGCCGGGCGC
GCCGCCGCTGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGCGGTGGATTATCCGCTGCATGA
TCTGGTGCTGCATACCAACTATAACCGCGACCGTGCGTGCCCTGCGCGGCCCGAAT
CTGACCAGCCCGGCGAGCATTACCTTTACCACCggtggcgtacc

5 SEC ID Nº: 47

CTGCGCGCGCTGAACCTGACCGAAGGCTTTGCGGTGCTGCATTGGAAACCGCCGC
AGAACCCGGTGGATACCTATGATATTCAGGTGACCGCGCCGGGCGCGCCGGCCGC
TGCAGGCGGAAACCCCGGGCAGCGCGGTGGATTATCCGCTGCATGATCTGGTGC
TGCATACCAACTATAACCGCGACCGTGCGTGCCCTGCGCGGCCCGAATCTGACCAG
CCCGGCGAGCATTACCTTTACCACC

9D:

SEC ID Nº: 48

gccatggccgccCTGGAAGCGAAAGAAGTGACCCCGCGTACCGCGCTGCTGACCTGGA
CCGAACCGCCGGTGCGCCCGGCGGGTTATCTGCTGAGCTTTCATACCCCGGGCGG
CCAGACCCAGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCATTACCAGCCATCAGCTGCTGGG
CCTGTTCCGAGCACCAGCTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAG
CCTGCTGCCCGCGGTGAGCACCAGCTTTACCACCggtggcgtacc

10

SEC ID Nº: 49

CTGGAAGCGAAAGAAGTGACCCCGCGTACCGCGCTGCTGACCTGGACCGAACCG
CCGGTGCGCCCGGCGGGTTATCTGCTGAGCTTTCATACCCCGGGCGGCCAGACCC
AGGAAATTCTGCTGCCGGGCGGCATTACCAGCCATCAGCTGCTGGGCCTGTTTCC
GAGCACCAGCTATAACGCGCGTCTGCAGGCGATGTGGGGCCAGAGCCTGCTGCC
GCCGGTGCAGCACCAGCTTTACCACC

15 10D:

SEC ID Nº: 50

gccatggccgccATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGGTT
TAAACCGCTGGCGGAAATTGATGGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGT
GCCGGGCGATCGCACCACCATTGATCTGACCGAAGATGAAAACCAGTATAGCAT
TGGCAACCTGAAACCGGATAACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGG
CGATATGAGCAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACCggtggcgtacc

SEC ID Nº: 51

ATTGAAGTGAAAGATGTGACCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGC
TGGCGGAAATTGATGGCATTGAACTGACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCG
ATCGCACCACCATTGATCTGACCGAAGATGAAAACCAGTATAGCATTGGCAACC
TGAAACCGGATAACCGAATATGAAGTGAGCCTGATTAGCCGTCGTGGCGATATGA
GCAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC

20

11D:

SEC ID Nº: 52

gccatggccgccCCGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTG
CCATTGGACCGATGAAGTTCATCATGGCACCAAAAATCTGGGCCCGATTTCAGCTG
TTTTATACCCGCCGTAATACCCAGGAATGGACCCAGGAATGGAAAGAATGCCCG
GATTATGTTAGCGCGGGCGAAAACAGCTGCTATTTAACAGCAGCTTTACCAGCA
TTTGGATTCCGTATTGCATTA AACTGACCAGCAACGGTGGCACCGTTGATGAAAA
ATGCTTTAGCGTGggtggcggtacc

SEC ID N°: 53

CCGAAATTTACCAAATGCCGTAGCCCGGAACGCGAAACCTTTAGCTGCCATTGGA
CCGATGAAGTTCATCATGGCACCAAAAATCTGGGCCCGATTTCAGCTGTTTTATAC
CCGCCGTAATACCCAGGAATGGACCCAGGAATGGAAAGAATGCCCGGATTATGT
TAGCGCGGGCGAAAACAGCTGCTATTTAACAGCAGCTTTACCAGCATTGGATT
CCGTATTGCATTA AACTGACCAGCAACGGTGGCACCGTTGATGAAAAATGCTTTA
GCGTG

5

12D:

SEC ID N°: 54

gccatggcagccCCGTCTGGTTTTCCGCAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAG
CACCACCGAACTGGCGTGGGATCCGCCGGTGTGGCGGAACGCAACGGCCGTAT
TATTAGCTATACCGTGGTGTTCGTGATATTAACAGCCAGCAGGA ACTGCAGAAC
ATTACCACCGATAACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACCTATG
ATATTAAGTGC GCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCGAGCA
TTCAGAGCCGCACCATGCCGGTGGAAggtggcggtacc

10

SEC ID N°: 55

CCGTCTGGTTTTCCGCAGAATCTGCATGTGACCGGCCTGACCACCAGCACCACCG
AACTGGCGTGGGATCCGCCGGTGTGGCGGAACGCAACGGCCGTATTATTAGCT
ATACCGTGGTGTTCGTGATATTAACAGCCAGCAGGA ACTGCAGAACATTACCAC
CGATAACCCGCTTTACCCTGACCGGTCTGAAACCGGATACCACCTATGATATTA
GTGCGCGCCTGGACCAGCAAAGGCAGCGGCCCGCTGAGCCCGAGCATTTCAGAGC
CGCACCATGCCGGTGGAA

13D:

SEC ID N°: 56

gccatggccgccCCGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACCACCGCGACCA
GCGTGACCCTGACCTGGGATAGCGGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTA
TTCAGTATCGCGCGGCGGGCACCGAAGGTCCGTTTCAGGAAGTGGATGGCGTGG
CGACCACCCGTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTTAGCGAATATGCGTTTCG
CGTGCTGGCGGTTAATAGCATTGGCCGCGGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGC
GCGCACCGGCGAACAGGCGggtggcggtacc

SEC ID N°: 57

CCGAAACCGCCGATTGATCTGGTGGTTACCGAAACCACCGCGACCAGCGTGACC
CTGACCTGGGATAGCGGCAATAGCGAACCGGTGACCTATTATGGTATTTCAGTATC
GCGCGGCGGGCACCGAAGGTCCGTTTCAGGAAGTGGATGGCGTGGCGACCACCC
GTTATAGCATTGGCGGTCTGAGCCCGTTTAGCGAATATGCGTTTCGCGTGCTGGC
GGTTAATAGCATTGGCCGCGGTCCGCCGAGCGAAGCGGTGCGTGCGCGCACCGG
CGAACAGGCG

20

14D:

SEC ID N°: 58

gccatgccgccCTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATA
 GCGCGCGCCTGACCTGGGATCCGACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGT
 GTATAACAACGCCGATGGCACCCGAAATTAACGAAGTGGAAGTGGATCCGATTAC
 CACCTTTCCGCTGAAAGGCCTGACCCCGCTGACCGAATATAACCATTGCGATTTTT
 AGCATTTATGATGAAGGTCAGAGCGAACCCGCTGACCGGTGTGTTTACCACCggtggc
 ggtacc

SEC ID Nº: 59

CTGAGCCCGCCGCGTAACCTGCGCATTAGCAACGTGGGTAGCAATAGCGCGCGC
 CTGACCTGGGATCCGACCAGCCGCCAGATTAATGGCTATCGCATTGTGTATAACA
 ACGCCGATGGCACCCGAAATTAACGAAGTGGAAGTGGATCCGATTACCACCTTTC
 CGCTGAAAGGCCTGACCCCGCTGACCGAATATAACCATTGCGATTTTTAGCATTTA
 TGATGAAGGTCAGAGCGAACCCGCTGACCGGTGTGTTTACCACC

5

Dominio Tn3 de tipo silvestre SEC ID Nº: 1

RLDAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSI
 GNLKPDTEYEVS LISRRGDMSSNPAKETFTT

10 Secuencia proteica del armazón de Tn3 de Tenascina

SEC ID Nº: 60

AAIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLKP
 DTEYEVS LISRRGDMSSNPAKETFTTGGGTLEHHHHHH

SEC ID Nº: 61

IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLKPDT
 EYEVS LISRRGDMSSNPAKETFTT

15

Variante de Tn3 de unión a Synagis SynBPOI

Secuencia Proteica

SEC ID Nº: 62

AAIEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLK
 PDTEYEVS LISVTEFGRRRSKETFTTGGGTLEHHHHHH

20

SEC ID Nº: 63

IEVKDVTDTTALITWSPPSVLVGYTIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNLKP
 TEYEVS LISVTEFGRRRSKETFTT

25 Tn3s estabilizados por disulfuro (SS1-4):

SEC ID Nº: 64

(SS1):IECKDVTDTTALCTWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNL
 KPDTEYEVS LISRRGDMSSNPAKETFTT

SEC ID Nº: 210

(SS2):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTCDLTGEDEGNQCSIG
 NLKPDTEYEVS LISRRGDMSSNPAKETFTT

30

SEC ID Nº: 65

(SS3):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNL
 KPDTEYCVS LISRRGDMSSNPAKECF TT

35 SEC ID Nº: 66

(SS4):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIGNL
 KPDTEYEVS LICRRGDMSSNPAKETFTT

SEC ID Nº: 67

**(SS3+4):IEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGCELTYGIKDVPGDRTTIDLTE DENQYSIG
NLKPDTEYCVSLICRRGDMSSNPAKECFTT**

5 Armazones identificados de Archea

Archaeoglobus fulgidus DSM 4304
Referencia NCBI: NC_000917
Secuencia proteica:

10

SEC ID Nº: 68

**PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLFSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLS
GLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSIMSFTT**

15

Staphylothermus marinus F1
Referencia NCBI: NC_009033
Secuencia proteica:

Sec ID Nº: 2

**SEPQNLKATAGNNNITLTWDPPIDDGGCRIVEYRIYRGTNNNNLEYYSVNGSTTTFI
DKNIVYSQTYYYKVS AVNNIVEGPKSNTASATPTSS**

20

Sulfolobus acidocaldarius DSM 639
Referencia NCBI: NC_007181
Secuencias proteicas:

25 1^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 69

**PPPKPVIRFAQAGNNSISLSWYDTNTSGYYIQWSSIDNNKSTINVG NVSSYLFINLTN
GVTYYFRIIPYNQAGNGTSSDIISLTPGAV**

2^o Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 70

**PDSPSVKVIVGDRNATVIWSKPYNGGFPILGYLLTVKTDNSSYTINVG NVSKYTLTNL
TPEVLYEVMVVA YNKLGNSSPGIVNFVALTT**

30

3^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 71

**LTTASISVSVYKKVNGVLISWNKTENTTYNLLISDKKGGKIIVNITTTNTSYFAYIPYGIY
NVTIRATNQVGTNSTSFPIVFIYIPFI**

4^o Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 72

**PLVKFSIGNNSILNLKWNNTGATFYLVYVNTTLIANVTTDSYSLNLT PGFHVIRVVA
ANPIYNSSPASLGILIQH SVTSSIT**

35

Sulfolobus solfataricus P2
Referencia NCBI: NC_002754
Secuencias proteicas:

40

1^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 73

**PLPPKITSYSAGNESVTLGWNVPVRLSSGYEIIYWN NMGFNSSINVG NVTSYTVTGLKD
GITYYFEVLAYNSIGYSSPSSIIALTPASV**

2^o Motivo estructural Tn3, SEC ID Nº: 74

**PNPPQLVSVKYGNDNVTNLNWL PPTFSGGYLLGYVIVKNENSMVSSH FVNSTSLTI
SNLTPNVTYNVFIYAVNKLGNSSPLVLT VVPITKA**

45

3^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 75

**PITKASVFAFITKLGNGILVNWTTSPANITLLELYNPNGNLISQIAAIKGNSSYLFRVPQ
GNYTLVIIASNSAGVSKYVYQVYYL**

4^o Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 76

**PPASPQVSLIGFGNNLYISWNNEANVITYLVYVNNSLVYEGPSNSIVTNISNGTYLVK
VIGVNPAGSSSPGIAVIHYTGDYVT**

Sulfolobus tokodaii str. 7
Referencia NCBI: NC_003106
Secuencias proteicas:

1^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 3

**PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKDG
VTTYIOTVPYNSLGNGTSPSDIISATPSSV**

2^o Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 4

**PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAGE
LYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKA**

3^{er} Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 77

**ASKANLTVTVYK KINGFLVSWNSTSKAKYILTVSKENVLLNVSTTNTSYFVKVPFG
VYNISLEAVNIVGITKYAFILIYYIQ**

4^o Motivo estructural Tn3, SEC ID N°: 78

**PASPTVNWSITLNTVSLNWSKVSGAEYYLIYDNGKLITNTTNTAFTFNLTIGQNEIEV
YAANAYYKSAPYIINDVRNYIVV**

Secuencias proteicas del Ejemplo 5

Las letras en mayúsculas corresponden al motivo estructural Tn3, mientras que las letras en minúsculas son apéndices de secuencias flanqueantes derivados del ADNc sintético y vector de expresión.

>*Archaeoglobus*

SEC ID N°: 79

**aaPAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMIT
LSGLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSSIMSFTTgggtlehhhhh**

SEC ID N°: 80

**PAISNVRVSDVTNSSATIRWDVSLAANNRVLSTNSDLSSPQWSAWDNSTDSPMITLS
GLSAGTAYYFSVYSFRPDNASLYSNSSIMSFTT**

>*Staphylothermus marinus*

SEC ID N°: 81

**aaSEPQNLKATAGNNNITLTWDPPIIDDGGCRIVEYRIYRGTNNNNLEYYASVNGSTTI
FIDKNIVYSQTYYYKVS AVNNIVEGPKSNTASATPTSSgggtlehhhhh**

SEC ID N°: 82

**SEPQNLKATAGNNNITLTWDPPIIDDGGCRIVEYRIYRGTNNNNLEYYASVNGSTTTFI
DKNIVYSQTYYYKVS AVNNIVEGPKSNTASATPTSS**

>*Sulfolobus solfataricus*

SEC ID N°: 83

**aaPLPPKITSYSAGNESVTLGWNPVRLSSGYEIIYWNNMGFNSSINVGNVTSYTVTGL
KDGITYYFEVLAYNSIGYSSPSSIIALTPASVgggtlehhhhh**

SEC ID Nº: 84

PLPPKITSYSAGNESVTLGWNVPVRLSSGYEIIYWNNMGFNSSINVGNVTSYTVTGLKD
GITYYFEVLA YNSIGYSSPSSIIALTPASV

>*Sulfolobus tokodaii_1*

5 SEC ID Nº: 85

aaPPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKD
GVTYYIQIVPYNSLGNNGTPSDIISATPSSVgggtlehhhhh

SEC ID Nº: 86

PPKPQIASIASGNETITVKWYDTNASGYIITYWSNFSQKVTINVGNVTSYTIKHLKDG
VTYYIQIVPYNSLGNNGTPSDIISATPSSV

10

>*Sulfolobus tokodaii_2*

SEC ID Nº: 87

aaPNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAG
ELYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKAgggtlehhhhh

15

SEC ID Nº: 88

PNPPIIKVKIGNLNATLTWYDTFNGGYPIEGYYLYVNGKGINVGNITSYVLTNLTAGE
LYTIELIAYNKIGNSSISSVSFIAASKA

Secuencias de ADNc

20

>*Archaeoglobus*

SEC ID Nº: 89

gccatggcagccCCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCG
CCACCATTCGTTGGGATGTGAGCCTGGCGGCGAATAATCGCGTGCTGTTTAGCAC
CAACAGCGATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGCGCGTGGGATAACAGCACCGATAG
CCCGATGATTACCCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTAGCGTG
TATAGCTTTCGTCCGGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCT
TTACCACCggtggcggtacc

25

SEC ID Nº: 90

CCGGCGATTAGCAATGTGCGCGTTAGCGATGTGACCAACAGCAGCGCCACCATT
CGTTGGGATGTGAGCCTGGCGGCGAATAATCGCGTGCTGTTTAGCACCAACAGC
GATCTGAGCAGCCCGCAGTGGAGCGCGTGGGATAACAGCACCGATAGCCCGATG
ATTACCCTGAGCGGTCTGAGCGCGGGCACCGCGTATTATTTAGCGTGTATAGCT
TTCGTCCGGATAATGCGAGCCTGTATAGCAACAGCAGCATTATGAGCTTTACCAC
C

>*Staphylothermus*

SEC ID Nº: 91

gccatggccgccAGCGAACCGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTA
CCCTGACCTGGGATCCGCCGATTGATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCG
TATTTATCGTGGCACCAATAATAACAACCTGGAATATTATGCGAGCGTTAACGGC
AGCACCACCACCTTTATTGATAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTATTATA
AAGTGAGCGCGGTGAACAATATTGTGGAAGGCCCGAAAAGCAACACCGCGAGC
GCGACCCCGACCAGCAGCggtggcggtacc

30

SEC ID N°: 92

AGCGAACCGCAGAACCTGAAAGCGACCGCGGGTAATAACAATATTACCCTGACC
 TGGGATCCGCCGATTGATGATGGTGGCTGCCGCATTGTGGAATATCGTATTTATC
 GTGGCACCAATAATAACAACCTGGAATATTATGCGAGCGTTAACGGCAGCACCA
 CCACCTTTATTGATAAAAATATTGTGTATAGCCAGACCTATTATTATAAAGTGAG
 CGCGGTGAACAATATTGTGGAAGGCCCGAAAAGCAACACCGCGAGCGCGACCCC
 GACCAGCAGC

>*S. solfataricus_1*

5 SEC ID N°: 93

gcatggccgccCCGCTCCCACCGAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCG
 TGACCCTGGGCTGGAACCCGGTGCCTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTG
 GAACAATATGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGTGGGTAATGTGACCAGCTATACC
 GTGACCGGCCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTGAAGTGCTGGCCTATAACA
 GCATTGGTTATAGCAGCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGGCGAGCGTGggt
 ggcgtacc

SEC ID N°: 94

CCGCTCCCACCGAAAATTACCAGCTATAGCGCGGGCAACGAAAGCGTGACCCTG
 GGCTGGAACCCGGTGCCTCTGAGCAGCGGCTATGAAATTATTTATTGGAACAATA
 TGGGCTTTAACAGCAGCATTAAATGTGGGTAATGTGACCAGCTATACCGTGACCGG
 CCTGAAAGATGGCATTACCTATTATTTGAAGTGCTGGCCTATAACAGCATTGGT
 TATAGCAGCCCGAGCAGCATTATCGCGCTGACCCCGGCGAGCGTG

10 >*S. tokodaii_1*

SEC ID N°: 95

gcatggccgccCCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCA
 TTACCGTGAAATGGTATGATACCAATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAG
 CAATTTTAGCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGGTAACGTGACCAGCTATACCATT
 AAACATCTGAAAGATGGCGTGACCTATTATATTCAGATTGTGCCGTATAACAGCC
 TGGGCAATGGCACCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTTggtggcg
 gtacc

15 SEC ID N°: 96

CCGCCGAAACCGCAGATTGCCAGCATTGCCAGCGGTAATGAAACCATTACCGTG
 AAATGGTATGATACCAATGCGAGCGGCTATTATATTACCTATTGGAGCAATTTA
 GCCAGAAAGTGACCATTAATGTGGGTAACGTGACCAGCTATACCATTAAACATCT
 GAAAGATGGCGTGACCTATTATATTCAGATTGTGCCGTATAACAGCCTGGGCAAT
 GGCACCCCGAGCGATATTATTAGCGCGACCCCGAGCAGCGTT

20 >*S. tokodaii_2*

SEC ID N°: 97

gcatggccgccCCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAATTGGCAATCTGAATGCGAC
 CCTGACCTGGTATGATACCTTTAATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGT
 ATGTGAACGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAACATTACCAGCTATGTGCTGACCA
 ATCTGACCGCCGGTGAAGTGTATACCATTTGAAGTATTGCGTATAACAAAATCGG
 CAACAGCAGCATTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCGggtggcggtacc

SEC ID Nº: 98

CCGAATCCGCCGATTATTAAGTGAAAATTGGCAATCTGAATGCGACCCTGACCT
GGTATGATACCTTTAATGGTGGTTATCCGATTGAAGGCTATTATCTGTATGTGAA
CGGTAAAGGTATTAACGTGGGCAACATTACCAGCTATGTGCTGACCAATCTGACC
GCCGGTGAAGTGTATACCATTGAACTGATTGCGTATAACAAAATCGGCAACAGC
AGCATTAGCAGCGTGAGCTTTATTGCGGCGAGCAAAGCG

Secuencia de Vector

5 SEC ID Nº: 99

GACGAAAGGGCCTCGTGATACGCCTATTTTTATAGGTTAATGTCATGATAATAAT
GGTTTCTTAGACGTCAGGTGGCACCTTTTCGGGGAAATGTGCGCGGAACCCCTATT
TGTTTATTTTTCTAAATACATTCAAATATGTATCCGCTCATGAGACAATAACCCCTG
ATAAATGCTTCAATAATATTGAAAAAGGAAGAGTATGAGTATTCAACATTTCCGT
GTCGCCCTTATTCCCTTTTTTGCGGCATTITGCCTTCCTGTTTTTGTCTACCCAGAA
ACGCTGGTGAAAGTAAAAGATGCTGAAGATCAGTTGGGTGCTCGAGTGGGTTAC
ATCGAACTGGATCTCAACAGCGGTAAGATCCTTGAGAGTTTTCGCCCCGAAGAAC
GTTTTCCAATGATGAGCACTTTTAAAGTTCTGCTATGTGGCGCGGTATTATCCCGT
ATTGACGCCGGGCAAGAGCAACTCGGTCGCCGCATACACTATTCTCAGAATGACT
TGGTTGAGTACTCACCAGTCACAGAAAAGCATCTTACGGATGGCATGACAGTAA
GAGAATTATGCAGTGCTGCCATAACCATGAGTGATAAACAAGTGGCCAACTTACT
TCTGACAACGATCGGAGGACCGAAGGAGCTAACCGCTTTTTTGCACAACATGGG
GGATCATGTAAGTGCCTTGATCGTTGGGAACCGGAGCTGAATGAAGCCATACC
AAACGACGAGCGTGACACCAGATGCCTGTAGCAATGGCAACAACGTTGCGCAA
ACTATTAAGTGGCGAACTACTTACTCTAGCTTCCCGGCAACAATTAATAGACTGG
ATGGAGGCGGATAAAGTTGCAGGACCACTTCTGCGCTCGGCCCTTCCGGCTGGCT
GGTTTATTGCTGATAAATCTGGAGCCGGTGAGCGTGGGTCTCGCGGTATCATTGC
AGCACTGGGGCCAGATGGTAAGCCCTCCCGTATCGTAGTTATCTACACGACGGG
GAGTCAGGCAACTATGGATGAACGAAATAGACAGATCGCTGAGATAGGTGCCTC
ACTGATTAAGCATTGGTAACTGTCAGACCAAGTTTACTCATATATACTTTAGATT
GATTTAAACTTCATTTTTAATTTAAAAGGATCTAGGTGAAGATCCTTTTTGATAA
TTCATGACCAAATCCCTTAACGTGAGTTTTCGTTCCACTGAGCGTCAGACCCC
GTAGAAAAGATCAAAGGATCTTCTTGAGATCCTTTTTTTCTGCGCGTAATCTGCT

GCTTGCAAACAAAAAACCACCGCTACCAGCGGTGGTTTGTGGCCGGATCAAG
 AGCTACCAACTCTTTTTCCGAAGGTAAGTGGCTTCAGCAGAGCGCAGATACAAA
 TACTGTCCTTCTAGTGTAGCCGTAGTTAGGCCACCACTTCAAGAAGTCTGTAGCA
 CCGCCTACATACCTCGCTCTGCTAATCCTGTTACCAGTGGCTGCTGCCAGTGGCG
 ATAAGTCGTGTCTTACCGGGTTGGACTCAAGACGATAGTTACCGGATAAGGCGC
 AGCGGTTCGGGCTGAACGGGGGGTTCGTGCATACAGCCCAGCTTGGAGCGAACGA
 CCTACACCGAACTGAGATACCTACAGCGTGAGCTATGAGAAAGCGCCACGCTTC
 CCGAAGGGAGAAAGGCGGACAGGTATCCGGTAAGCGGCAGGGTCCGAACAGGA
 GAGCGCACGAGGGAGCTTCCAGGGGGAAACGCCTGGTATCTTTATAGTCTGTG
 GGGTTTCGCCACCTCTGACTTGAGCGTCGATTTTTGTGATGCTCGTCAGGGGGG
 GGAGCCTATGGAAAACGCCAGCAACGCGGCCTTTTTACGGTTCCTGGCCTTTTG
 CTGGCCTTTTGCTCACATGTTCTTTCCTGCGTTATCCCCTGATTCTGTGGATAACC
 GTATTACCGCCTTTGAGTGAGCTGATACCGCTCGCCGCAGCCGAACGACCGAGCG
 CAGCGAGTCAGTGAGCGAGGAAGCGGAAGAGCGCCCAATACGCAAACCGCCTCT
 CCCCOCGCGTTGGCCGATTCATTAATGCAGCTGGCACGACAGGTTTCCCAGCTGG
 AAAGCGGGCAGTGAGCGCAACGCAATTAATGTGAGTTAGCTCACTCATTAGGCA
 CCCCAGGCTTTACACTTTATGCTTCCGGCTCGTATGTTGTGTGGAATTGTGAGCGG
 ATAACAATTTACACACAGGAAACAGCTATGACCATGATTACGCCAAGCTTTGGAG
 CCTTTTTTTGGAGATTTTCAACGTGAAAAAATTATTATTCGCAATTCCTTTAGTT
 GTTCCTTTCTATGCGGCCAGCCGGCCATGGCCGCCATTGAAGTGAAAGATGTGA
 CCGATAACCACCGCGCTGATTACCTGGTTTAAACCGCTGGCGGAAATTGATGGCTG
 TGAAGTACCTATGGCATTAAAGATGTGCCGGGCGATCGCACACCATAGATCTG
 ACCGAAGATGAAAACAGTATAGCATTGGTAACCTGAAACCGGATACCGAATAT
 GAAGTGAGCCTGATTTGCCGTTCGTGGCGATATGAGCGGGCGCGCCGGCGAAAGAA
 ACCTTTACCACCGGTGGCGGTACCCCAACCGACCCGCCAACCCTCCACCAACTG
 ATAGCCCAGGCGGTACTGGTGGCTCTGGTTCCGGTGATTTTGATTATGAAAAGAT
 GGCAAACGCTAATAAGGGGGCTATGACCGAAAATGCCGATGAAAACGCGCTACA
 GTCTGACGCTAAAGGCCAACTTGATTCTGTGCTACTGATTACGGTGCTGCTATC
 GATGGTTTCATTGGTGACGTTTCCGGCCTTGCTAATGGTAATGGTGCTACTGGTG
 ATTTTGCTGGCTCTAATTCCAAATGGCTCAAGTCGGTGACGGTGATAATTACC
 TTTAATGAATAATTTCCGTCAATATTTACCTTCCCTCCCTCAATCGGTTGAATGTC
 GCCCTTTTGTCTTTAGCGCTGGTAAACCATATGAATTTTCTATTGATTGTGACAAA
 ATAACTTATTCCGTGGTGTCTTTGCGTTTCTTTTATATGTTGCCACCTTTATGTAT
 GTATTTTCTACGTTTGCTAACATACTGCGTAATAAGGAGTCTTAAGAATTCGACG
 GTCACAGCTTGTCTGTAAGCGGATGCCGGGAGCAGACAAGCCCGTCAGGGCGCG
 TCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGCTGGCTTAAGTATGCGGCATCAGAGCAG
 ATTGTACTGAGACTGCACCATAAAATTGTAAACGTTAATATTTTGTAAATTCG
 CGTTAAATTTTGTAAATCAGCTCATTTTTAAACCAATAGGCCGAAATCGGCAA
 AATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGCCCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTCCAGTT
 TGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAACGTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAA
 ACCGTCTATCAGGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCCAAATCAAGTTTTT
 TGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCACTAAATCGGAACCCTAAAGGGAGCCCCCGAT
 TTAGAGCTTGACGGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGAAAGGAAGGGAAGAAA
 GCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGTA
 ACCACCACACCCGCCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGGCGCGTACTATGGTTGCT
 TTGACGTATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCCGTAAGGAGAAAATACCGCAT
 CAGGCGCCATTCGCCATTACGGCTGCGCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCG
 GGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGGGGGATGTGCTGCAAGGCGATT
 AAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG
 TCCGGGAGCTGCATGTGTCAGAGGTTTTACCGTCATCACCGAAACGCGCGA

ES 2 533 874 T3

Clon	Bucle BC	SEC ID N°:	Bucle FG	SEC ID N°:
Armazones de unión específica a SYNAGIS®				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKIIGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVGQKSNPA	104
4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110
Armazones de unión específica a lisozima				
1	FKPLAEIDG	111	YNNRYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	111	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAIRES	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHRTG	124	HTPLGHLRS	125

Agentes de unión de dos bucles de TRAIL-R2

Nombre del clon	Bucle BC	SEC ID N°:	Bucle FG	SEC ID N°:
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMMSGAPA	127
5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCQKTG	130	FKLTGFLYS	131
6F11	SPSVARMLETG	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFSNPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDSHIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYIQG	142	AKLTGWLCS	143

5

Agentes de unión de tres bucles de TRAIL-R2

Clon	Bucle BC	SEC ID	Bucle DE	SEC ID	Bucle FG	SEC ID
1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYYVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTG	156	QSSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRQGGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161

Clon	Bucle BC	SEC ID	Bucle DE	SEC ID	Bucle FG	SEC ID
2G03	SPGPLLRRHTTG	162	RPIPRA	163	RNRPQQSNPA	164
2D3	SPGGFQKITTG	165	VNRRNH	166	LTYKARAI	167
1C06	SPRMYTWIQTG	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HVWQVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTG	174	HGLQRV	175	AKICGHLVS	176
3B11	SPCQLLALITG	177	NSRHYH	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCQMLSSLTG	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182
2A12	SPCCQEFTLTG	183	HNHHHH	184	ITDAGKSNPA	185
1E05	SPCSPCQLVTG	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNPA	188
2F02	SPSRGGTSLTG	189	DQVRAT	190	HTNSGQPSNPA	191
1H05	SPGMFDQVRTG	192	GKYWER	193	RNQYGQHQ	194
2A11	SPPFRAGHVTG	195	VTARCQ	196	TTGNGLRSNPA	197
1G11	SWAQANPGG	198	WHSITF	199	KTKVQSSNPA	200

7. Ejemplos

7.1 Ejemplo 1. Expresión recombinante de armazones candidatos

5 Este ejemplo demuestra que los armazones candidatos pueden expresarse de forma recombinante en *E. coli* en cantidad suficiente para ser visibles contra el fondo de proteínas hospedadoras en una tinción de Coomassie en un gel de poliacrilamida (Figura 1). Se representa en la Figura 1 el análisis de PAGE de lisados de *E. coli* en bruto que expresan armazones candidatos. Algunos de los otros armazones candidatos mostraron mayores niveles de expresión (ejemplificados por los carriles 3, 4, 5, y 10) y se seleccionaron para desarrollo posterior. Específicamente, el carril 3 representa el sexto dominio de fibronectina III, el carril 4 representa el almacén del receptor común β , el carril 5 representa el almacén candidato del receptor de la hormona del crecimiento y el carril 10 representa el motivo estructural Tn3.

15 Expresión recombinante

Se seleccionó un panel de secuencias de motivo estructural Tn3 derivadas de ser humano con respecto a la expresión heteróloga en *E. coli* (Tabla 1). Se proporcionaron ADNc sintéticos que codificaban cada una de estas proteínas, y optimizados para el uso codónico en *E. coli* por GenScript Corporation según las secuencias mostradas. Cada ADNc contenía sitios de restricción Nco I y Kpn I flanqueantes, y después de digestión con estas enzimas, los insertos se clonaron en un vector pET22b modificado (Novagen) que contenía sitios Nco I/Kpn I correspondientes.

En otras realizaciones, los vectores pueden comprender cualquier variedad de sitios de restricción para facilitar la modificación técnica de los armazones. En algunas realizaciones, los vectores comprenden al menos un sitio de restricción. En otras realizaciones, los vectores comprenden al menos un sitio de restricción que flanquea al menos una secuencia de bucle. En otras realizaciones, los vectores comprenden al menos un sitio de restricción seleccionado del grupo que consiste en NcoI, BglII, BstEII, Ascl y KpnI. En realizaciones adicionales, el vector comprende una secuencia líder. En otras realizaciones, el vector comprende una secuencia enlazadora. En una realización específica, los vectores comprenden la secuencia polinucleotídica definida por SEC ID N°: 99.

Se cultivaron transformantes de *E. coli* BL21 DE3 que albergaban plásmidos de expresión de motivo estructural Tn3 durante una noche a 37 °C en caldo de cultivo Luria que contenía carbenicilo 50 µg/ml. Los cultivos de una noche se diluyeron 1 en 20 en medio Super Broth que contenía carbenicilo 50 µg/ml y glucosa 2 % p/v y se incubaron a 37 °C con agitación hasta que la densidad óptica a 600 nm fue de 0,6. En este momento, se indujo expresión proteica mediante adición de IPTG hasta 200 µM, y los cultivos se transfirieron a una incubadora a 30 °C con agitación. Después de 5 horas a 30 °C, se retiró una alícuota pequeña de cultivo para análisis de SDS-PAGE, y el resto de las células se sedimentaron por centrifugación, y se congelaron durante una noche a -20 °C. El análisis de SDS-PAGE de lisados celulares completos sugirió que los motivos estructurales Tn3 3, 4, 5, 10 estaban altamente sobreexpresados en *E. coli* como se determinó por bandas de geles a aproximadamente 10 kDa (Figura 1). En un experimento separado, también se determinó que el motivo estructural Tn3 12 estaba sobreexpresado.

Purificación

Se resuspendieron sedimentos celulares congelados en tampón de lisis (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 10 mM, pH 8,0) que contenía lisozima 1 mg/ml (Sigma) y DNasa 200 unidades/ml (Invitrogen). Se efectuó lisis por sonicación, y se separó lisado clarificado de residuos celulares por centrifugación seguido de filtración a través de un filtro de 0,8 µm. Los lisados se cargaron en columnas quelantes HiTrap con Ni²⁺, se lavaron con 15 volúmenes de columna de tampón de lavado (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 20 mM, pH 8,0) y se eluyeron con 4 volúmenes de columna de tampón de elución (NaH₂PO₄ 50 mM, NaCl 300 mM, imidazol 250 mM, pH 8,0). Las concentraciones de proteína purificada se determinaron por absorbancia de UV a 280 nm de acuerdo con Gill y von Hippel (Anal. Biochem. 182: 319, 1989). Se presentan rendimientos después de la purificación de las diversas proteínas de Tn3 en la Tabla 1. El motivo estructural Tn3 derivado de tenascina C humana (Tn3) proporcionó el mayor rendimiento, que correspondía a 110 mg de Tn3 purificado obtenido de 400 ml de cultivo. El análisis de SDS-PAGE de una muestra de Tn3 purificada se muestra en la Figura 2.

Tabla 1

Nº de Proteína	Proteína Precursora	Nivel de expresión (mg/l)	Secuencia proteica	Secuencia de ADN
1	Fibronectina	2 mg/ml	1P	1D
2	Fibronectina	-	2P	2D
3	Fibronectina	83	3P	3D
4	R de hormona del crecimiento	48	4P	4D
5	R común β	9	5P	5D
6	IL-5R	-	6P	6D
7	Tenascina XB	-	7P	7D
8	Tenascina XB	-	8P	8D
9	Tenascina XB	-	9P	9D
10	Tenascina C (Tn3)	265	10P	10D
11	R de hormona del crecimiento	-	11P	11D
12	PTPR-F	105	12P	12D
13	PTPR-F	3	13P	13D
14	Colágeno de tipo XIV	1	14P	14D

Caracterización

Dado el alto rendimiento de Tn3 soluble producida en *E. coli*, esta proteína se analizó con respecto a sus propiedades de estabilidad y solución.

Estabilidad

Se evaluó el desplegamiento térmico de Tn3 por calorimetría de exploración diferencial (DSC). Una muestra de Tn3 1 mg/ml en fosfato sódico 20 mM a pH 7,0 mostró una temperatura de fusión (T_f) de 45 °C (Figura 3A), además, el desplegamiento térmico fue reversible como se demostró por termogramas superponibles cuando la misma muestra se enfrió y se recalentó. Tn3 era más estable al desplegamiento térmico a pH menor o alta salinidad. La T_f en acetato de sodio 20 mM pH 5,0 fue de 56 °C, y 55 °C en fosfato sódico 20 mM pH 7,0 que contenía NaCl 1 M.

El desplegamiento de Tn3 por agentes caotrópicos se controló por fluorescencia intrínseca. Se prepararon muestras de Tn3 0,1 mg/ml que contenían diferentes concentraciones de urea o clorhidrato de guanidina en fosfato sódico 20 mM pH 7,0, o Tris 20 mM pH 7,5. Se adquirieron espectros de emisión de fluorescencia en un espectrofluorímetro QuantaMaster de Photon Technology a una longitud de onda de excitación de 280 nm. En ausencia de caótropro, las muestras plegadas de Tn3 mostraron una emisión máxima a 319 nm. El desplegamiento de Tn3 por urea o GuHCl dio como resultado un desplazamiento al rojo del máximo a 348 nm, además de un aumento en la intensidad de fluorescencia. El punto medio de desplegamiento a pH 7,0 o 7,5 se produjo a aproximadamente urea 2 M (Figura 3B) o GuHCl 0,8 M.

La estabilidad de Tn3 a la degradación proteolítica se ensayó por incubación con termolisina. Se incubó Tn3 (45 µM) en tampón de digestión (Tris 20 mM pH 7,5 que contenía CaCl₂ 10 mM) a temperatura ambiente con termolisina (0,45 µM). Las alícuotas de la digestión se retiraron en diferentes puntos temporales, y la reacción se detuvo mediante la adición de EDTA en exceso. Las muestras se analizaron después por SDS-PAGE (véase los carriles ST

en la Figura 10G). Como se demuestra en la Figura 10G, el dominio Tn3 de tipo silvestre se degrada rápidamente cuando se incubaba con termolisina.

Se usó cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multi-ángulo (SEC-MALS) para determinar si Tn3 era monomérica en solución. Se llevó a cabo separación de exclusión por tamaño usando una columna Bio-Rad Bio-Sil SEC 125-5 (7,8 x 300 mm) a un caudal de 0,75 ml/min. La fase móvil fue solución salina tamponada con fosfato (PBS) a pH 7,2. Se consiguió detección triple usando un detector de dispersión de la luz multiángulo DAWN EOS de Wyatt Technologies acoplado con un detector de índice refractario diferencial Optilab Rex de Wyatt Technologies y un detector de UV de longitud de onda variable Agilent Serie 1100. El Análisis de SEC-MALS mostró que el contenido de monómero de una Tn3 4,5 mg/ml almacenada a 4 °C durante 2 meses fue del 97 % (Figura 3C). La masa de monómero derivada experimentalmente fue de 10,6 kDa que se aproxima bastante a la masa calculada de 10,8 kDa. El armazón de Tn3 permanece como un monómero incluso durante períodos prolongados de almacenamiento.

7.2 Ejemplo 2. Identificación de diversidad de secuencia y longitud de bucle

Un armazón ideal es altamente soluble y estable. Debería ser suficientemente pequeño para análisis estructural, pero suficientemente grande para acomodar una multitud de cambios para facilitar la unión de una diana. En un intento de facilitar la identificación y modificación técnica de armazones proteicos no de anticuerpo así como diseño de bibliotecas combinatorias de armazones, se realizó un análisis bioinformático de secuencias de armazón.

El motivo estructural Tn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Además, están presentes motivos estructurales Tn3 en muchas proteínas humanas diferentes, proporcionando información importante sobre restos conservados que son con frecuencia importantes para la estabilidad y plegamiento, así como regiones de diversidad que pueden aprovecharse para introducir nuevas funciones de unión. A partir del análisis de secuencia, se ven grandes variaciones en los bucles BC y FG, lo que sugiere que los bucles no son cruciales para la estabilidad. Usando esta propiedad, se desarrolló una estrategia para identificar armazones proteicos candidatos y analizar la diversidad de secuencia y longitud de bucle en un intento de caracterizar el alcance natural de la variación que se produce en estos dos parámetros.

Una búsqueda de las bases de datos de proteínas disponibles identificó varios armazones proteicos basados en el motivo estructural Tn3. Los armazones candidatos contenían una estructura predicha similar a los motivos estructurales Tn3, concretamente 7 cadenas beta cada una separada por una región de bucle. Un análisis de la localización de las cadenas beta y las regiones de bucle reveló un patrón de diversidad que puede ayudar en la predicción de la longitud de bucle y composiciones de secuencia para armazones candidatos para los que no está disponible una estructura. Se realizó un análisis de diversidad de longitud para los bucles BC, DE y FG de armazones candidatos en bases de datos de proteínas accesibles.

Una compilación de secuencias de armazón identificadas ha conducido al desarrollo de los gráficos de diversidad de longitud de bucle presentados en las Figuras 4, 5, y 6. Se presenta en la Figura 4A la diversidad de longitud del bucle BC obtenida del análisis de 51 secuencias del banco de datos de proteínas (PDB). Resulta evidente a partir del gráfico que la longitud del bucle BC en esta colección de secuencias varía de aproximadamente 8 restos de aminoácidos a aproximadamente 26 restos de aminoácidos, siendo el bucle de 9 restos de aminoácidos el más predominante. Se presenta en la Figura 4B la diversidad de longitud de bucle obtenida del análisis de 397 secuencias identificadas de la base de datos Swiss-Prot. Resulta evidente a partir del gráfico que la longitud del bucle BC en esta colección de secuencias varía de aproximadamente 7 restos de aminoácidos a aproximadamente 19 restos de aminoácidos, siendo el bucle de 12 restos de aminoácidos el más predominante. Se presenta en la Figura 5 la diversidad de longitud de bucle FG obtenida del análisis de 51 secuencias identificadas a partir de la base de datos PDB. Resulta evidente a partir del gráfico que la longitud del bucle FG en esta colección de secuencias varía de aproximadamente 6 restos de aminoácidos a aproximadamente 18 restos de aminoácidos, siendo el bucle de 10 aminoácidos el más predominante. Se realizó un análisis similar como se describe en el presente documento para las secuencias de bucle DE. Se presenta en la Figura 6 la diversidad de longitud del bucle DE, que demuestra que la longitud de bucles DE varía de aproximadamente 4 restos de aminoácidos a aproximadamente 17 restos de aminoácidos siendo el bucle de 6 restos la longitud más predominante.

Además de la diversidad de longitud, para las longitudes de bucle más abundantes se realizó un análisis de diversidad de secuencia en un intento de guiar el establecimiento de secuencias consenso. Se presenta en la Figura 7A el gráfico de diversidad de secuencia de bucles BC de 9 restos de aminoácidos. La prevalencia de un aminoácido particular en cada posición se representa por el tamaño relativo de la caja que contiene ese resto sobre cada posición. Por ejemplo, en la posición 3 de un bucle de 9 restos de aminoácidos, hay una preferencia de una prolina o una alanina. Además, en la posición 5 hay una preferencia por glicina y alanina. En la posición 7 hay una preferencia por los aminoácidos valina, isoleucina y fenilalanina. Otras posiciones en el bucle muestran mayor diversidad de secuencia lo que sugiere que estas posiciones pueden ser adecuadas para distribución al azar completa en la construcción de bibliotecas del armazón de Tn3. Se presenta en la Figura 7B el gráfico de diversidad de secuencias de bucles BC de 12 restos de aminoácidos. En este análisis, por ejemplo, en la posición 3 se prefiere un resto de prolina. Además, las posiciones 1, 4, 5 y 12 parecen ser adecuadas para distribución aleatoria completa ya que no

muestran selectividad por un resto de aminoácido. Se presenta en la Figura 8 el gráfico de diversidad de secuencias para todas las longitudes de bucles FG. A partir de este análisis, la posición 2 es con frecuencia asparagina, la posición 5 prefiere glicina, la posición 7 es con frecuencia glicina o serina. Además, las posiciones 1, 3, 4, 6, 8, 9, 11, 12 y 13 representan posiciones candidatas para distribución al azar completa en construcción de bibliotecas ya que no demuestran selectividad para restos de aminoácidos. Los datos de este análisis sugieren un beneficio potencial de la limitación de la diversidad de bucles en posiciones que muestran una conservación de secuencia de modo que una mayor proporción de moléculas en una biblioteca puedan mantener estabilidad, expresión y solubilidad de tipo ST.

7.3 Ejemplo 3. Construcción de una biblioteca de Tn3 presentada en fagos y selección de agentes de unión específicos

Dada la diversidad de bucle y secuencia establecida anteriormente, se realizó un enfoque dirigido al desarrollo de bibliotecas. Más específicamente, se distribuyeron aleatoriamente bucles BC y FG de una manera restringida. Se empleó la siguiente estrategia para los bucles BC y FG.

Diseño y construcción de bibliotecas

Se clonó un ADNc sintético que codifica Tn3, correspondiente al fragmento Nco I - Kpn I de SEC. ID 10D (véase sección 6 para la secuencia), en un vector de presentación de fagos que permitía la presentación de proteína Tn3 en la superficie del bacteriófago M13 como una fusión con un fragmento de la proteína de cubierta del gen III. La construcción codificó una secuencia enlazadora rica en Thr/Pro de 20 aminoácidos entre el extremo C terminal de Tn3 y los codones 251-406 del gen III de M13.

Se prepararon bibliotecas de Tn3 mutada aleatoriamente por mutagénesis de Kunkel (Kunkel TA *et al.*, Methods Enzym. 204, 125, 1991) usando oligonucleótidos degradados. Se usaron tres oligonucleótidos degradados para distribuir al azar la secuencia codificante del bucle BC, y tres para el bucle FG (Tabla 2.). Esta estrategia dio como resultado la introducción de diversidad de longitud de bucle y secuencia caracterizada en la biblioteca Tn3, coherente con los patrones de diversidad descritos para dominios TN3 naturales.

Tabla 2: Oligonucleótidos degradados para construcción de bibliotecas de Tn3

Nombre del oligo	Bucle distribuido aleatoriamente	Secuencia	SEC ID
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNKGGSTNNK NNKNNKGGCATTGAACTGACCTATGGC	211
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNK NNKNNKNNKACCGGCATTGAACTGACCTATGGC	212
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNK RRCRGCNNKATTNNKGGTATTGAACTGACCTATGGC	213
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKNNKAGCAAAGAAACCTTTACCACC	214
FG10	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKNNK NNKRGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	215
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTAGCNNKAMSNNKNNKGGT NNKNNKAGCAACCCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	216

Después de la transformación de *E. coli* electrocompetentes con construcciones de fagémidos mutadas aleatoriamente, se añadió fago auxiliar M13KO7 y se dejaron crecer cultivos durante una noche a 37 °C en 500 ml de medio 2YT que contenía carbenicilo. Después se aisló el fago de sobrenadantes de cultivo por precipitación con una solución de polietilenglicol salina y se resuspendió en un volumen pequeño de PBS.

Selección de bibliotecas con respecto a un armazón de unión a SYNAGIS® específico

SYNAGIS® se adsorbió de forma pasiva en pocillos de placas de microtitulación, y se bloquearon los sitios libres con PBS que contenía BSA o caseína 10 mg/ml. Se diluyeron reservas de fagos con PBS que contenía BSA o caseína 2 mg/ml y Tween-20 0,1 % v/v. Se añadieron muestras de fagos diluidas (100 µl; ~ 10¹² fagos) a pocillos recubiertos con SYNAGIS® y se incubaron durante 2 horas a temperatura ambiente con agitación suave. Las placas se lavaron después 10-15 veces con PBS que contenía Tween 20 0,1 % v/v, y los fagos unidos se eluyeron con 100 µl/pocillo de HCl 0,1 M, después se neutralizaron mediante la adición de Tris-HCl 1,0 M, pH 8,0. Los fagos eluidos se volvieron a propagar por infección de *E. coli* XL-1 Blue y se recogieron de cultivos durante una noche coinfectados con fago auxiliar M13KO7 en 50 ml de medio 2YT que contenía carbenicilo 50 mg/ml. La biblioteca se sometió a

selección frente a SYNAGIS® de esta manera durante un total de cuatro ciclos, usando BSA en los tampones de bloqueo y diluyente en el primer y tercer ciclos, y caseína en los ciclos 2 y 4.

Exploración de clones de unión a SYNAGIS®

5 Después del último ciclo de selección, el fago eluido se diluyó en serie y se usó para infectar *E. coli* XL-1 Blue durante 1 hora antes de sembrar en placas durante una noche en agar LB que contenía carbenicilo 50 µg/ml. Las colonias individuales se seleccionaron y se cultivaron durante una noche en 2YT/carbenicilo a 37 °C. Los cultivos se diluyeron después 1:100 en 2YT/carbenicilo, se cultivaron hasta una densidad óptica (600 nm) de 0,4, y se añadieron fagos auxiliares M13KO7 seguido de incubación durante una noche a 37 °C con agitación. Después de centrifugar, se diluyeron 50 µl de sobrenadante de cultivo con un volumen igual de PBS que contenía Tween 20 0,1 % v/v y leche desnatada en polvo 2 % p/v, y se usó para análisis por ELISA. Los clones que proporcionaron la mayor respuesta para unión con SYNAGIS® pero no placas de ELISA recubiertas con caseína/BSA se seleccionaron después para secuenciación. Para determinar las secuencias de variantes de Tn3 presentadas por los clones seleccionados, se usó 1 µl de sobrenadante de cultivo en una PCR para amplificar un fragmento que abarcaba la secuencia de Tn3 codificada. Este producto de PCR se trató después con ExoSAPit, (USB Corp., Cleveland, OH) para degradar desoxinucleótidos no consumidos y cebadores, y se secuenció directamente.

Identificación de la variante de Tn3 de unión a SYNAGIS® SynBP01

20 La secuenciación de ADN de variantes de Tn3 de unión a SYNAGIS® identificó 3 clones únicos. El clon con la mayor señal en un ELISA de unión a SYNAGIS®, SynBP01, contenía nuevas secuencias de bucles BC y FG como se muestra en la Tabla 3. Para expresar SynBP01 soluble, el fragmento de ADNc de NcoI - KpnI se escindió del vector de presentación de fagos y se clonó en los sitios correspondientes del vector de expresión de *E. coli* previamente descrito. Después se expresó SynBP01 recombinante en *E. coli*, y se purificó como se ha descrito previamente para Tn3 de tipo silvestre. El rendimiento de SynBP01 purificado fue de 18 mg a partir de 400 ml de cultivo de *E. coli*, y tuvo más del 95 % de pureza como se valoró por análisis de SDS-PAGE (Figura 9A.). Ya que esta recuperación está cerca de la capacidad de la columna de afinidad de quelado de níquel de 1 ml usada, es probable que este rendimiento represente menos del nivel de expresión real de SynBP01.

Determinación de la afinidad de unión a SYNAGIS® mostrada por SynBP01

35 Se midió la constante de disociación en equilibrio (K_D) para la unión de SynBP01 con SYNAGIS® por resonancia de plasmón superficial en un instrumento BIAcore 3000. Se inmovilizó covalentemente SYNAGIS® en la microplaca biosensora mediante grupos amino primarios. Se midió la unión en equilibrio de SynBP01 inyectando muestras de SynBP01 en tampón de HBS-EP (HEPES 10 mM, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM, pH 7,5, Tween 20 0,005 % v/v) sobre la microplaca a un caudal de 10 µl/min (Figura 9B). Después de cada medición de unión en equilibrio, se permitió que el SynBP01 se disociara completamente procesando el tampón HBS-EP sobre la microplaca durante al menos 25 minutos antes de la inyección de la siguiente muestra de SynBP01. Se realizaron perfiles de unión usando software BIAevaluation (Biacore AB, Uppsala, Suecia), y la K_D para la unión de SynBP01 con SYNAGIS® se calculó como 16 µM.

Examen de la estabilidad de SynBP01

45 La estabilidad de SynBP01 al desplazamiento por urea a pH 7,0 se midió como se ha descrito previamente para Tn3 (véase Ejemplo 1). Para facilitar una comparación del plegamiento inducido por caótropeo de Tn3 y SynBP01, se representó la intensidad de emisión de fluorescencia relativa a 360 nm en función de la concentración de caótropeo para cada proteína.

50 Una comparación del desplazamiento inducido por urea de Tn3 y SynBP01 a pH 7,0 (Figura 9C) mostró que la concentración de urea requerida para conseguir el 50 % de desplegamiento fue similar para ambas proteínas. Esto indica que la estabilidad de SynBP01 es similar a la de Tn3 de tipo silvestre.

55 En otras exploraciones de bibliotecas, se identificaron armazones de unión específica a lisozima y SYNAGIS® adicionales. Las secuencias de los bucles BC y FG específicas son las siguientes:

Tabla 3. Secuencias de bucles BC y FG de armazones de unión específica a SYNAGIS® y lisozima

Clon	Bucle BC	SEC ID N°:	Bucle FG	SEC ID N°:
Armazones de unión específica a SYNAGIS®				
SynBP01	SPPSVLVGYTG	100	VTEFGRRRS	101
2	FKPLAEIDG	102	RKIIGLLSNPA	103
3	FKPLAEIDG	102	GTVVGQKSNPA	104

Armazones de unión específica a lisozimas				
1	FKPLAEIDG	102	YNNRYGLCPS	112
2	FKPLAEIDG	102	SNRIGMCPS	113
3	AQPTSPNGSIXG	114	RRGDMSSNPA	115
4	FKPLAEIDG	102	DTVHGRLSNPA	116
5	FKPLAEIDG	102	RKVLGRLSNPA	117
6	FKPLAEIDG	102	RKLVGALRS	118
7	FKPLAEIDG	102	RKVLRYSNPA	119
8	SPCNGGKRCTG	120	RRGDMSSNPA	121
9	FKPLAEIDG	102	FKWLGAIKS	122
10	FKPLAEIDG	102	GNCVGNLWS	123
11	SPAWITWHRTG	124	HTPLGHLRS	125

Captura de mAb de armarzones emparejados

5 Los armarzones bivalentes o biespecíficos, que contenían 2 armarzones idénticos o 2 distintos, pueden ser moléculas terapéuticas útiles basándose en su capacidad para unirse simultáneamente con 2 proteínas diana. Un método para explorar directamente pares de armarzones con respecto a una actividad bivalente o biespecífica deseada, sin tener que cambiar el formato y expresar armarzones en tándem o de fusión, simplificaría en gran medida el proceso de identificar pares de armarzones útiles. Solamente los pares identificados en la exploración requeriría entonces cambiar el formato a una forma adecuada para la preparación de un armazón bivalente o biespecífico (por ejemplo, un armazón multimérico).

15 Las moléculas de anticuerpo de IgG de longitud completa contienen dos sitios de unión en antígeno, y pueden por lo tanto unirse con dos antígenos diana simultáneamente. Por lo tanto, la captura de anticuerpos monoclonales no covalentes de armarzones daría como resultado la presentación de dos armarzones en cada rama de unión a antígeno del anticuerpo. Si el armazón capturado de esta manera se orientara de modo que la superficie de unión formada por los bucles BC, DE y FG estuviera disponible para unión con otras proteínas, entonces esto podía formar la base de pares de exploración de armarzones. Por esta razón, la captura por un anticuerpo que reconoce un epítipo que implica el extremo C terminal del armazón, y cualquiera de/todos los bucles AB, CD y EF sería más adecuada. La captura por anticuerpo de 2 armarzones idénticos daría como resultado la formación de un complejo de armazón-mAb homodimérico que podrían imitar la actividad de un armazón bivalente. La captura de 2 armarzones diferentes daría como resultado una mezcla de complejos de armazón-mAb homo y heterodimérico, en la que el complejo heterodimérico podía imitar la actividad de un armazón biespecífico.

25 Para demostrar la viabilidad de esta estrategia de ensayo, se incubaron diferentes concentraciones de PentaHis, un anticuerpo monoclonal anti-etiqueta de Histidina (Qiagen), durante 2 horas con SynBP01 1 μ M en tampón HBS-EP. No se esperaba que la captura con PentaHis de SynBP01 interfiriera con su capacidad para unirse con SYNAGIS®, ya que el marcador de hexahistidina C terminal debería estar en el lado opuesto de la molécula a la superficie de unión formada por los bucles BC, DE y FG (Figura 9D). Las muestras de PentaHis-SynBP01 se inyectaron después sobre una microplaca de BIAcore® en la que se había inmovilizado SYNAGIS® como se ha descrito previamente. Los sensogramas se corrigieron con respecto a fondo restando de los sensogramas correspondientes para inyección de PentaHis en ausencia de SynBP01, y se comparó después con el sensograma obtenido para inyección de SynBP01 1 μ M en ausencia de PentaHis.

35 La unión del complejo de PentaHis-SynBP01 con SYNAGIS® fue significativamente más fuerte que la unión de SynBP01 libre, como se ejemplifica por el sensograma correspondiente al complejo de PentaHis 0,19 μ M con SynBP01 1 μ M (Figura 9D) En particular, el SynBP01 en complejo con PentaHis tuvo una velocidad de disociación de la superficie de SYNAGIS® mucho más lenta, lo que es indicativo de unión bivalente, que el SynBP01 libre. Los experimentos de control verificaron que PentaHis no mostraba ninguna unión detectable con SynBP01 cuando se inyectaron solos, ni la inyección de una mezcla de mAb de ratón irrelevante/SynBP01 (isotipo coincidente con PentaHis) mostró ninguna prueba de unión potenciada en relación con SynBP01 solo.

7.4 Ejemplo 4. Diseño, expresión y caracterización de variantes de Tn3 estabilizadas por disulfuro

Diseño de variantes de Tn3 que contienen disulfuro

45

Aunque muchos motivos estructurales Tn3 de origen natural carecen de enlaces disulfuro, otros sí contienen uno o más enlaces disulfuro. Por lo tanto, en lugar de intentar el diseño *de novo* de enlaces disulfuro en Tn3 midiendo las distancias y ángulos entre las cadenas laterales de aminoácidos, los inventores introdujeron restos de cisteína en el armazón de Tn3 en posiciones análogas a los dominios estructurales de Tn3 que contenían disulfuros de origen natural.

Las estructuras tridimensionales de 21 motivos estructurales Tn3 que contenían de forma natural enlaces disulfuro se superpusieron. Los códigos y secuencias de PDB para estas estructuras se muestran en la Figura 10A. Dentro de estas 21 estructuras, se producían enlaces disulfuro en diversas posiciones dentro del armazón, sin embargo, varios de estos eran análogos porque los enlaces disulfuro se solapaban dentro de la familia de estructuras superpuestas. Se encontraron tres ejemplos de enlaces disulfuro que se representaban más de dos veces en las 21 estructuras. Dos de estos tres correspondían al par de enlaces disulfuro previamente descrito habitualmente conservado dentro de receptores de citocina (*Bazan et al., PNAS, 87, 6934, 1990*). Se observó un total de 8 y 12 casos de estos dos disulfuros en las 21 estructuras. El tercer disulfuro se produce menos frecuentemente (5 casos/21 estructuras), y da como resultado un entrecruzamiento entre las cadenas F y G.

Se diseñaron tres mutantes de TN3 que contenían cisteína en un intento de introducir enlaces disulfuro en posiciones correspondientes a estos 3 disulfuros de origen natural. También se diseñó un cuarto mutante que contenía cisteína para introducir un disulfuro que aparece de forma natural en uno de los motivos estructurales Tn3 del receptor de G-CSF de ratón (PDB código 1pgr). Aunque hubo solamente un caso de este disulfuro en las 21 estructuras, este da como resultado una reticulación de disulfuro entre las cadenas C y F que está enterrado dentro del núcleo proteico y aparece cerca del bucle BC y FG. Para cada uno de los mutantes de Tn3, designados Tn3^{SS1-4}, se introdujeron 2 cisteínas en posiciones determinadas a partir del alineamiento de secuencias basado en estructura de Tn3 con las de las proteínas Tn3 que contenían disulfuro (Figura 10a). Como el disulfuro 2 aparece transversalmente en la base del bucle DE en motivos estructurales Tn3 que con frecuencia tienen bucles DE más largos que Tn3, también se insertaron 2 restos de glicina en el mutante correspondiente a Tn3^{SS2}. La estrategia de modificación técnica de disulfuro se representa gráficamente en la Figura 10B.

Generación de mutantes de disulfuro y expresión recombinante

Se generaron construcciones de expresión para Tn3^{SS1-4} por mutagénesis dirigida de la construcción de expresión de tipo silvestre descrita en el Ejemplo 1. Se expresó proteína recombinante en *E. coli* y se purificó por cromatografía de afinidad de quelado de níquel inmovilizado como se describe en el Ejemplo 1. Todos los mutantes de Tn3 se expresaron a un nivel de más de 50 mg/l.

Replegamiento de Tn3^{SS1-4}

La expresión citoplasmática de proteínas en *E. coli* generalmente da como resultado el aislamiento de proteínas que contienen cisteína en el estado reducido, o con algún grado de formación de disulfuro inapropiada. Para determinar si las proteínas Tn3^{SS1-4} recombinantes estaban oxidadas (es decir, que contenían sulfuro) o reducidas (es decir, que carecían de enlaces disulfuro), se analizó el material purificado por HPLC de fase inversa, y se comparó con material que se había pre-incubado en primer lugar con el agente reductor fuerte DTT en presencia de clorhidrato de guanidina. En todos los casos, el material tratado con DTT se cromatografió como un único pico, mientras que las muestras no tratadas mostraban la presencia de un segundo pico menor indicativo de oxidación parcial para la forma que contiene disulfuro (se representa el análisis de HPLC representativo de Tn^{SS3} y Tn^{SS4} en la Figura 10C).

Para efectuar la conversión completa de Tn3^{SS1-4} reducida a las proteínas que contienen disulfuro correspondientes, se diluyeron muestras hasta 1 mg/ml con clorhidrato de guanidina 6 M que contenía DTT 10 mM y tamponado a pH 8. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, las muestras se dializaron durante una noche frente a clorhidrato de guanidina 0,5 M a pH 8,5 con Tris-HCl 20 mM. El análisis por HPLC de material replegado de esta manera típicamente mostró una conversión del 30-70 % a la especie que contenía disulfuro (Figura 10C). Se efectuó una conversión adicional al 90-100 % de la especie que contenía disulfuro por incubación durante una noche a 37 °C, o almacenando muestras a 4 °C durante >2 s emanadas. Como alternativa, podría efectuarse replegamiento casi cuantitativo para el producto que contenía disulfuro por diálisis durante una noche de proteína reducida y desnaturalizada en tampón que contenía clorhidrato de guanidina 0,5 M, glutatión reducido 4 mM, glutatión oxidado 0,8 mM y tamponado a pH 8,5 con Tris-HCl 20 mM.

Caracterización

Para determinar la pureza y si los enlaces disulfuro dentro de las muestras de Tn3^{SS1-4} replegadas eran inter o intramoleculares, las muestras se analizaron por SDS-PAGE en condiciones reductoras y no reductoras (Figura 10D). En presencia de agente reductor, todas las muestras de Tn3^{SS1-4} replegadas migraron a una posición similar a Tn3. En ausencia de agente reductor, Tn3^{SS1}, Tn3^{SS3} y Tn3^{SS4} migraron de forma similar a Tn3, y se esperaba por lo tanto que contuvieran un disulfuro intramolecular como se ha diseñado. Por el contrario, Tn3^{SS2} migró principalmente como un dímero, migrando una cantidad pequeña de proteína como un monómero. En consecuencia, Tn3^{SS2} parece formar dímeros con enlaces disulfuro intermoleculares y por lo tanto no se estudió adicionalmente.

Estabilidad

Se controló el desplegamiento de Tn3^{SS1,3,4} por agentes caotrópicos por fluorescencia intrínseca como se ha descrito previamente para Tn3 de tipo silvestre. Para facilitar una comparación del desplegamiento inducido por caótropeo de Tn3 de tipo silvestre y que contenía disulfuro, la intensidad de emisión de fluorescencia relativa a 360 nm se representó en función de la concentración de caótropeo para cada proteína.

Una comparación del desplazamiento inducido por urea de Tn3 y Tn3^{SS1,3,4} a pH 7,0 (Figura 10E) mostró que Tn3^{SS1} era menos estable que la proteína de tipo silvestre, pero que Tn3^{SS3} y Tn3^{SS4} eran considerablemente más estables. A pH 7,0, la concentración de urea requerida para conseguir el 50 % de desplegamiento (Cm) de Tn3 de tipo silvestre era 2 M. Por el contrario, la Cm para el desplegamiento de Tn3^{SS3} era urea 4 M, mientras que para Tn3^{SS4} la Cm era al menos 6 M, pero no podría determinarse con precisión ya que esta proteína no estaba completamente desplegada a la mayor concentración de urea usada en estos experimentos (8 M).

El desplegamiento de Tn3^{SS4} por clorhidrato de guanidina (GuHCl) a pH 5,0 también se determinó por fluorescencia y se comparó con el desplegamiento de Tn3 de tipo silvestre. Ya que GuHCl es un desnaturalizante más fuerte que la urea, se obtuvo una transición de desplegamiento completa analizando la fluorescencia de muestras proteicas en concentraciones de GuHCl que variaban de 0 a 5,5 M (Figura 10F). La Cm para el desplegamiento de Tn3 de tipo silvestre a pH 5,0 fue de GuHCl 1 M y aproximadamente 3,2 M para Tn3^{SS4}.

La estabilidad de Tn3^{SS4} a la degradación proteolítica se ensayó por incubación con termolisina como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1 para la proteína de tipo silvestre. A diferencia de la proteína de tipo silvestre, Tn3^{SS4} resistió a proteólisis, incluso después de incubación durante una noche a temperatura ambiente (Figura 10G).

El desplegamiento térmico de Tn3^{SS4} se evaluó por calorimetría de exploración diferencial (DSC) como se ha descrito previamente. Una muestra de Tn3^{SS4} 1 mg/ml en fosfato sódico 20 mM a pH 7,0 mostró una temperatura de fusión (Tf) de 71 °C, que es 26 °C mayor que la Tf de la proteína de tipo silvestre en las mismas condiciones (Figura 10H). La Tf estaba ligeramente elevada para Tn3^{SS4} en acetato sódico 20 mM pH 5,0. A este pH, la Tf para Tn3^{SS4} fue de 74 °C, que es 18 °C mayor que la proteína de tipo silvestre. Como con la proteína de tipo silvestre, el desplegamiento térmico de Tn3^{SS4} parecía completamente reversible a pH de 7,0, pero dio como resultado precipitación a pH 5,0.

La cromatografía de exclusión por tamaño con dispersión de luz multi-ángulo (SEC-MALS) se usó para determinar si Tn3^{SS4} era monomérica en solución, usando las mismas condiciones previamente descritas para la proteína de tipo silvestre. El análisis por SEC-MALS de una muestra de Tn3^{SS4} 2,0 mg/ml reveló que la proteína estaba completamente en el estado monomérico (Figura 10I). La masa del monómero derivada de forma experimental fue de 10,7 kDa lo que se asemeja bastante a la masa calculada de 10,8 kDa.

Preparación de una variante de Tn3 que contiene disulfuro doble

Dada la estabilidad potenciada de las variantes tanto Tn3^{SS3} como Tn3^{SS4} en relación con la proteína de tipo silvestre, se preparó una nueva variante de Tn3 para determinar si el efecto estabilizador de cada enlace disulfuro sería aditivo en el contexto de un mutante de combinación.

Se preparó una construcción para expresión recombinante de esta variante de tetra-cisteína, designada Tn3^{SS3+4} por métodos previamente descritos y contenía 4 restos de cisteína en posiciones correspondientes a los disulfuros 3 y 4 (véase Figura 10B). La proteína se expresó y se purificó como se ha descrito previamente en el Ejemplo 1. El rendimiento de proteína purificada obtenido para esta variante era de 22 mg a partir de 200 ml de cultivo de *E. coli*. Ya que esta es la capacidad de unión máxima de la columna usada para la purificación, el nivel de expresión real es de al menos 110 mg/l.

Replegamiento de Tn3^{SS3+4}

Se analizó Tn3^{SS3+4} purificada por HPLC de fase inversa, y se comparó con material que se había preincubado en primer lugar con el fuerte agente reductor DTT en presencia de clorhidrato de guanidina. Aunque el material tratado con DTT se cromatografió como un pico único, la Tn3^{SS3+4} no tratada mostró la presencia de 3 picos de elución más tempranos adicionales más probablemente debido a la formación parcial de uno o ambos enlaces disulfuro potenciales (Figura 10J).

Para replegar Tn3^{SS3+4} para la proteína que contiene disulfuro doble correcta, la muestra se diluyó a 1 mg/ml con clorhidrato de guanidina 6 M que contenía DTT 10 mM y se tamponó a pH 8. Después de 10 minutos de incubación a temperatura ambiente, la muestra se dializó durante una noche frente a clorhidrato de guanidina 0,5 M tamponado a pH 8,5 con Tris.HCl 20 mM, y que contenía glutatión reducido 4 mM. El análisis por HPLC del material replegado indicó >95 % de conversión de la proteína reducida a un único pico correspondiente al pico de elución más temprano en la preparación desplegada. Se supuso que este producto, en virtud de su perfil de tiempo de elución, contenía los 2 enlaces disulfuro formados correctamente. (Figura 10J).

Caracterización de Tn3^{SS3+4}

El desplegamiento de Tn3^{SS3+4} por clorhidrato de guanidina (GuHCl) a pH 5,0 se determinó por fluorescencia y se comparó con datos previos para Tn3 y Tn3^{SS4}. La Cm para el desplegamiento de Tn3^{SS3+4} a pH 5,0 fue GuHCl entre 5,0 y 5,5 M (Figura 10K), que es considerablemente mayor que la Cm para tipo silvestre o Tn3^{SS4}. La potenciación significativa en estabilidad para desnaturalización inducida por GuHCl sugiere que los efectos estabilizantes de los disulfuros 3 y 4 son aditivos cuando ambos conjuntos de mutaciones se combinan en un armazón.

7.5 Ejemplo 5. Identificación, expresión y caracterización de motivos estructurales Tn3 derivados de organismos hipertermófilos

Identificación de motivos estructurales Tn3

Se realizó una búsqueda de BLAST para identificar secuencias de motivos estructurales Tn3 potenciales codificados en los 48 genomas de arqueas dentro de la base de datos del NCBI. La búsqueda se restringió adicionalmente a los genomas de organismos hipertermófilos, que se definen en el presente documento como organismos que crecen óptimamente a temperaturas de 70 °C o más. Se usó Tn3 como una secuencia de consulta, y esto condujo a la identificación de un motivo estructural Tn3 dentro de una proteína hipotética del organismo *Archaeoglobus fulgidus*. Este motivo estructural Tn3 se usó a su vez como la secuencia de consulta para identificar motivos estructurales Tn3 adicionales, y esos a su vez se usaron como secuencias de consulta. Se identificó un total de 14 secuencias codificantes de Tn3 potenciales dentro de proteínas hipotéticas de 5 organismos hipertermófilos. Las secuencias obtenidas se representan en la Sección 6 en el presente documento.

Expresión y purificación de Tn3 de hipertermófilos

Se seleccionaron cinco de las proteínas Tn3 derivadas de hipertermófilos predichas para expresión en *E. coli*. Se proporcionaron ADNc sintéticos que codificaban cada una de estas proteínas, y se optimizaron para uso codónico en *E. coli*, por GenScript Corporation según las secuencias mostradas. Cada ADNc contenía sitios de restricción Nco I y Kpn I flanqueantes, y después de digestión con estas enzimas, los insertos se clonaron en un vector pET22b modificado (Novagen) que contenía sitios Nco I/Kpn I correspondientes. Se realizó expresión recombinante de las proteínas etiquetadas con hexahistidina C terminal codificadas y purificación de lisados de *E. coli* de acuerdo con el procedimiento previamente descrito para motivos estructurales Tn3 derivados de seres humanos. El motivo estructural Tn3 de *Staphylothermus marinus*, y ambos motivos estructurales Tn3 de *Sulfolobus tokodaii* se expresaron bien, mientras que los motivos estructurales Tn3 de *Sulfolobus solfataricus* y *Archeoglobus fulgidus* se expresaron a un nivel bajo (Figura 11A).

Caracterización

La estabilidad de cada motivo estructural Tn3, con la excepción de la Tn3 de *Sulfolobus solfataricus*, se analizó por DSC, fluorescencia y tratamiento con termolisina como se ha descrito previamente (véase Ejemplo 1).

Los termogramas para motivos estructurales Tn3 de *S. tokodaii* a pH 7,0 no mostraron un pico definido correspondiente a desplegamiento térmico. En su lugar, los datos mostraron que 1Tn3 de *S. tokodaii* se precipitaba a temperaturas por encima de 70 °C, mientras que 1Tn3 de *S. tokodaii* se precipitaba por encima de 50 °C (Figura 11C). El termograma para el motivo estructural Tn3 de *A. fulgidis* mostró un pico característico con Tf para desplegamiento de 77 °C, como con el motivo estructural Tn3 de *S. marinus* que tenía una Tf de 83 °C (Figura 11B). El desplegamiento térmico no era reversible para ninguna de estas dos proteínas, que se precipitaron a temperaturas por debajo de la Tf.

El desplegamiento de los motivos estructurales Tn3 a pH 7,0 por clorhidrato de guanidina (GuHCl) se analizó por fluorescencia. Todos los motivos estructurales Tn3 requerían altas concentraciones de GuHCl para efectuar el desplegamiento, variando los puntos medios de desplegamiento de GuHCl de 4,5 M a 6 M, como se ejemplifica para el Tn3 de *S. marinus* (Figura 11D).

Se analizó la estabilidad frente a proteólisis por termolisina usando las mismas condiciones previamente descritas (véase Ejemplo 1), en las que las muestras de Tn3 45 µM se incubaron con termolisina a 0,45 µM. Todos los motivos estructurales Tn3 fueron resistentes a proteólisis, aunque se observó rápida escisión de fragmentos pequeños de 1-2 kDa para proteínas de Tn3 de *A. fulgidis*, *S. marinus* y 2Tn3 de *S. tokodaii* que se supone que son fragmentos N y/o C terminales que no forman parte del motivo estructural Tn3 principal. Una proporción significativa de los 4 motivos estructurales Tn3 principales permanecieron sin digerir después de 16 horas de tratamiento con termolisina, como se ejemplifica para la Tn3 de *S. marinus* y *S. tokodaii* (2Tn3) (Figura 11F + G).

La estabilidad de los motivos estructurales Tn3 de *S. tokodaii* también se evaluó a pH 3, en tampón de citrato sódico 20 mM, dado que este organismo es acidófilo además de ser hipertermófilo. Tanto 1Tn3 como 2Tn3 de *S. tokodaii* fueron más estables frente al desplegamiento inducido por GuHCl a pH 3,0 en comparación con pH 7,0, siendo 1Tn3 más estable que 2Tn3. El desplegamiento térmico de 1Tn3 de *S. tokodaii* a pH 3,0 en citrato sódico 20 mM también

se evaluó por DSC. A diferencia del desplegamiento térmico a pH 7,0, el termograma a pH 3,0 mostró un pico característico que indicaba una Tf de 98 °C, además, el desplegamiento a este pH fue parcialmente reversible. Una comparación del desplegamiento térmico y mediado por GuHCl para 1Tn3 de *S. tokodaii* se muestra en las Figuras 11C y 11E.

5

Aprovechamiento de la estabilidad para purificación de motivos estructurales Tn3

La estabilidad de los motivos estructurales Tn3 derivados de hipertermófilos frente a extremos de temperatura, pH y proteólisis se aprovecharon para purificar estas proteínas de lisados de *E. coli* en bruto. Las proteínas Tn3 de *S. marinus* y *S. tokodaii* (1Tn3) se expresaron en *E. coli* y se prepararon lisados solubles como se ha descrito previamente. Se calentó el lisado que contenía Tn3 de *S. marinus* a 70 °C durante 15 minutos, se retiró la proteína precipitada por centrifugación, después se analizó el sobrenadante por SDS-PAGE y se comparó con lisado que no se había calentado (Figura 11H). Como se ve en el gel, se retiró una mayoría de los contaminantes de *E. coli* por el tratamiento con calor dando como resultado una purificación significativa de la proteína Tn3. De forma similar, el tratamiento de lisado de *E. coli* soluble con termolisina a 55 °C durante 45 minutos también dio como resultado retirada significativa de proteínas derivadas de *E. coli* y purificación conjunta de la Tn3 de *S. marinus* (Figura 11I).

10

15

La estabilidad frente a pH y alta temperatura de la proteína 1Tn3 de *S. tokodaii* se utilizaron para retirar proteínas de *E. coli* de lisado en bruto. La dilución de lisado, que se tamponó a pH 7, con 4 volúmenes de citrato sódico 200 mM de pH 3,0 dio como resultado precipitación significativa de proteínas derivadas de *E. coli*. Después de retirar el precipitado por centrifugación, el sobrenadante se calentó después a 70 °C durante 15 minutos, y la proteína recién precipitada se retiró de nuevo por centrifugación. El análisis por SDS-PAGE de muestras no tratadas, tratadas con pH 3 y tratadas con pH 3/calor muestra la retirada drástica de proteínas de *E. coli* del fondo por estas 2 etapas (Figura 11J).

20

25

7.6 Ejemplo 6. Análisis de intercambio de bucle de SynBP01

Sumario

Se construyeron tres variantes diferentes de SynBP01 para ensayar si un bucle o los bucles tanto BC como FG contribuían a la interfaz de unión del Tn3 (Figura 12). Además, la mutación Tn3^{SS4} se añadió para ensayar su efecto sobre la unión con SYNAGIS®. Estas variantes difirieron en su secuencia de aminoácidos de SynBP01 de la siguiente manera:

30

"SynBP01-BC solo" - secuencia de bucle FG reemplazada con RRGDMSSNPA
 "SynBP01-FG solo" - secuencia de bucle BC reemplazada con FKPLAEIDG
 "SynBP-1 SS4" - sustitución de Ile y Ser, mostrada por la línea 4 en la Figura 10B, con Cys

35

Procedimiento experimental

40

Se transformó un fusiones de 3 fragmentos de gen codificante del vector de presentación de fagos de SynBP01 y sus 3 variantes en *E. coli*, y estas bacterias se usaron después para preparar presentación de fagos de cada una de estas proteínas Tn3 como se describe en el Ejemplo 3. Las placas se recubrieron con SYNAGIS® a 10 µg/ml en PBS pH 7,2 durante una noche a 4 °C. Las placas se bloquearon con PBS que contenía Tween-20 0,1 % v/v más leche desnatada en polvo 4 % p/v (leche al 4 % en PBST). Se añadieron reservas de fagos diluidas a la columna 1 y se realizó una dilución en serie triple en toda la placa usando leche 1 % en PBST como diluyente. Las placas se incubaron a temperatura ambiente durante 2 horas con agitación suave. Después de lavar, el fago marcado se marcó con anticuerpo conjugado con HRP anti-M13 (GE Healthcare, Piscataway, NJ) y se detectó de forma colorimétrica mediante la adición de sustrato de TMB (KPL Laboratories, Gaithersburg, MD). La absorbancia se leyó a 450 nm después de detener el desarrollo del color mediante adición de ácido fosfórico 2,5 M.

45

50

Resultados: Los datos presentados en la Figura 12 demuestran que los bucles tanto BC como FG se requieren para la unión del armazón de Tn3 con SYNAGIS®. Las variantes de SynBP01 que contenían una sustitución de uno de los bucles con la secuencia de Tn3 de tipo silvestre no mostraron unión con SYNAGIS® unido a placa. Estos resultados demuestran que al menos dos bucles del armazón de Tn3 actúan de forma cooperativa para presentar una superficie de unión funcional.

55

Además, la introducción del enlace disulfuro de SS4 en el armazón de SynBP01 anula la unión con SYNAGIS® (Figura 12). Una pérdida de actividad para la variante que contiene SS4 de SynBP01 se debe probablemente a un efecto conformacional sutil ya que no se espera que este disulfuro dé como resultado un gran cambio en la estructura de una proteína de armazón de Tn3. Esto sugiere además que la unión de SYNAGIS® depende exclusivamente de la estructura tridimensional de SynBP01.

60

7.7 Ejemplo 7. Construcción de una biblioteca de 2 bucles en el armazón de Tn3^{SS4}

Se construyó una nueva biblioteca basándose en el armazón de Tn3^{SS4} mostrado en la Figura 10B. La diversidad del bucle BC se introdujo usando PCR y la diversidad del bucle FG se introdujo usando mutagénesis de Kunkel (Tabla 5). Se construyó una biblioteca de aproximadamente $1,12 \times 10^{10}$ miembros.

Tabla 5: Oligonucleótidos degradados para la construcción de una biblioteca de Tn3^{SS4}

Oligo	Bucle	Secuencia	SEC ID
BC9	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTNNKSCGNNGSTNNKNNKNNKG GCTGTGAACTGACCTATGGC	217
BC11	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGTCTCCGBSTNNKNNKNNKNNKNNKN NKACCGCTGTGAACTGACCTATGGC	218
BC12	BC	ACCGCGCTGATTACCTGGGCGVMACCGNNKNNKNNKRRRCRGC NNKATTNNKGGTTGTGAACTGACCTATGGC	219
FG9	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKGGTNNKNNKN NKAGCAAAGAAACCTTTACCACC	220
FG10	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKNNKNNKRGCA ACCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	221
FG11	FG	TATGAAGTGAGCCTGATTTGCNNKAMSNNKNNKGGTNNKNNKA GCAACCGGCGAAAGAAACCTTTACCACC	222

Procedimiento experimental

La diversidad del bucle BC se realizó usando los cebadores BC9, 11 o 12 en la Tabla 5. Estos cebadores se hibridan en sus extremos 3' con el ADN de Tn3 y la degradación formó una biblioteca tras completar la PCR. Estos productos de PCR se amplificaron con cebadores flanqueantes para realizar un gen de Tn3 completo que se digirió después con *Nco*I y *Kpn*I y se ligó en el vector de presentación de fagos. El ADN se usó para transformar *E. coli* por electroporación. Se estimó que la diversidad final de la biblioteca de BC era de aproximadamente $3,4 \times 10^9$ miembros.

Después de electroporación, la biblioteca de BC se incubó durante 1 hora a 37 °C con agitación. Se añadió el fago auxiliar M13K07 y después de una hora las células se diluyeron hasta un volumen mayor y se cultivaron a 37 °C con agitación durante una noche. Al día siguiente se retiraron los fagos y se concentraron a partir del sobrenadante por precipitación con PEG 8000.

Se usó el fago de la biblioteca de BC para infectar *E. coli* CJ236. Después de una infección de una hora, las células se diluyeron en 2xYT con carbenicilo 100 µg/ml y cultivaron durante una noche con agitación a 37 °C. Al día siguiente se retiraron los fagos y se concentraron del sobrenadante por precipitación con PEG 8000. Se recuperó ADN monocatenario usando un kit M13 de centrifugación QIAprep de QIAgen (Valencia, CA). Este ADN actuó como el molde para mutagénesis de Kunkel usando los cebadores de FG en la Tabla 5.

7.8 Ejemplo 8. Selección de la biblioteca de Tn3^{SS4} de dos bucles con respecto a armazones específicos de SYNAGIS®

SYNAGIS® se biotiniló con 15 equivalentes molares de sulfo-NHS-SS-biotina EZ Link (*Pierce, Rockford, IL*). Después de incubación durante 1 hora a temperatura ambiente, la muestra se dializó en PBS durante una noche para retirar biotina no conjugada. Al día siguiente se bloquearon perlas de estreptavidina M280 (*Dynal, Carlsbad, CA*) y la biblioteca de dos bucles en PBS que contenía BSA 10 mg/ml durante 1 hora. Se añadieron 10 µg de SYNAGIS® biotinilado al fago bloqueado y se incubó a temperatura ambiente en un mezclador rotatorio longitudinal durante dos horas. SYNAGIS® se capturó con las perlas de estreptavidina bloqueadas durante 30 minutos en el mezclador rotatorio a temperatura ambiente. Después de tres lavados con PBST para retirar el fago no unido, el fago unido se eluyó con DTT 75 mM. Se infectaron *E. coli* XL-1 Blue con fago eluido, se co-infectaron con fago auxiliar M13K07 y se volvieron a propagar durante una noche como se ha descrito en el Ejemplo 3. Al día siguiente, los fagos se recogieron de medio de cultivo durante una noche como se ha descrito en el Ejemplo 3.

El segundo ciclo de selección fue igual que el primero con caseína usada a 10 mg/ml como el reactivo de bloqueo. Las perlas usadas para el segundo ciclo fueron partículas magnéticas recubiertas con avidina Spherotech (*Lake Forest, IL*). Para el tercer ciclo, se usó caseína como el reactivo de bloqueo y se usaron perlas de estreptavidina M280 para capturar SYNAGIS®. Para el cuarto ciclo se usó BSA como el reactivo de bloqueo y se usaron partículas magnéticas de avidina Spherotech para capturar SYNAGIS®. Después de 4 ciclos de selección, se infectaron *E. coli* con fago eluido y se sembraron en placas. Se cultivaron colonias individuales en un formato de 96 pocillos, se infectaron con M13K07, y se usó el sobrenadante de cultivo en un ELISA de fagos para identificar clones de unión a

SYNAGIS®. Se identificaron tres clones estabilizados con SS4 nuevos, cuyas secuencias se muestran en la Tabla 6.

Tabla 6: Secuencias de bucle BC y FG de armazones de unión específica a SYNAGIS®

Clon	Bucle BC	SEC ID N°:	Bucle FG	SEC ID N°:
Armazones de unión específica a SYNAGIS®				
4	SPGERIWMFTG	105	PNYERISNPA	106
5	SPSGRVILWTG	107	DNLYGRISNPA	108
6	ATPGCRNGKIVG	109	TTSVGATSNPA	110

5 7.9 Ejemplo 9. Selección de la biblioteca de Tn3^{SS4} de dos bucles con respecto a armazones específicos de TRAIL-R2

10 Se lavaron perlas de estreptavidina M280 con PBST y se añadió anticuerpo específico de fragmento Fc de cabra anti-IgG humano biotinilado (Jackson ImmunoResearch, West Grove, PA). Después de incubación de una noche a 4 °C, se añadió un anticuerpo IgG1 de control o proteína de fusión TRAIL-R2/Fc (R & D Systems, Minneapolis, MN), y de nuevo se incubó durante una noche a 4 °C. Las perlas se lavaron con PBST y se bloquearon en leche al 2 % en PBST antes de su uso.

15 La biblioteca de fagos de Tn3^{SS4} de dos bucles se incubó durante una noche a 4 °C con las perlas recubiertas con anticuerpo IgG1 de control para agotar la biblioteca de agentes de unión para las perlas o Fc de IgG1 humana. La biblioteca agotada se añadió después a perlas recubiertas con TRAIL-R2 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente en una plataforma de balanceo. Las perlas se lavaron con PBST y se añadieron a *E. coli* XL-1 Blue para propagar fagos unidos como se describe en el Ejemplo 8. Este procedimiento de selección se repitió para 4 ciclos más, excepto que se realizó incubación con perlas de anticuerpo de control para agotamiento de fondo durante 1 hora en lugar de durante una noche. Se analizaron clones individuales por ELISA de fagos después del cuarto y quinto ciclos de selección para identificar variantes de unión a TRAIL-R2.

25 Después de la secuenciación de clones positivos del ELISA de fagos de TRAIL-R2, se identificaron nueve clones de unión únicos (Tabla 7). Una q minúscula indica que estaba en esa posición un codón de terminación TAG. Una cepa supresora tal como XL-1 Blue permite la expresión de genes con un codón de terminación TAG insertando una glutamina en esta posición.

Tabla 7: Secuencias de bucle BC y FG de armazones de unión específica a TRAIL-R2

Nombre del clon	Bucle BC	SEC ID N°:	Bucle FG	SEC ID N°:
2F4	SPCIMVCLRTG	126	RRGDMSGAPA	127
5B10	SPCLFVCLRTG	128	RRGDMSGAPA	129
10D9	SPPLFCCqKTG	130	FKLTGFLYS	131
6F11	SPSVARMLLETG	132	ITLCGRGVS	133
8B3	SPPEYAFYYTG	134	VKNCGLFSNPA	135
5E5	SLAPGYRLG	136	VKLCMRGNPA	137
2H6	ATPSVFDSHIEG	138	WKHHGDAWS	139
7G11	AKPSIVNGFISG	140	DKCFGAMKS	141
6C7	AKPMSCSGYlqG	142	AKLTGWLCS	143

30 7.10 Ejemplo 10. Determinación de la afinidad de unión para un armazón específico de TRAIL-R2

35 Se inmovilizó IgG de cabra anti-Fc humano a una densidad de aproximadamente 7.700 UR en una celda de flujo de superficies de microplacas sensoras Biacore CM5 usando un protocolo de acoplamiento amino convencional (BIAcore, Inc.). Por separado, también se preparó una superficie en blanco en la misma microplaca usando el protocolo de acoplamiento idéntico, menos la proteína. Esta superficie en blanco se usó como una celda de referencia en todo el experimento y sirvió para corregir tanto con respecto a unión no específica como con respecto a ciertos artefactos constitutivos.

40 La proteína TRAIL-R2/Fc se preparó a 100 nM en tampón instrumental en (tampón HBS-EP, BIAcore, Inc., consistente en lo siguiente: tampón de HEPES 10 mM, pH 7,4, NaCl 150 mM, EDTA 3 mM y p20 0,005 %.), después

Tabla 9: Secuencias de bucles BC, DE, y FG de armazones de unión específica a TRAIL-R2

Clon	Bucle BC	SEC ID.	Bucle DE	SEC ID.	Bucle FG	SEC ID.
1E03	AAPFFGSSYISG	144	HYYVTR	145	VNLSGHMPS	146
2B04	APPMLTDSEING	147	TSSYWS	148	STLRRNAIS	149
1C12	AKPEKWDGSIYG	150	NSRHTA	151	FTPYGAKSNPA	152
1A03	APPPFSNSCIIG	153	RPGRAS	154	STGTGLPSNPA	155
1C10	SPCCPYDRYTG	156	QSSRSH	157	ITTFGHVSNPA	158
1B12	AKPRqGGSNISG	159	YHKGLH	160	PKMTGYTYS	161
2G03	SPGPLLRTTG	162	RPIPRA	163	RNRPQqSNPA	164
2D3	SPGGFqKITTG	165	VNRRNH	166	LTYKARAI	167
1C06	SPRMYTWIqTG	168	THLSGS	169	LKLTRTHIS	170
2F08	SHAGGIRIG	171	HVVqVY	172	MTPYLLGNPA	173
1B04	SPSHGVESSTG	174	HGLqRV	175	AKICGGLVS	176
3B11	SPCqLLALITG	177	NSRHYH	178	YTSTGQRSNPA	179
1D8	SPCqMLSSLTG	180	NIERPK	181	FTMTGYRSNPA	182
2A12	SPCCqEFTLTG	183	HNHHHH	184	ITDAGNKSNA	185
1E05	SPCSPCqLVTG	186	SCTRAK	187	INKLGDTSNPA	188
2F02	SPSRGGTSLTG	189	DqVRAT	190	HTNSGqPSNPA	191
1H05	SPGMFDqVRTG	192	GKYWER	193	RNQYGqHqS	194
2A11	SPPFRAGHVTG	195	VTARCq	196	TTGNGLRSNPA	197
1G11	SWAqANPGG	198	WHSITF	199	KTKVqSSNPA	200

El codón de terminación ámbar en las secuencias de nucleótidos de los clones 2D3 y 1G11 se reemplazó con un codón de glutamina por mutagénesis dirigida. Estos clones de Tn3, junto con 1E3, 1C12 y 2B4 se clonaron en un vector de expresión de *E. coli* (descrito en el Ejemplo 1) y se transformaron en células BL21 DE3. Después de inducción con IPTG, las bacterias transformadas se cultivaron durante 5 horas a 30 °C. Las células se sedimentaron, se lisaron por sonicación y la fracción soluble se purificó en una columna de HP quelante HiTrap (GE Healthcare, Piscataway, NJ). Se obtuvieron clones de Tn3 2B4 y 1C12 con buen rendimiento, sin embargo, una escasa recuperación de los tres clones restantes fue el resultado de sobreexpresión que conducía a la acumulación de las proteínas en cuerpos de inclusión. En este caso, se obtuvo posteriormente un alto rendimiento de Tn3 por solubilización de los cuerpos de inclusión clorhidrato de guanidina 6 M tamponado (GuHCl), purificando después en una columna quelante HiTrap en condiciones desnaturizantes. Todos los Tn3 se replegaron posteriormente por diálisis de muestras reducidas y desnaturizadas en tampón nativo en presencia de un par redox de cisteína/cisteína.

7.14 Ejemplo 14. Determinación de la diversidad epítópica

Se ensayó una selección de los clones presentados en fagos de la Tabla 9 para ver si las formas solubles de Tn3 1E3, 1G11, 2B4, 1C12 y 2D3 competirían por la unión con TRAIL-R2 en un ELISA de fagos. El ensayo se realizó de una manera similar a la competición por la unión en el Ejemplo 11, y los resultados se muestran en la Figura 15 A, B y C. Los clones de Tn3 soluble 1E3, 1C12 y 2D3 inhibieron significativamente la unión de la mayoría de los Tn3 unidos a fago con TRAIL R2, con la excepción de los clones 8B3 y 7G11. 1G11 soluble no compitió significativamente con ninguno de los clones unidos a fago. 2B4 soluble mostró inhibición de baja a moderada en la mayoría de los casos. El hecho de que 1E3, 1C12 y 2D3 compitan con el mismo conjunto de Tn3 unidos a fago indica que estos tres Tn3 solubles y los Tn3 unidos a fago probablemente se unían con el mismo epítipo en TRAIL-R2.

7.15 Ejemplo 15. Ensayos de viabilidad celular usando monómeros Tn3 unidos con un anticuerpo monoclonal anti-His

Colo 205 es una línea celular que es altamente sensible a destrucción inducida por TRAIL. Los Tn3 que se unen con TRAIL-R2, cuando se multimerizan mediante unión con un complejo de anticuerpo anti-etiqueta de His de ratón y anti-IgG de ratón, se ensayaron con respecto a su capacidad para inducir la destrucción de células Colo205. Las células Colo205 en 100 µl de medio RPMI 1640 con FBS al 10 % se sembraron en cada pocillo de una placa de

cultivo de 96 pocillos de fondo plano y se incubaron durante una noche a 37 °C. Se incubaron proteínas Tn3 7G11 y 5E5 (Tabla 7), 1C12, 2D3 y 1E3 (Tabla 9) y Tn3^{SS4} (Ejemplo 4) con anticuerpo anti-etiqueta de His de ratón (Penta-His; Qiagen Inc) y anti-IgG de ratón de conejo en una relación molar de 2:1:0,5. Se prepararon diluciones en serie de cada complejo de Tn3 en medio RPMI 1640 que contenía FBS al 10 % hasta una concentración final de 5 μM, 1,66 μM, 0,55 μM, 0,185 μM y 0 μM basándose en el contenido de Tn3. Después de la retirada del medio de las células cultivadas durante una noche, se añadieron 100 μl de los complejos de Tn3-anticuerpo. Cada punto de ensayo se realizó por triplicado.

Después de la adición de complejos de Tn3, las células se incubaron durante 3 días a 37 °C, después de lo cual se midió la viabilidad celular en un ensayo de viabilidad celular luminiscente CellTiter-Glo® (Promega Corp., Madison, WI) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. El porcentaje de viabilidad para las células tratadas con Tn3 de unión a TRAIL-R2 se calculó dividiendo la señal luminiscente obtenida en el ensayo CellTiter-Glo® por la señal correspondiente obtenida para células tratadas con la misma concentración de Tn de control que no se une a TRAIL-R2.

El ensayo de viabilidad celular (Figura 16) mostró que los clones de Tn3 5E5, 1C12 y 2D3, cuando se multimerizaron mediante formación de complejos con anticuerpos, fueron capaces de inhibir la viabilidad de Colo205 de una manera dependiente de dosis en relación con el tratamiento de células con un Tn3 que no se unía a TRAIL-R2. La inhibición de la viabilidad celular fue supuestamente debido a la apoptosis celular desencadenada por ligamiento con TRAIL-R2, aunque serían necesarios ensayos específicos de ruta para confirmar esto. Los clones 7G11 y 1E3 no mostraron actividad detectable a las concentraciones usadas en el ensayo. Los ensayos celulares adicionales mostraron que ninguna de las proteínas Tn3 activas afectaban a la viabilidad celular cuando se ensayaron sin un anticuerpo de captura anti-etiqueta de His. Esto demuestra que la actividad es dependiente de la presentación de los restos de unión a TRAIL-R2 multimerizados. El clon 5E5 también carecía de actividad si el anticuerpo anti-IgG no estaba presente, sin embargo, los clones 1C12 y 2D3 estaban activos en ausencia de anti-IgG, lo que sugiere que la presentación dimérica mediante captura de anticuerpo anti-etiqueta de His es suficiente para desencadenar la señalización de TRAIL-R2.

7.16 Ejemplo 16. Construcción de fusiones de anticuerpos Tn3 anti-TRAIL R2 polivalentes

Dado el requisito de presentación de complejos de Tn3 oligoméricos para efectuar la destrucción celular dependiente de TRAIL-R2, se diseñaron construcciones de fusión de Tn3 para la producción de proteínas que contenían Tn3 bi- y tetravalentes (Figura 17). Una construcción de Tn3 bivalente se diseñó por fusión de Tn3 con la región Fc de IgG1 humano, mientras que una construcción de Tn3 tetravalente de dos cadenas se diseñó basándose en la co-expresión de una fusión de Tn3-Cκ con Tn3-IGHG1, es decir, Tn3 fusionado con una región C-kappa humana, y con la región constante de cadena pesada de IgG1 humano. Esta última construcción era de naturaleza similar a un anticuerpo, excepto que las regiones variables de cadena ligera y pesada se reemplazaron con un resto de Tn3.

Las construcciones mostradas en la Figura 17A y B, se expresaron en células 293F transfectadas de forma transitoria con el vector de expresión pOE interno que codificaba cada una de las proteínas. Después de 10 días de cultivo, se recogieron los medios (250 ml) y la proteína se purificó por cromatografía de afinidad de proteína A. Se presentan en la Tabla 10 los niveles de expresión de una selección de construcciones de Tn3 multivalentes. 1C12 y un Tn3 de unión a SYNAGIS® de control llamado D1 (del Ejemplo 8 SEC ID N°: 105 y SEC ID N°: 106) se expresaron bien como la fusión de Fc, o fusiones de dos cadenas de Tn3-Cκ/Tn3-IGHG1. Las fusiones tetravalentes híbridas de 1C12 y 2D3 (1C12 unido con IGHG1, 2D3 unido con Cκ y viceversa) junto con la fusión de 2D3 Fc produjeron menores cantidades de material, mientras que la fusión de dos cadenas de 2D3-Cκ/2D3-IGHG1 no se expresaron. El análisis por SDS-PAGE de las proteínas purificadas por proteína A se muestra en la Figura 18.

Tabla 10: Producción de diferentes construcciones de fusión Fc y fusión de anticuerpo tetravalente

Nº	Nombre	Final
1	D1-Fc	15 mg
2	1C12-Fc	15 mg
3	2D3-Fc	3,5 mg
4	D1-Cκ/D1-IGHG1	13 mg
5	1C12-Cκ/1C12-IGHG1	10 mg
6	2D3-Cκ/1C12-IGHG1	4 mg
7	1C12-Cκ/2D3-IGHG1	4 mg

Ensayos de Biosensor de 1C12, 1C12Fc y 1C12 tetravalente

Se realizó una comparación cualitativa de la unión por proteínas 1C12 monomérica, 1C12-Fc y 1C12-C κ /1C12-IGHG1 inyectando muestras de cada una de estas proteínas sobre una microplaca de TRAIL-R2 en un instrumento biosensor Attana. Como se muestra en la Figura 19, los complejos de TRAIL-R2 con formas oligomerizadas de 1C12 muestran una mejora sustancial en afinidad en relación con 1C12 monomérica. La especificidad de unión se demostró por inyección de proteínas D1-Fc y D1-C κ /D1-IGHG1 que no interactuaban con TRAIL-R2 inmovilizado. Las tasas de disociación para las diferentes construcciones de 1C12 siguieron el orden 1C12 > 1C12-Fc > 1C12-C κ /1C12-IGHG1, coherentes con las construcciones bi- y tetravalentes que mostraban avidez en su interacción con TrailR2.

7.17 Ejemplo 17. Ensayos de viabilidad celular usando proteínas de fusión de Tn3 anti TRAIL-R2 polivalentes

Se sembraron células H2122 en placas de 96 pocillos a una densidad de 10000 células/pocillo en 50 μ l de medio completo (medio RPMI 1640 complementado con FBS al 10 %). Las células se incubaron durante una noche a 37 °C. Al día siguiente, las proteínas de fusión Tn3 polivalentes (fusiones Fc o construcciones tetravalentes de dos cadenas) solas o en combinación con Fc de cabra anti-humano se diluyeron en serio en medio completo. Para conseguir una curva de dosis, se usó un esquema de dilución triple (la mayor concentración final fue de 3,6 μ M). El Fc de cabra anti-humano se añadió a una relación molar 1:2 (es decir, la mitad de la concentración de la molécula que contenía Tn3). Se prepararon Tn3 y Fc anti-humano solos y en combinación a una concentración 2X (se añadieron 50 μ l de cada tratamiento por pocillo). Todos los tratamientos se realizaron en pocillos por triplicado. Se usó ligando TRAIL disponible en el mercado (Chemicon Cat N° GF092) como un control positivo para muerte celular inducida por Trail. Las concentraciones finales para Trail fueron 1, 0,1 y 0,01 nM. Después de 48 h, se usó el kit CellTiter-Glo de Promega para determinar la viabilidad celular. Brevemente, se permitió que las células se equilibraran durante aproximadamente 10 min a temperatura ambiente. Se mezclaron el tampón de CellTiter-Glo y sustrato para preparar el reactivo de CellTiter-Glo como se indica por el fabricante. Cada pocillo recibió 100 μ l del reactivo de CellTiter-Glo y la placa se incubó durante 10 min a temperatura ambiente antes de leer la luminiscencia en un lector de placas Wallac. Los resultados se muestran en las Figuras 20-22. Cada uno de los 1C12 y 2D3 que contenían construcciones polivalentes fueron capaces de inhibir la viabilidad de células H2122, supuestamente activando la apoptosis dependiente de TRAIL-R2, además esta actividad no dependió de la reticulación de mayor orden mediante coordinación con un anticuerpo anti-Fc. La forma tetramérica de 1C12 fue más potente en el ensayo celular que su forma dimérica (compárese Figuras 20 y 21), coherente con que la actividad de destrucción sea una función de la valencia. El entrecruzamiento con Fc no aumentó la potencia de destrucción y parecía reducir la actividad de las construcciones 1C12 monoespecíficas. Ni las proteínas D1-Fc ni D1-C κ /D1-IGHG1 de control, que no se unían con TRAIL-R2, afectaron a la viabilidad celular. Las construcciones tetravalentes biespecíficas (Figura 22) tuvieron la mayor potencia en la inhibición de la viabilidad celular de H2122, y esto aumentó ligeramente si se co-incubaron con anticuerpo anti-Fc. La mejora en la actividad para las construcciones biespecíficas de 2D3/1C12 en relación con 1C12-C κ /1C12-IGHG1 monoespecíficas puede deberse a la potencia superior para las unidades de Tn3 2D3 frente a 1C12, o debido a que 2D3 y 1C12 reconocen epítomos diferentes en TRAIL-R2 lo que podría dar como resultado agregación de mayor orden de TRAIL-R2 de superficie celular.

7.18 Ejemplo 18. Secreción bacteriana de armazones de Tn3

Se diseñó un vector de expresión bacteriana para secretar el armazón de Tn3 plegado correctamente en *E. coli*. Este sistema permitiría la formación de enlaces disulfuro correctos dentro de Tn3 y por lo tanto evitaría el proceso de replegamiento que se requiere para material expresar intracelularmente como se ha descrito en el Ejemplo 4. Para crear un vector de secreción, se modificó un vector de expresión de Tn3 intracelular, similar al descrito en el Ejemplo 4, pero que contenía un promotor de Ptac en lugar de T7, por inserción de la secuencia del péptido señal de proteína de unión a oligopéptido de *E. coli* (oppA). Esta secuencia señal, clonada inmediatamente cadena arriba de Tn3, se seleccionó debido a que oppA es una proteína de *E. coli* altamente expresada. Un marcador de His 8x extendido estaba codificado cadena abajo de Tn3 para facilitar la purificación. Para simplificar la transferencia de casetes de Tn3 entre este y otros plásmidos, también se creó una forma modificada de este vector introduciendo un sitio Nco I en el extremo 3' de la secuencia señal de oppA. Esta modificación da como resultado una sustitución de un único aminoácido (L25M) en la penúltima posición dentro de la secuencia señal oppA (Figura 23). Estos vectores se denominaron pSec-oppA-Tn3 y pSec-oppA(L25M)-Tn3.

Se inoculó medio Superbroth que contenía carbenicilio (100 μ g/ml, glucosa 1 %) con cultivos de *E. coli* BL21 DE3 transformados con pSec-oppA-Tn3 y pSec-oppA(L25M)-Tn3. Los cultivos se dejaron crecer a 37 °C hasta una DO de 0,5 – 0,8, después se indujeron con IPTG 0,2 mM. Después de agitar a 37 °C durante 5 horas, las células se separaron del medio por centrifugación. Se prepararon extractos periplásmicos resuspendiendo el sedimento celular en un volumen 1/10 de tampón de extracción helado (Tris 10 mM, pH 8 y EDTA 1 mM), incubando en hielo durante 10 min, centrifugando después para retirar las células. Se analizaron muestras de extracto periplásmico y medios por SDS-PAGE. Se pudo detectar Tn3 en fracciones tanto de medio como periplásmicas, y los niveles de expresión fueron similares para construcciones que contenían los péptidos de tipo silvestre o de señal oppA L25M (Figura 24A). Como pSec-oppA(L25M)-Tn3 contiene un sitio de clonación de Tn3 5' conveniente, esta construcción se prefiere para la expresión de clones de Tn3 derivados de bibliotecas de presentación.

Se efectuó la purificación de Tn3 del medio precipitando la proteína secretada con sulfato de amonio 65 % p/v, resuspendiendo el sedimento en tampón de Tris 50 mM pH 8, purificando después en una columna quelante HiTrap cargada con Ni²⁺ como se ha descrito previamente. Se muestra el análisis de SDS-PAGE de la muestra purificada en la Figura 24B. Se analizó Tn3 purificado por HPLC de fase inversa (como se describe en el presente documento), con o sin pretratamiento con DTT para reducir cualquier enlace disulfuro. Tn3 se eluyó como un único pico, y el tipo de elución se desplazó después de la reducción con DTT lo que indica que la muestra purificada contenía un enlace disulfuro como se esperaba (Figura 23C). El SDS-PAGE no reductor y la cromatografía de exclusión por tamaño de este material fueron coherentes con una especie monomérica individual, y el análisis espectrométrico de masas proporcionó un peso molecular de 10.896 Da que está a una distancia de 3 Da del peso molecular predicho para la secuencia que contiene disulfuro, madura, mostrada en la Figura 28A.

Finalmente, el nivel de expresión de Tn3 secretada en medios se determinó en un ensayo biosensor. Se movilizó anticuerpo anti-etiqueta de His (Penta-His, Qiagen Inc.) en una microplaca sensora de carboxilo A100 Attana mediante acoplamiento de amina convencional. Se transformaron *E. coli* BL21 DE3 con pSec-oppA(L25M)-Tn3, y se indujo a la expresión proteica como se ha descrito anteriormente. Se inyectaron diluciones de medio clarificado sobre la microplaca, y se compararon los niveles de Tn3 que contenía etiqueta de His unido con los generados de inyección de patrón de Tn3 purificado. Mediante esta técnica, el nivel de Tn3 detectado en medio en bruto fue de 250 mg/l.

7.19 Ejemplo 19. Generación de Fusión de SynBP01-Fc

Sumario: Se generó una fusión quimérica de una Tn3 de unión a SYNAGIS® y la región Fc de IgG1.

Métodos: Expresión de SynBP01-Fc

Como se ha descrito anteriormente, SynBP01 es una variante de Tn3 que se ha identificado de una biblioteca de variantes de Tn3 con bucle BC y bucle FG distribuidos al azar frente a SYNAGIS®. Se introdujeron sitios de NheI y KasI flanqueantes por mutagénesis silenciosa y se utilizaron para subclonar esta construcción en el vector pOE-Fc. El vector pOE-Fc contiene los dominios CH2 y CH3 de IgG1 Fc, que está 3' de los sitios de restricción de KasI. El vector generado por subclonación de SynBP01 en pOE-Fc se nombró pOE-SynBP01.

Se transfectaron células 293EBNA (120 ml de volumen de cultivo) con pOE-SynBP01 mediante Lipofectamine 2000 (Invitrogen), usando métodos convencionales. Se recogió el sobrenadante 10 días después de la transfección, y se purificó SynBP01-Fc mediante cromatografía de afinidad de Proteína A (GE Healthcare), eluyendo con glicina 0,1 M, NaCl 0,15 M, pH 3,08, y neutralizando con tampón de Tris-HCl a pH 8. La muestra purificada se dializó después frente a PBS tamponado a pH 7,2. El rendimiento de SynBP01-Fc purificado de 4 mg, lo que indica un nivel de expresión de 33 mg/l.

Análisis por BIAcore de SynBP01-Fc

El análisis de BIAcore de esta molécula se realizó en BIAcore 3000 (GE Healthcare), como se ha descrito en el Ejemplo 3. Este experimento se diseñó para determinar si el SynBP01-Fc era competente para unirse con SYNAGIS, y para detectar cualitativamente la diferencia en afinidad aparente entre el agente de unión de SynBP01 original y la fusión con Fc.

Resultados: Cuando se inyectó a concentraciones 1 µM equivalentes, SynBP01-Fc produjo un aumento aproximadamente 6 veces en unidades de respuesta totales en comparación con SynBP01 (Figura 26). Además, SynBP01-Fc tuvo una tasa de disociación sustancialmente reducida en relación con SynBP01, debido principalmente a la avidéz aumentada de la fusión Fc bivalente. Aunque la constante de disociación (K_D) de la interacción de SynBP01-Fc/SYNAGIS® no se determinó en este experimento, ya que la superficie de unión no se había preparado para un análisis cinético, resulta evidente que la K_D se mejora desde la K_D de 16 µM vista con la interacción SynBP01/SYNAGIS® en el Ejemplo 3.

7.20 Ejemplo 20. PEGilación específica de sitio del armazón de STn3

La modificación de una proteína mediante PEGilación se usa frecuentemente para mejorar sus propiedades terapéuticas, tales como inmunogenicidad reducida, farmacocinética mejorada y biodisponibilidad aumentando el tamaño eficaz de proteínas pequeñas para evitar la eliminación renal. La modificación específica de sitio por PEG, es decir, unión en uno o más restos específicos en la proteína, puede evitar la inactivación de la actividad de proteínas diana que podría resultar de otro modo de la unión de PEG en o cerca de un sitio funcional dentro de una proteína. Para demostrar la PEGilación específica de sitio de una proteína de armazón de tipo Tn3, se modificó técnicamente un resto de cisteína en el extremo C terminal de STn3 (1Tn3 de *S. tokodaii* del Ejemplo 5). Ya que la secuencia de tipo silvestre de STn3 no contiene cisteína, el tratamiento del armazón modificado técnicamente con una reacción de PEGilación específica de Cys conduciría a unión específica de sitio de PEG. STn3 se había expresado previamente como una fusión con una etiqueta His 6x C terminal, en una variante del vector pET-22b

(Novagen). Este vector contiene la secuencia enlazadora GGGLE entre la proteína y la etiqueta de His. Se usó una variación en el método de mutagénesis QuikChange (Stratagene) para mutar el resto de leucina en el enlazador a una cisteína, que puede modificarse por un reactivo de maleimida. Esta proteína se denomina STn3(CTC), y se expresó y se purificó a partir de células BL21(DE3) usando una columna IMAC como se ha descrito en el Ejemplo 1.

El reactivo de PEGilación, Sunbright ME-200MA (NOF), se añadió a STn3(CTC) a un exceso molar 4:1 (reactivo de PEG:proteína) y se permitió que se incubara a temperatura durante 72 horas. La PEGilación de proteína se controló por SDS-PAGE (Figura 27A, carril 5), que reveló que la mayor parte de la proteína se había PEGilado por una única fracción de PEG. Como la PEGilación típicamente tiene el efecto de enmascarar la carga superficie de una proteína, el pH para cromatografía de intercambio catiónico se redujo de 6,0 (para purificación de tipo silvestre) a 4,5, para asegurar que la proteína se unía eficazmente con la columna. La proteína se purificó en una columna SP XL de 1 ml (GE Healthcare) usando ácido acético 50 mM, pH 4,5. Se usó un gradiente de cloruro sódico para eluir la proteína, produciéndose el pico de proteína a NaCl aproximadamente 120 mM. Se demuestra la retirada exitosa de STn3(CTC) no PEGilado residual del producto PEGilado por análisis de SDS-PAGE de fracciones obtenidas de las fracciones de purificación de intercambio catiónico que se muestran en la Figura 27B, carriles 1-5.

7.21 Ejemplo 21. Análisis de bucles AB, CD y EF y diseño de biblioteca distribuida al azar

Para diseñar bibliotecas de Tn3 que se distribuyeron al azar en los bucles AB, CD y EF, se realizó un análisis bioinformático para derivar información con respecto a la diversidad de longitud y de secuencia de estos bucles en dominios Fn3 de origen natural. Debido a la dificultad en la predicción de las regiones de bucle AB, CD y EF basándose en la información de secuencia solamente, las tres estructuras dimensionales de 103 dominios Fn3 diferentes de la base de datos de pdb se superpusieron, y esto se usó para alinear las secuencias de aminoácidos correspondientes (datos no mostrados). Las localizaciones de las regiones de bucle se usaron para extraer información de diversidad de longitud y de secuencia para cada uno de los bucles. La variación en la longitud para cada uno de los bucles AB, CD y EF se muestra gráficamente en la Figura 28.

Como con los bucles en el lado opuesto de la molécula de Tn3, los bucles AB, CD y EF varían en su longitud y composición de secuencia para diferentes dominios Fn3. Los bucles AB y CD son habitualmente de 5 a 9 aminoácidos de longitud, aunque se producen excepciones para algunos dominios Fn3 que tienen bucles AB y/o CD más largos o más cortos que esto. La longitud más común dentro de este conjunto de datos fue de 6 restos para el bucle CD (31 % de secuencias) y 7 restos para el bucle AB (61 % de secuencias). Se produce variación de longitud menos frecuentemente para el bucle EF, y se observa un bucle de 8 restos más habitualmente (80 % de secuencias). Los bucles tanto AB y CD muestran diversidad significativa de secuencia y no muestran referencias claras para aminoácidos específicos en posiciones particulares. Una excepción es la posición final en el bucle AB que es con frecuencia Ser o Thr (58/103 secuencias). Las secuencias de bucles EF revelan aminoácidos fuertemente preferidos en posiciones específicas, aunque esto se restringe a los que son de 8 restos de longitud. Una Leu en la posición 3 dentro de estos bucles está fuertemente conservada (76/82 secuencias), y ya que la cadena lateral de este resto está interna en cada una de las estructuras, es probable que sea importante para la integridad estructural del armazón. También se observa habitualmente un resto Pro en la posición 5 (44/82 secuencias), mientras que Gly, Asn, Asp y Ser están con frecuencia en la posición 2 (71/82 secuencias) y Thr en la posición 7 (40/82).

Una consideración práctica adicional en el diseño de estas bibliotecas de Tn3 fue identificar una alternativa al esquema de codón mixto "NNK" (N = A, G, T, C; K = G, T) típicamente usado en oligonucleótidos degradados para codificar cualquier aminoácido. Aunque la mezcla "NNK" proporciona 32 codones diferentes que codifican los 20 aminoácidos, no se codifican igualmente (Tabla 11). Por ejemplo, 3/32 codones en el esquema "NNK" codifican Leu (CTG, CTT, TTG), pero solamente 1/32 codifica Asp (GAT). Además, la mezcla "NNK" codifica un codón de parada (TAG) y un codón Cys (TGT), ninguno de los cuales es deseable cuando se generan bibliotecas sin tratamiento previo. Al considerar un esquema alternativo, se observa el hecho de que se han descrito bibliotecas de anticuerpos sintéticos que codifican secuencias de CDR compuestas de un pequeño subconjunto de aminoácidos. Se ha mostrado que las bibliotecas de anticuerpos con CDR compuestas de solamente 4 aminoácidos (Tyr, Ala, Asp, Ser) o incluso un par binario (Tyr, Ser) producen mAb de alta afinidad específicos para antígenos proteicos (Fellouse *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2004, 101: 12467-72; J. Mol. Biol. 2005, 348: 1153-62). De forma similar una biblioteca de proteínas de armazón con secuencias de bucle distribuidas al azar que comprendían solamente Tyr y Ser también produjo agentes de unión específicos para una diana proteica (Koide *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007, 104: 6632-7). Aunque las bibliotecas que contienen conjuntos altamente restringidos de aminoácidos son capaces de producir proteínas de unión específica, es probable que la diversidad de agentes de unión que se obtienen de dicha biblioteca esté limitada. Los inventores diseñaron por lo tanto un esquema de codón mixto "NHT" alternativo para introducir diversidad de una biblioteca de Tn3 (H = A, T, C). Las mezclas "NHT" codifican un subconjunto razonable de los 20 aminoácidos, pero evita las desventajas descritas con los codones mixtos "NNK" (Tabla 12). Este esquema genera 12 codones que codifican 12/20 aminoácidos, es decir, cada codón codifica un único aminoácido. Además, no hay codones de terminación o Cys.

Tabla 11. Aminoácidos codificados por mezclas de codones "NNK"

ES 2 533 874 T3

A	AAG = Lys	ATG = Met	ACG = Thr	AGG = Arg	G
	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr	AGT = Ser	T
G	GAG = Glu	GTG = Val	GCG = Ala	GGG = Gly	G
	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala	GGT = Gly	T
C	CAG = Gln	CTG = Leu	CCG = Pro	CGG = Arg	G
	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro	CGT = Arg	T
T	TAG = STOP	TTG = Leu	TCG = Ser	TGG = Trp	G
	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser	TGT = Cys	T
	A	T	C	G	

Tabla 12. Aminoácidos codificados por mezclas de codones "NHT"

A	AAT = Asn	ATT = Ile	ACT = Thr
G	GAT = Asp	GTT = Val	GCT = Ala
C	CAT = His	CTT = Leu	CCT = Pro
T	TAT = Tyr	TTT = Phe	TCT = Ser
	A	T	C

5 El diseño final para bibliotecas de Tn3 que contienen bucles AB, CD y EF distribuidos al azar se muestra posteriormente. Este diseño incorpora diversidad observada en secuencias de Fn3 naturales, dos longitudes diferentes para los bucles AB y CD, y usa mezclas de codones "NHT".

Bucle AB (7 y 9 restos):

10 Secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de Tn3: KDVTDDT

Secuencia de aminoácidos de biblioteca (7 aa): Kxxxxxa

Secuencia de ADN: AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST (SEC ID N°: 262)

15 Secuencia de aminoácidos de biblioteca (9 aa): Kxxxxxxxa

Secuencia de ADN: AAA-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-RST (SEC ID N°: 263)

20 Bucle CD (7 y 9 restos):

Secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de Tn3: KDVPDGR

Secuencia de aminoácidos de biblioteca (7 aa): xxxxxxx

25 Secuencia de ADN: NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT (SEC ID N°: 264)

Secuencia de aminoácidos de biblioteca (9 aa): xxxxxxxxx

30 Secuencia de ADN: NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT-NHT (SEC ID N°: 265)

Bucle EF (8 restos):

Secuencia de aminoácidos de tipo silvestre de Tn3: GNLPDTE

35 Secuencia de aminoácidos de biblioteca: xblxPxcx

Secuencia de ADN: NHT-RRB-CTG-NHT-CCG-NHT-RBT-NHT

40 Códigos de aminoácidos: x = N/D/H/Y/I/V/L/F/T/A/P/S; a = S/T/A/G; b = N/K/S/R/D/E/G; c = I/T/S/V/A/G

Códigos de nucleótidos: N = G/A/T/C; H = A/T/C; R = A/G; S = G/C; B = T/C/G

7.22 Diseño, expresión y caracterización de variantes de Tn3 modificadas técnicamente con carga con estabilidad potenciada

Diseño de variantes de Tn3 modificadas técnicamente con carga

La estabilidad de Tn3 al desplegamiento térmico es mayor a pH 5 en comparación con pH 7 y mayor en tampón de pH 7 que contiene sal 1 M que el mismo tampón sin sal (Fig. 29). Ya que las concentraciones altamente salinas pueden enmascarar la carga de proteína superficial, aunque la acidificación con tampón puede dar como resultado neutralización de cadenas laterales de Asp y Glu con carga negativa, estas observaciones sugieren que la carga negativa superficial en Tn3 tiene un efecto desestabilizador.

Para explorar el potencial para potenciar la estabilidad de Tn3 mediante modificación técnica de la carga de superficie, las localizaciones de las cadenas laterales de Asp y Glu se mapearon en la estructura tridimensional de Tn3. A partir de un total de 18 restos de Asp y Glu contenidos en Tn3 (SEC ID 1), se diseñó un panel de 8 mutantes en los que se reemplazaban restos de Asp o Glu individuales con los restos isotéricos neutros Asn o Gln (Figura 30A). La selección de los 8 sitios de sustitución estaba desplazada hacia restos Asp y Glu que estaban en proximidad estrecha a otro Asp o Glu, ya que la proximidad de cargas similares puede contribuir a la desestabilización mediante repulsión electrostática.

Generación de mutante de carga y expresión recombinante

Se generaron construcciones de expresión para mutantes de Tn3 por mutagénesis dirigida de la construcción de expresión de tipo silvestre como se ha descrito previamente. La proteína recombinante se expresó en *E. coli* y se purificó por cromatografía de afinidad de quelado de níquel inmovilizado como se ha descrito previamente. Todos los mutantes de Tn3 se expresaron a altos niveles y se purificaron fácilmente, aunque la preparación del mutante E54Q contenía algunas impurezas como se demostró por análisis de SDS-PAGE (Fig. 30B).

Caracterización de la estabilidad

El desplegamiento de mutantes de carga por urea se controló por fluorescencia intrínseca como se ha descrito previamente para Tn3 de tipo silvestre. Para facilitar una comparación de los perfiles de desplegamiento inducido por urea de mutantes de tipo silvestre y de carga de Tn3, la intensidad de emisión de fluorescencia relativa a 360 nm se representó en función de una concentración de urea para cada proteína.

Una comparación de desplegamiento inducido por urea a pH 7,0 para Tn3 de tipo silvestre y los diversos mutantes de carga (Fig. 31A) mostró que 3 de los mutantes (D40N, E54Q y E67Q) tuvieron la misma o ligeramente menor estabilidad que la proteína de tipo silvestre. Cinco de los mutantes (E33Q, D49N, E52Q, D53N, E86Q) mostró aumentos pequeños pero claramente definidos en los puntos medios de desplegamiento inducido por urea, lo que sugiere un aumento en la estabilidad proteica. La concentración de urea requerida para inducir el 50 % del desplegamiento fue aproximadamente 0,5 M mayor para los 3 mejores mutantes (E33Q, D49N y E86A) que para Tn3 de tipo silvestre.

Preparación y Análisis de Variantes de Tn3 que contenían múltiples mutaciones de carga

Dada la estabilidad potenciada de varias variantes de carga de Tn3, se prepararon nuevas variantes de Tn3 que contenían mutaciones de carga combinadas para investigar si podrían obtenerse mejoras aditivas en la estabilidad. Para este fin, se prepararon tres nuevas variantes que contenían mutaciones emparejadas (D49N/E86Q y E33Q/D49N) o una mutación triple (E33Q/D49N/E86Q). Estos mutantes se expresaron de forma recombinante y se purificaron, y sus perfiles de desnaturalización de urea se caracterizaron por fluorescencia.

Cuando se compararon con los mutantes de carga individual de Tn3, cada uno de los mutantes de combinación mostraron potenciación adicional de la estabilidad como se determina por el aumento en la concentración de urea requerida para desplegamiento (Fig. 31B). Aunque el punto medio del desplegamiento inducido por urea de los mutantes de carga individual E33Q, D49N y E86Q se produjo a urea ~2,5 M, el punto medio de desplegamiento para cada uno de los mutantes D49N/E86Q, E33Q/D49N y E33Q/D49N/E86Q se correspondía con urea ~3,0 M. Esto indica que el reemplazo combinado de restos de Asp o Glu desestabilizantes múltiples puede conducir a una mejora aditiva en la estabilidad de Tn3, aunque en los ejemplos estudiados en el presente documento, un mutante triple no fue más estable que un mutante doble.

Para caracterizar adicionalmente las estabildades de los mutantes de carga de combinación en relación con Tn3 de tipo silvestre, estas proteínas se analizaron por DSC a pH 7 como se ha descrito previamente. Este análisis confirmó adicionalmente que las mutaciones de carga condujeron a una mejora en la estabilidad del armazón de Tn3. Aunque la proteína de tipo silvestre tenía un punto medio de desplegamiento térmico (T_m) de 45 °C, el mutante de Tn3 E33Q/D49N tuvo una T_f de 50 °C, mientras que los mutantes D49N/E86Q y E33Q/D49N/E86Q tuvieron T_f de 52 °C (Fig. 32).

REIVINDICACIONES

1. Un armazón polipeptídico recombinante que comprende:

- 5 I. siete dominios de cadena beta designados A, B, C, D, E, F y G;
 II. unidos a seis regiones de bucle, en las que una región de bucle conecta cada cadena beta y se designa bucle AB, BC, CD, DE, EF y FG;
 III. en el que al menos una región de bucle varía por delección, sustitución o adición de al menos un aminoácido de las regiones de bucle de SEC ID N°: 1; y
 10 IV. en el que dicho armazón comprende al menos un enlace disulfuro para unir dos cualesquiera de dichos siete dominios de cadena beta, en el que dicho armazón comprende las secuencias de cadena beta del tercer dominio de Fibronectina III de tenascina C, Tn3^{SS3} (SEC ID N°: 65), o Tn3^{SS4} (SEC ID N°: 66); o en el que dicho armazón comprende al menos dos enlaces disulfuro para unir dos cualesquiera de dichos siete dominios de cadena beta, en el que dicho armazón comprende las secuencias de cadena beta de Tn3^{SS3+4} (SEC ID N°: 67).
 15

2. El armazón de la reivindicación 1, en el que el armazón se une con una diana.

3. El armazón de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho bucle BC comprende:

- 20 a. 9 aminoácidos que tienen una secuencia de S-X-a-X-b-X-X-G, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa prolina o alanina y en la que (b) representa alanina o glicina; o
 b. 11 aminoácidos que tienen una secuencia de S-P-c-X-X-X-X-T-G, en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (c) representa prolina, serina o glicina; o
 25 c. 12 aminoácidos que tienen una secuencia de A-d-P-X-X-X-e-f-X-I-X-G, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (d) representa prolina, glutamato o lisina, en la que (e) representa asparagina o glicina, y en la que (f) representa serina o glicina.

4. El armazón de la reivindicación 1 o 2, en el que dicho bucle FG comprende:

- 30 a. 9 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-G-X-X-X-S, en la que X representa cualquier aminoácido, y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina; o
 b. 10 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-X-X-b-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido, en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina y en la que (b) representa serina o glicina; o
 35 c. 11 aminoácidos que tienen una secuencia de X-a-X-X-G-X-X-S-N-P-A, en la que X representa cualquier aminoácido y en la que (a) representa asparagina, treonina o lisina.

5. El armazón de una cualquiera de las reivindicaciones 2 a 4, en el que dicha diana es un antígeno de superficie celular, un antígeno soluble, un antígeno inmovilizado, un antígeno inmunosilencioso, un antígeno intracelular, un antígeno intranuclear, un autoantígeno, un antígeno no propio, un antígeno de cáncer, un antígeno bacteriano o un antígeno viral.

6. El armazón de cualquier reivindicación precedente, en el que dicho armazón se conjuga con un agente heterólogo, en el que dicho agente se selecciona del grupo que consiste en: otro armazón, polietilenglicol (PEG), albúmina de suero humano (HSA), una región Fc de un anticuerpo, una molécula IgG, un péptido de unión, fármaco citotóxico, radiomarcador, agente de captura de imágenes, etiqueta de His, biotina, etiqueta Flag, ácido nucleico y una citocina.

7. Una armazón multimérico que comprende al menos armazones de una cualquiera de las reivindicaciones precedentes, en el que dichos armazones están unidos con otro armazón, una molécula IgG o fragmento de la misma, una región Fc, un dominio de dimerización, un entrecruzamiento químico, un enlace disulfuro o un enlazador de aminoácidos.

8. Una biblioteca de presentación de polipéptidos que comprende un armazón de una cualquiera de las reivindicaciones 1 a 5, en el que al menos una región de bucle está distribuida al azar con respecto a longitud y/o diversidad.

9. La biblioteca de presentación de polipéptidos de la reivindicación 8, en la que dicho armazón se presenta en la superficie de un ribosoma, bacteriófago, virus, bacteria o levadura.

10. Un método para obtener un armazón polipeptídico que se une con una diana, comprendiendo dicho método (a) poner en contacto un ligando diana con la biblioteca de la reivindicación 8 o 9 en condiciones que permiten que se forme un complejo de armazón:ligando diana, y (b) obtener del complejo, el armazón que se une con el ligando diana.

11. El método de la reivindicación 10, que comprende además distribuir al azar al menos un bucle de dicho armazón de la proteína obtenida de la etapa (b) para generar un armazón distribuido al azar adicionalmente y repetir las etapas (a) y (b) usando dicho armazón distribuido al azar adicionalmente.
- 5 12. Una composición estéril, sin pirógenos, que comprende un armazón de la reivindicación 1 y un vehículo o excipiente farmacéuticamente aceptable.

Figura 1

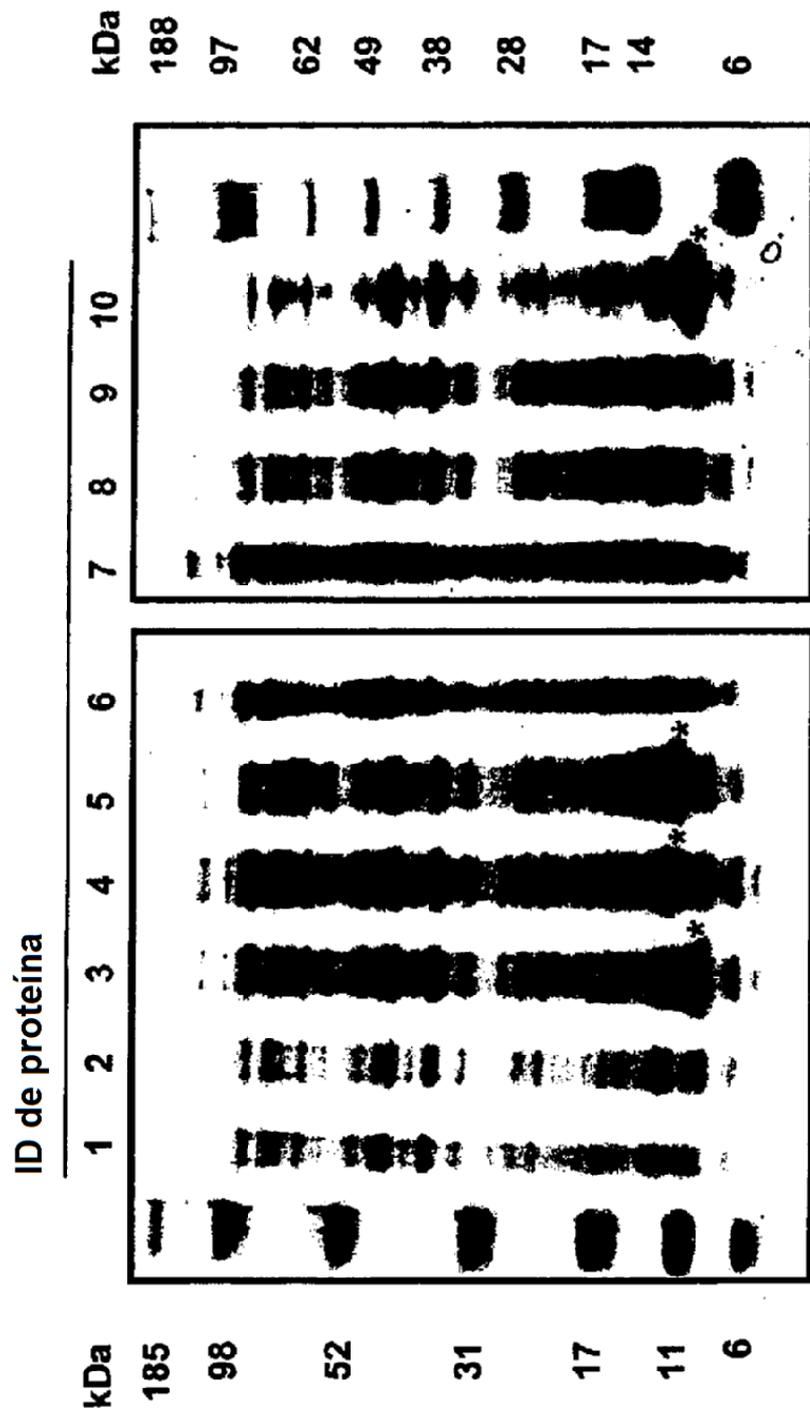


Figura 2.

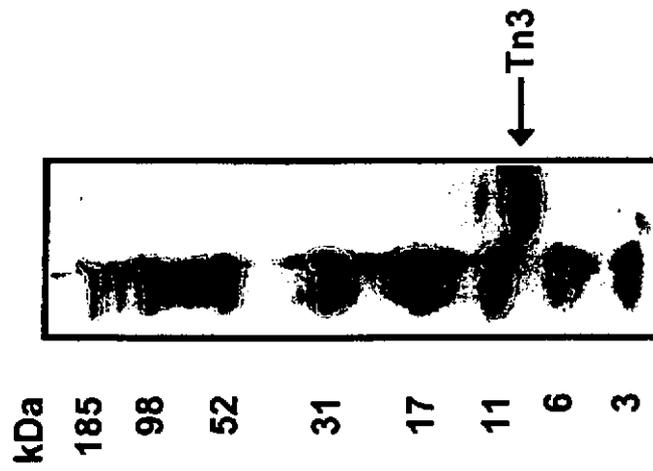


Figura 3A.

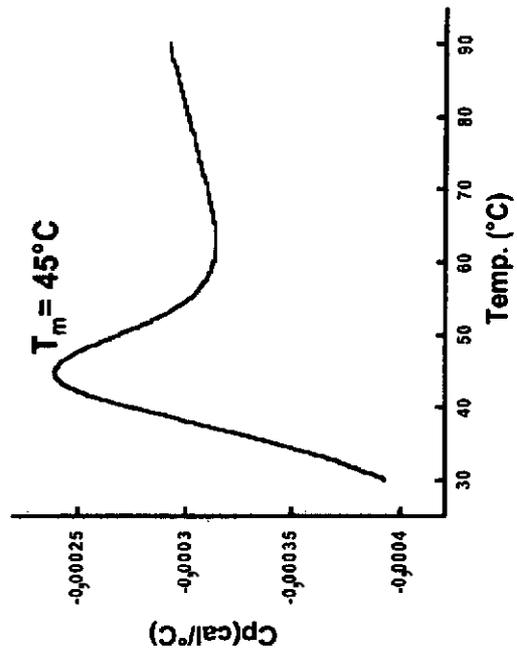


Figura 3B.

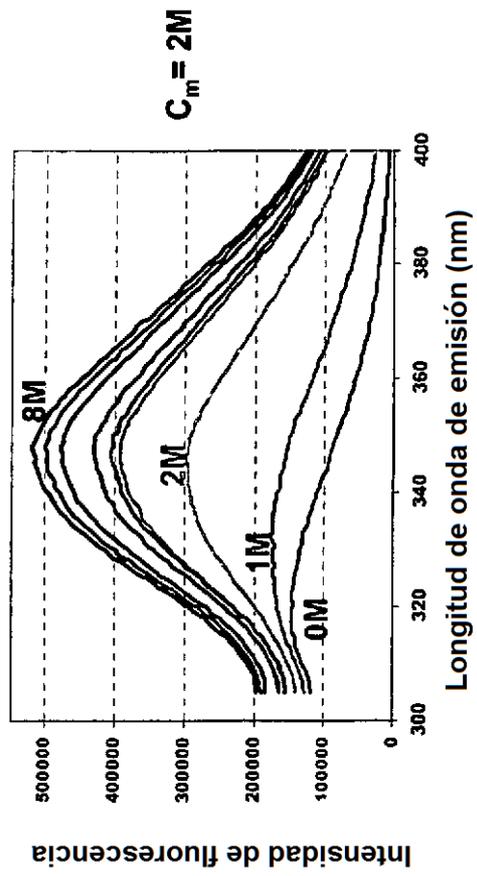


Figura 3C.

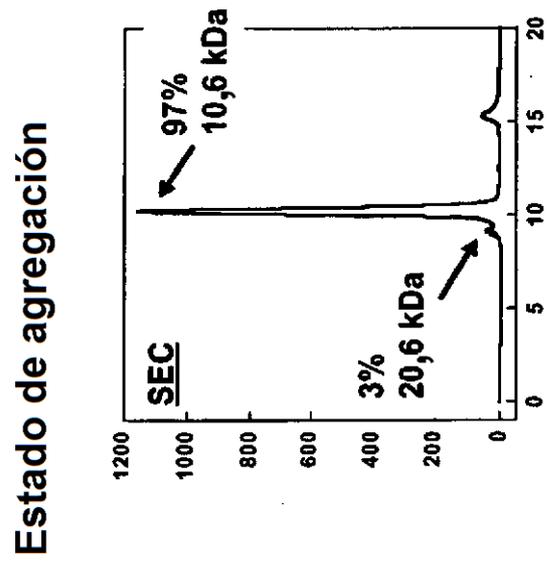


Figura 4A.

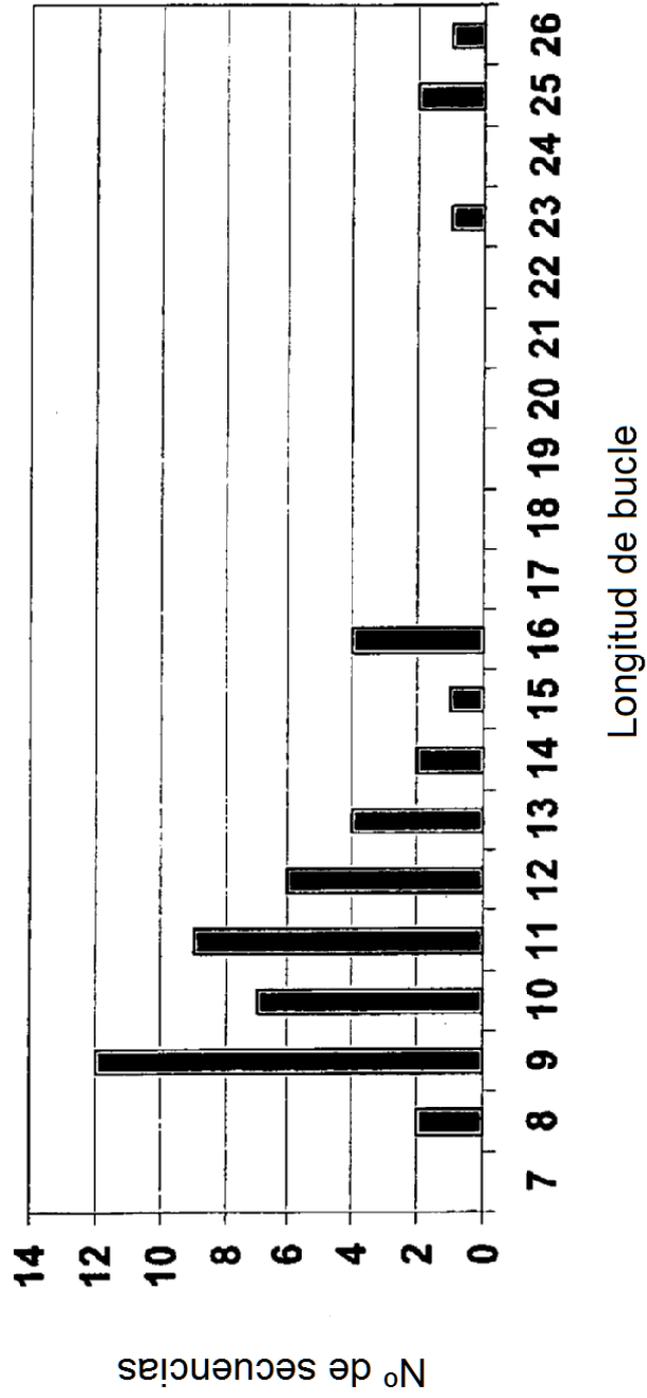


Figura 4B.

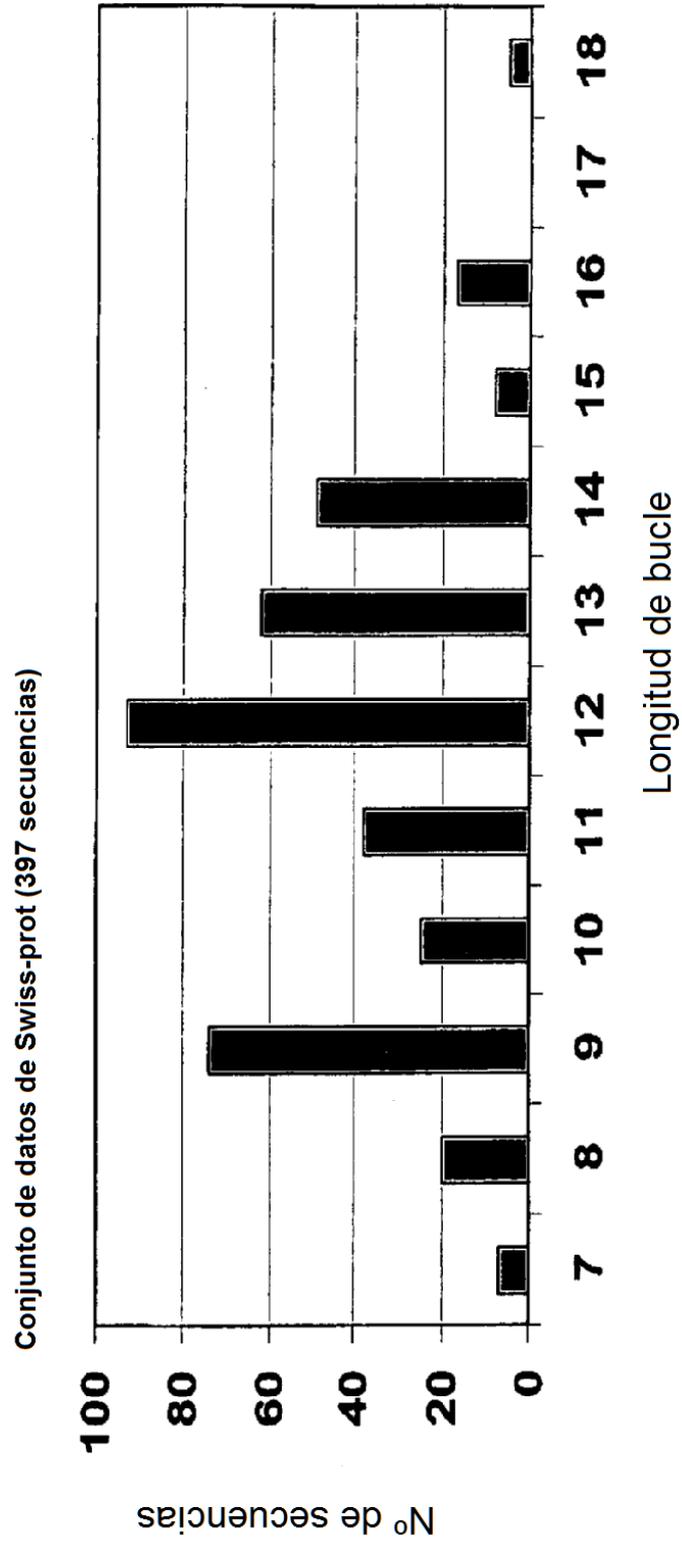


Figura 5.

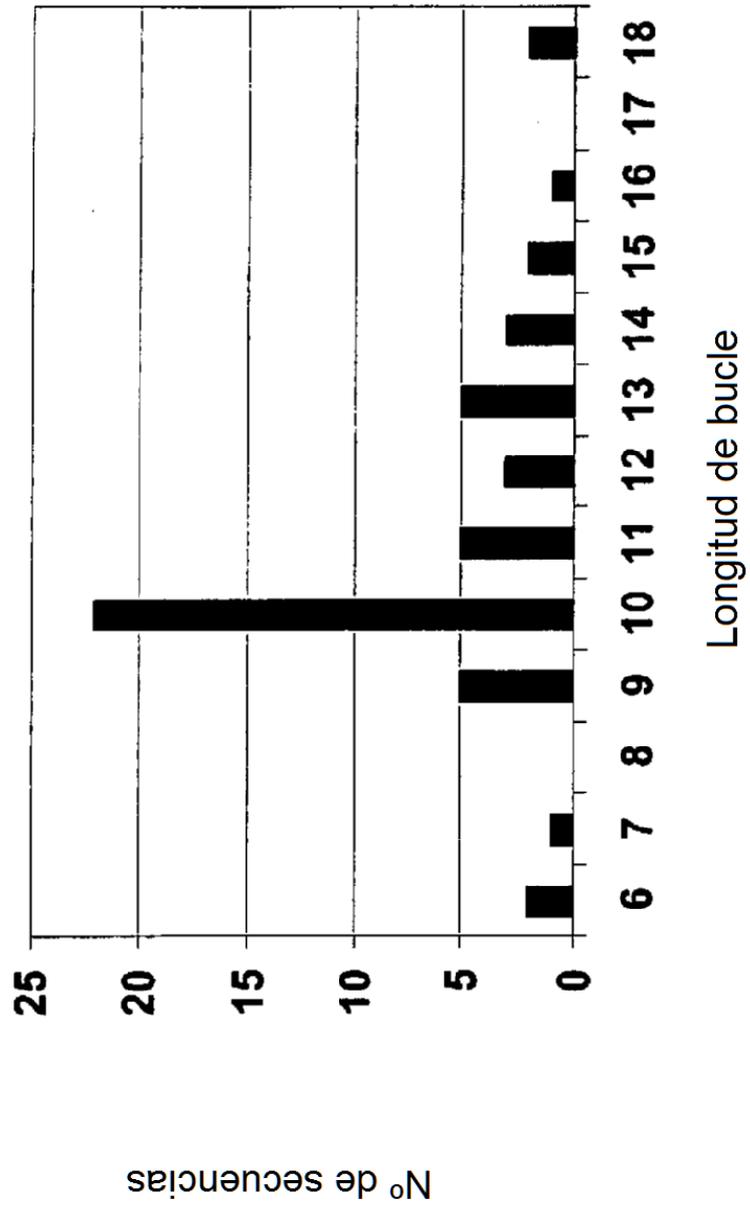


Figura 6.

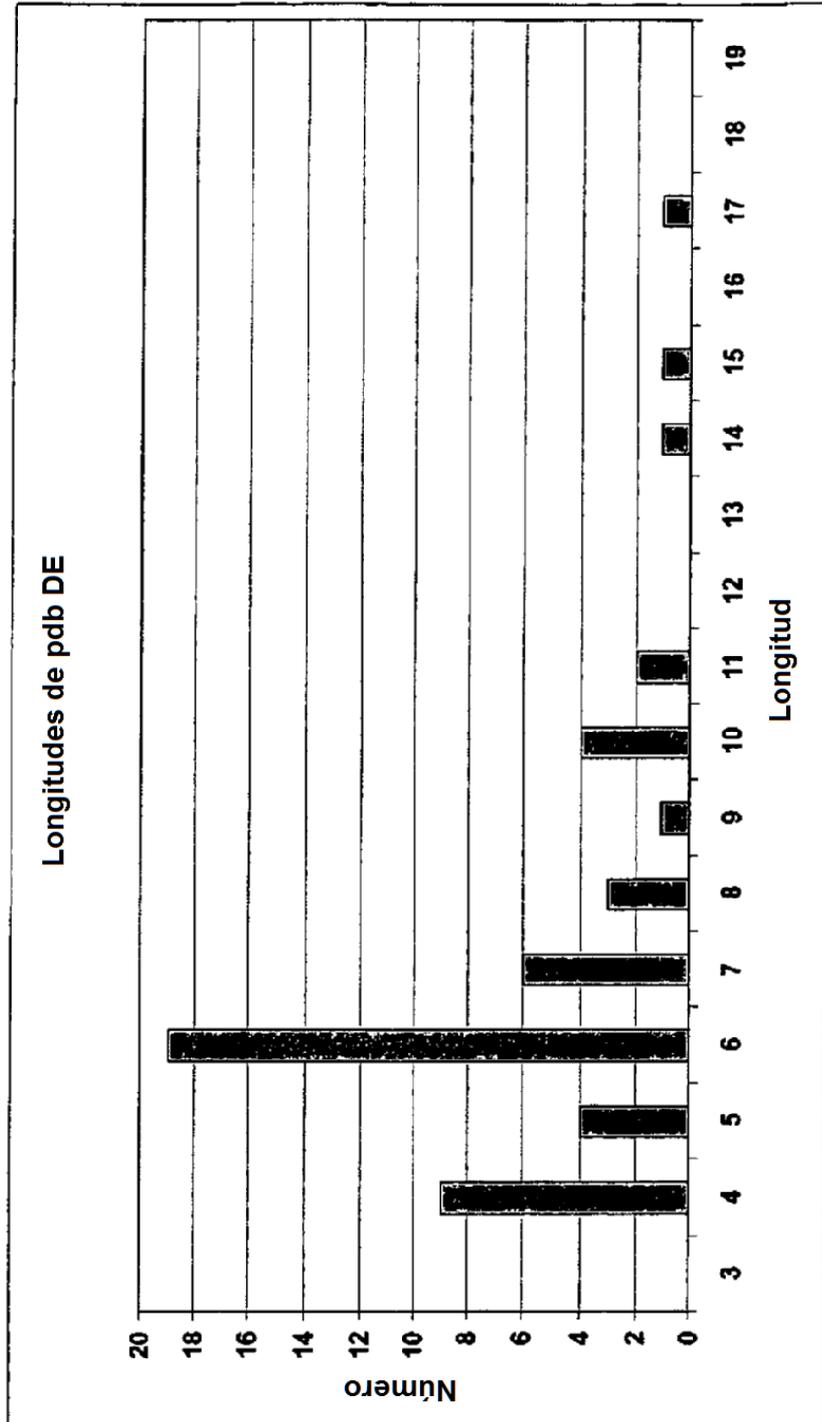


Figura 7B.

Longitud de 12 restos (99 secuencias)

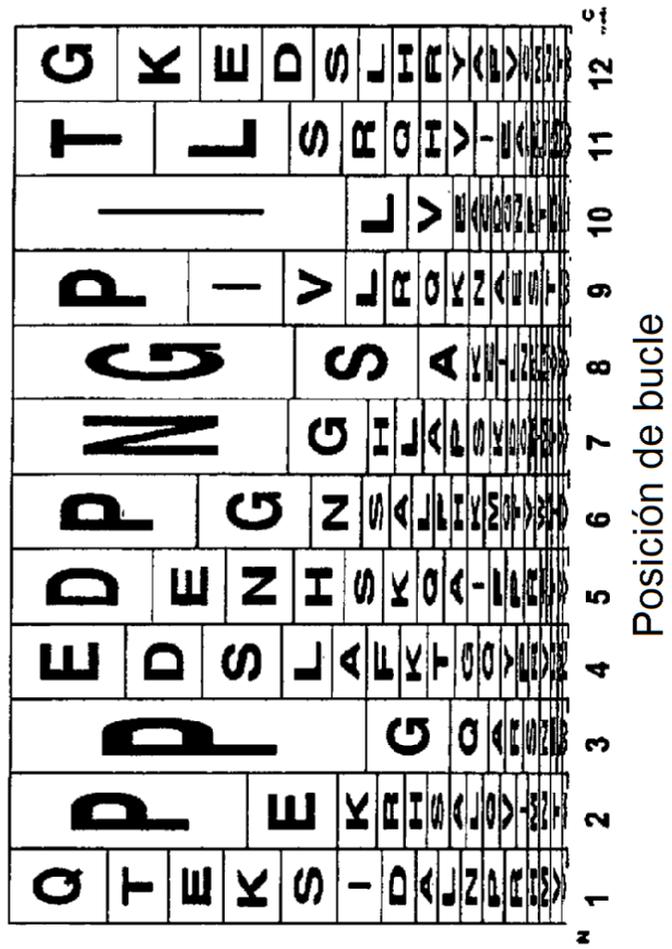


Figura 9A.

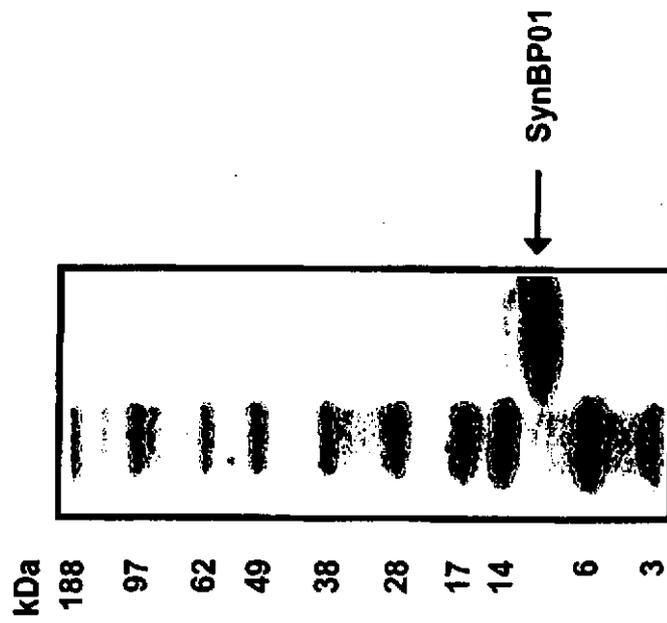


Figura 9B.

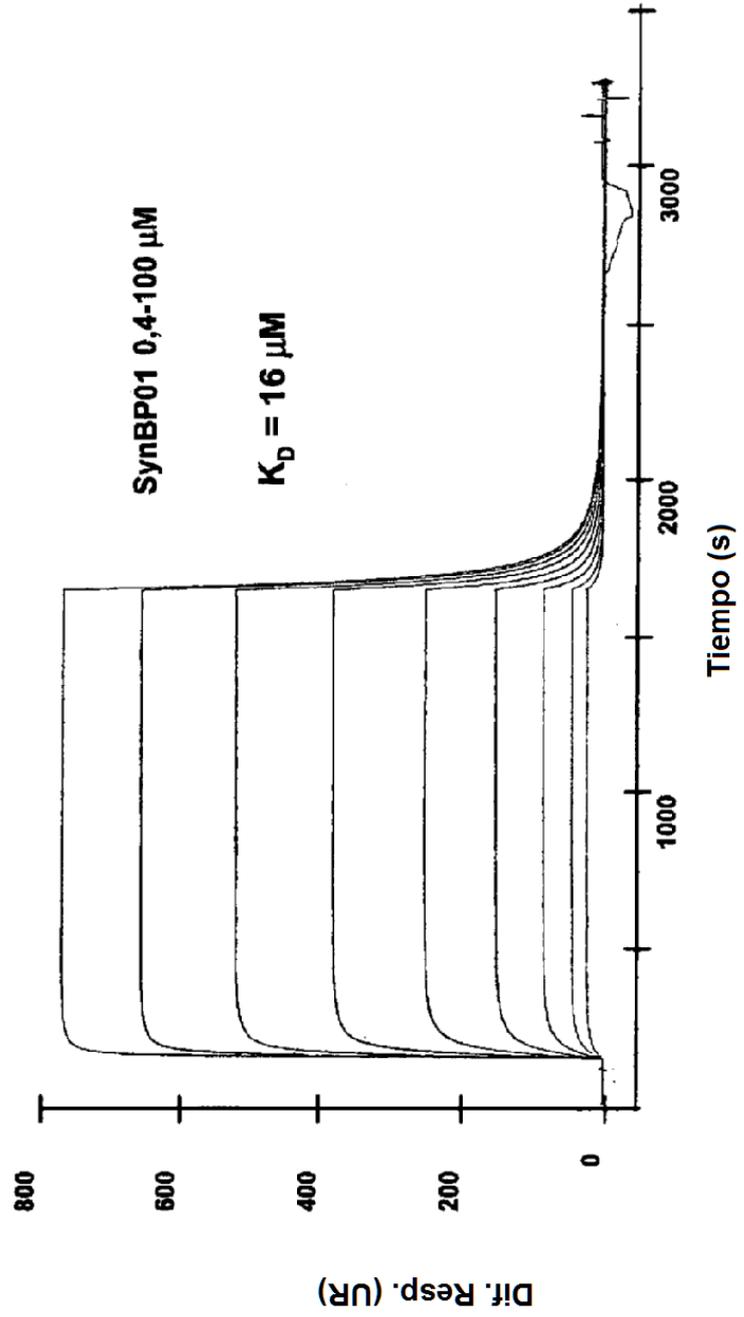


Figura 9C.

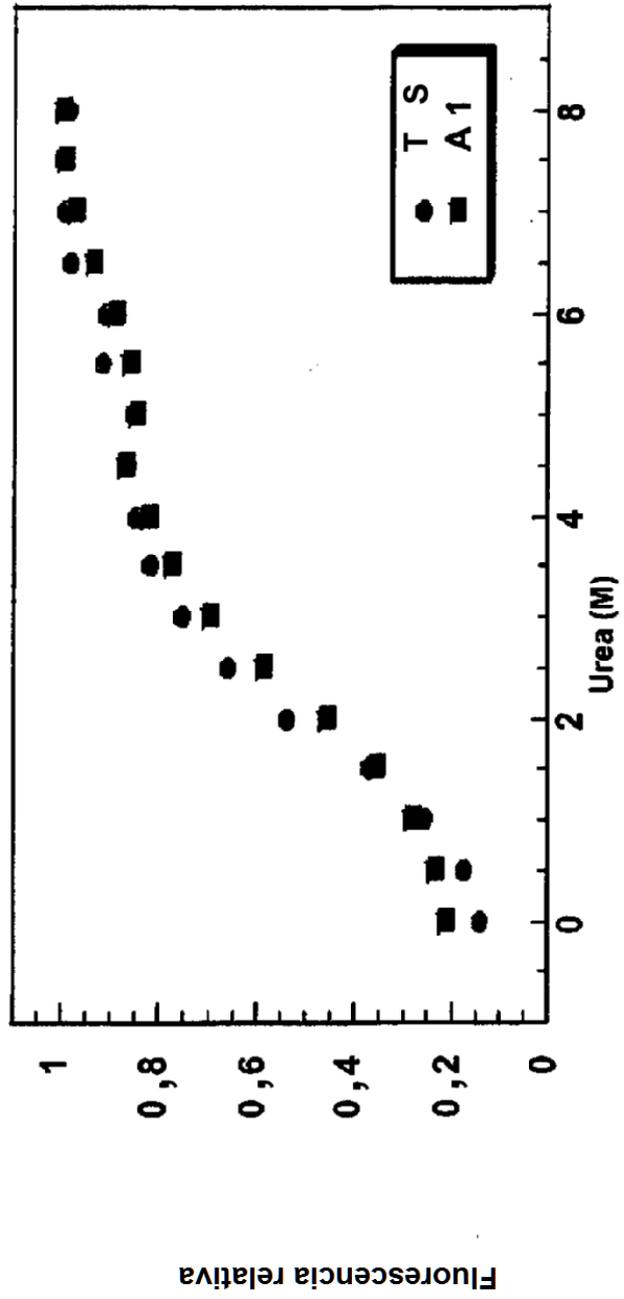


Figura 9D.

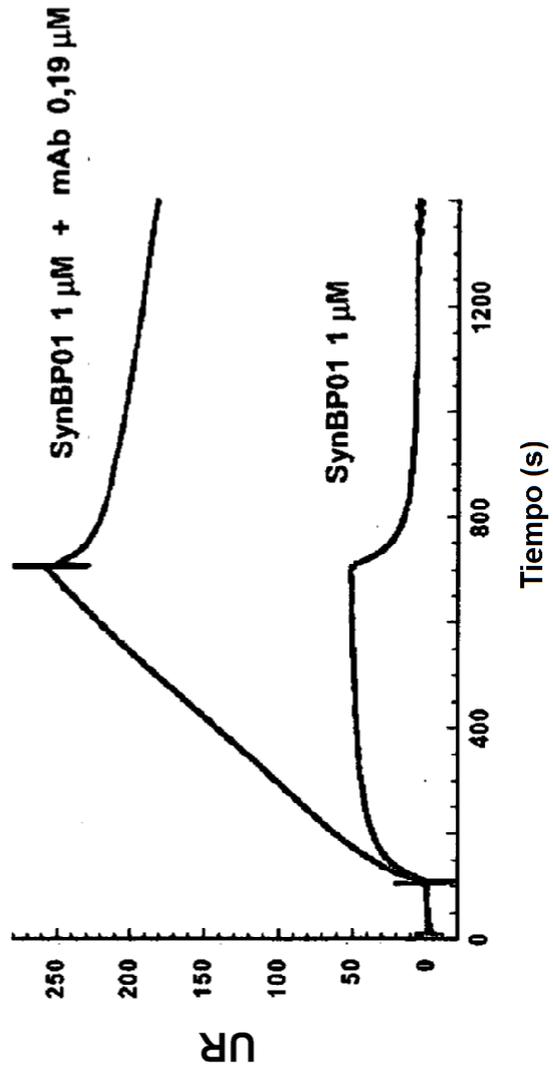


Fig 10A parte 3

SEC ID N°:

L K P D T E	- - -	Y E V S L	I S R R G D M	S S N P P A	- - -	K E T - F T T	1ten.pro	267
I V K D V K Q T	- - -	Y L A R V F S Y	P A G N V E S T	G S A G E P L	Y E N S P E F T P		lboy.pro	268
V V K D V G Q T	- - -	Y M A R V L S Y	P A R N G N T T	G F P E E P P	F R N S P E F T P Y L D T N		la21B_D1.pro	269
V G D P S N S	- - -	L W V R V K A R	V G Q K E S A Y A	- - -	- K S E E F A V		lf99.pro	270
T V Y F V N	- - -	I E V W V E A E	N A L G K V T S	- - -	- D H I N F D P		l1lrA.pro	271
T S S F V P	- - -	L E L R V T A A	S G A P R Y	- - -	- H R V I H I N E V V L		lcn4_D1.pro	272
V V S A D N	- - -	Y T L D L W A G	Q Q L L W	- - -	- K G S - F K P S E H V K		liar_D1.pro	273
V P E G D S S F	- - -	Y I V S M C V A	S S V G S K F S	- - -	- K T Q T F Q G		ln26_D2.pro	274
T S M W R T	- - -	Y I M M V N A T	N Q M G S S F S D	- - -	- E L Y V D V T Y I V Q		lbp3_D1.pro	275
L L Y Q Y	- - -	M A I W V Q A E	N M L G S S E S	- - -	- P K L C - - L D P M D V		lpgrF_D2.pro	276
T S I W K I	- - -	Y I I T V N A T	N Q M G S S S S	- - -	- D P L Y V D V T Y I V E		lf6f_D1.pro	277
T S I W I P	- - -	Y C I I K L T S	N G G T V D	- - -	- E K - C F S V D E I V		lkf9_D1.pro	278
V D K G E N	- - -	Y C F S V Q A V	I P S R T V N R R K S	T D S	- - - P V E C M G Q E K G E F R E		lboy_D2.pro	279
V D K G E N	- - -	Y C F S V Q A V	I P S R K R K Q R S	P E S	- - - L T E C T S R		la21B.pro	280
V S S L N S Q	- - -	Y C V S A E G V	L H V W G V T T E K S	- - -	- K E V C I T I F N S		lf99_D2.pro	281
T S S G E V G E	- - -	Y C V Q V K P S	V A S R S N K G M W S	- - -	- K E E C I S L T		llqs_D2.pro	282
L H Q A P V	- - -	Y T L Q M R C I	R S S L P G F W S P W S	- - -	- P G L Q L R P		lpgrF.pro	283
M S P W A N	- - -	Y T F R V I A F	N K I G A S P P S	- - -	- A H S D S C T		lcfb.pro	284
C R K N	- - -	A S I S V R A Q	D R Y Y S S W S E W A	- - -	- S V P C S		lf42.pro	285
V T L D L Y H S	N G Y R A R V R A V D G S R H S Q W T	- - -	- - -	- - -	- V N T R F S V		llqsR.pro	286
C P A A E E S L P	- I E V M V D A V H K L K Y E N Y	- - -	- - -	- - -	- T S S F F I R D I I K		lf42_D2.pro	287
V D G Q K R	- - -	Y T F R V R S R	P N P L G S A Q H W S E W S	- - -	- H P I H W G S N T S K E N P R T		2erjG_D2.pro	288

Figura 10B.

1 ┌
└ IEVKDVT'TALI TWFKPLAEIDGIELTYGIKDVPGRRTTI
2 ┌
└ DLTE DENQYSIGNLKPDT EYEVSLI SRRGDMSSNPAKETETT
4 ┌
└

3

(SEC ID N°: 61)

Figura 10C.

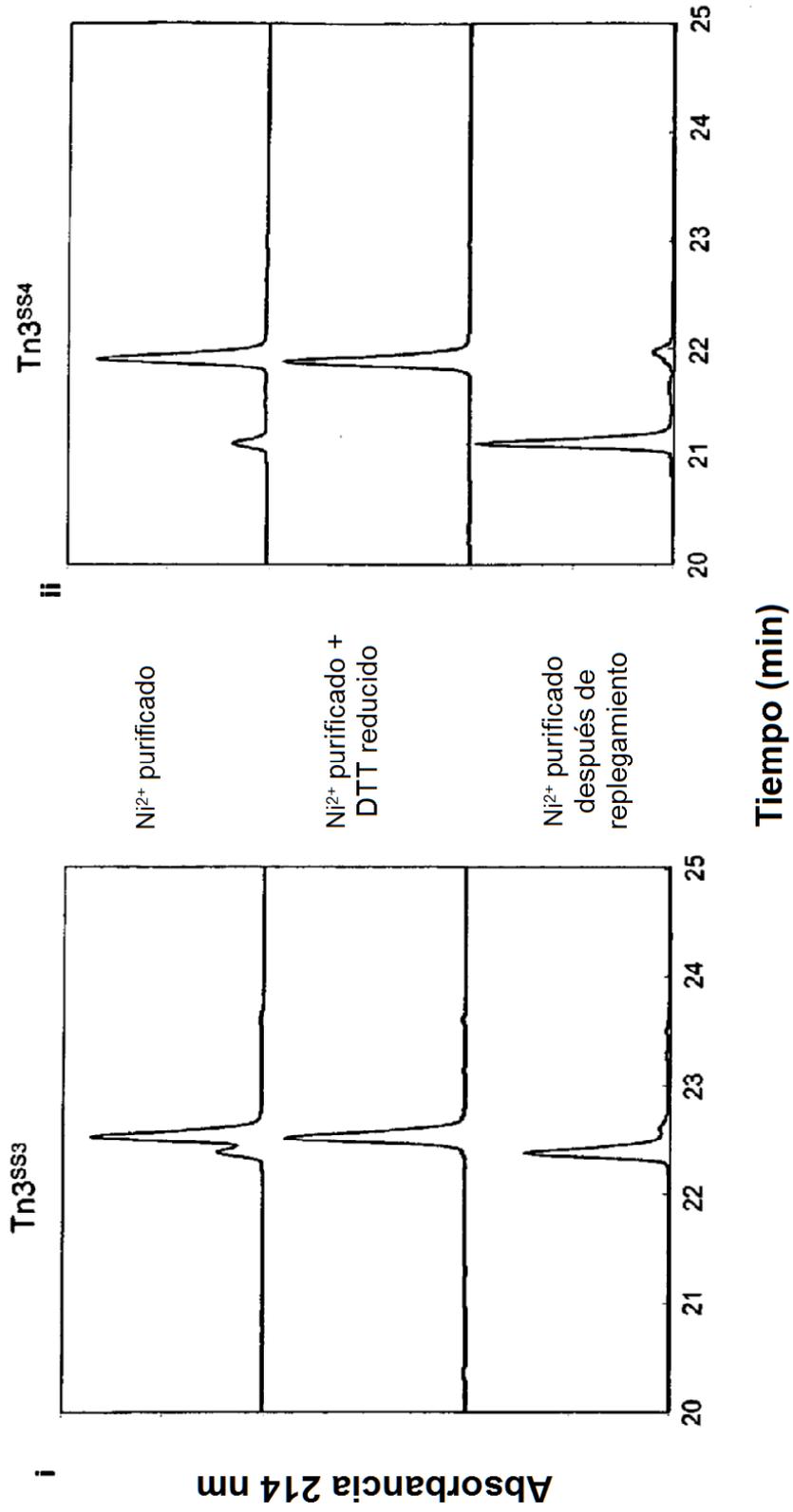


Figura 10D.

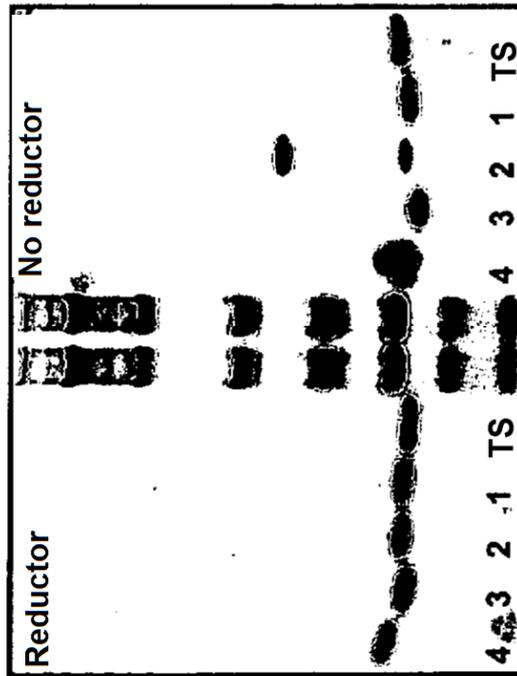


Figura 10E.

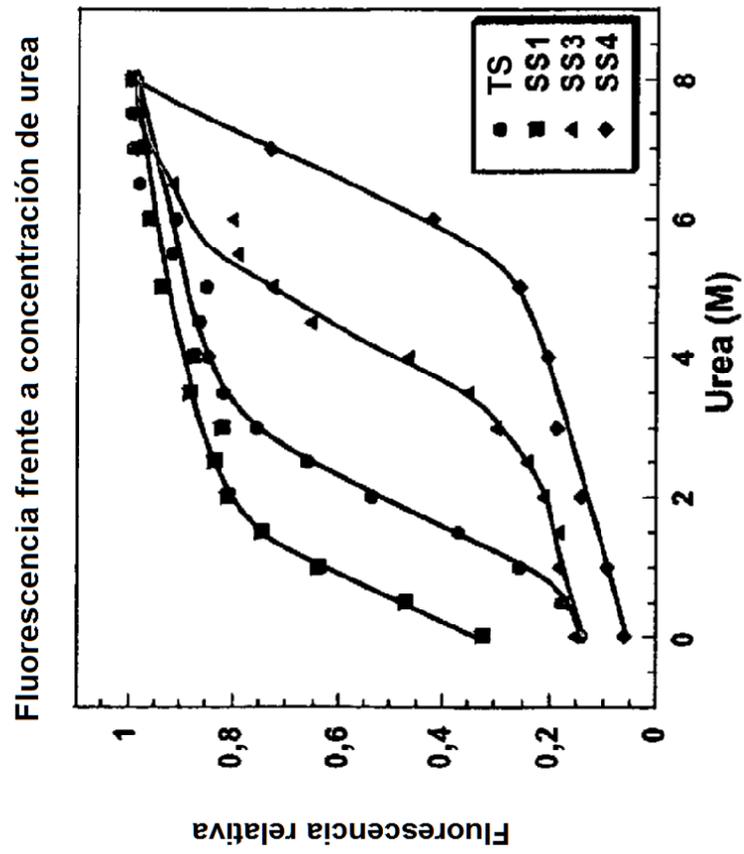


Figura 10F.

Estabilidad para guanidina.HCl

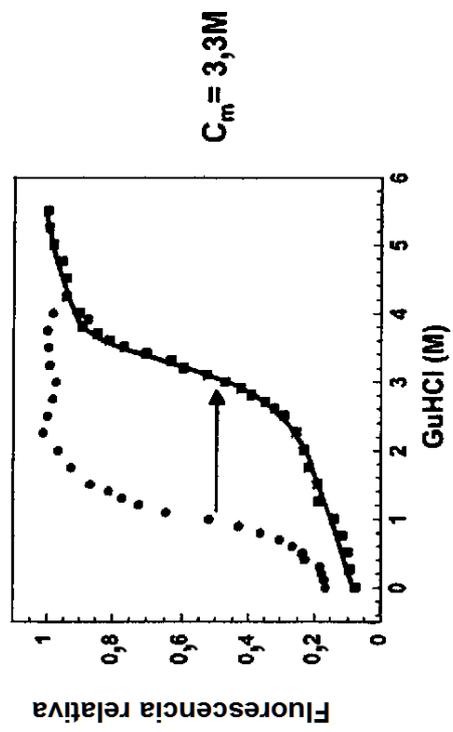


Figura 10G.

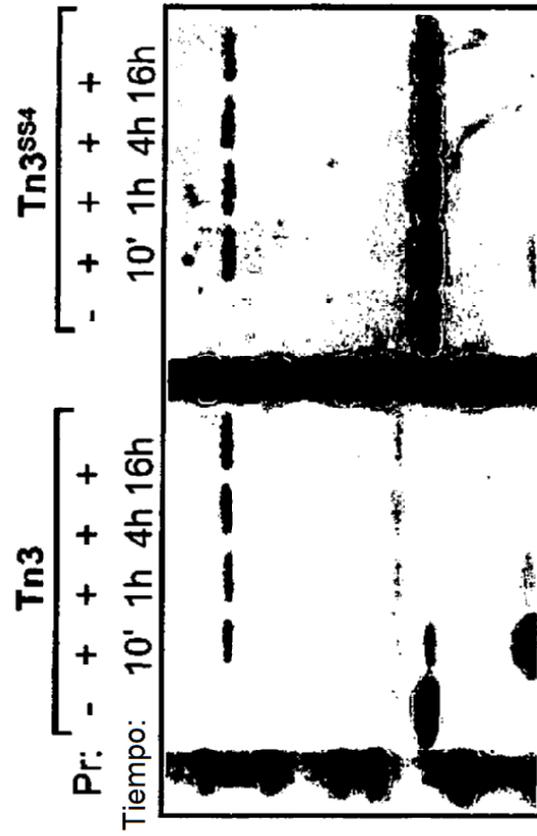


Figura 10H.

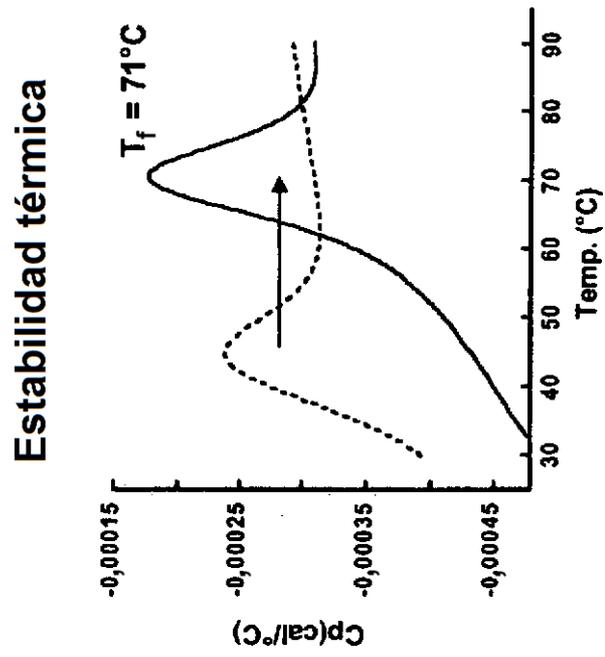


Figura 10I.

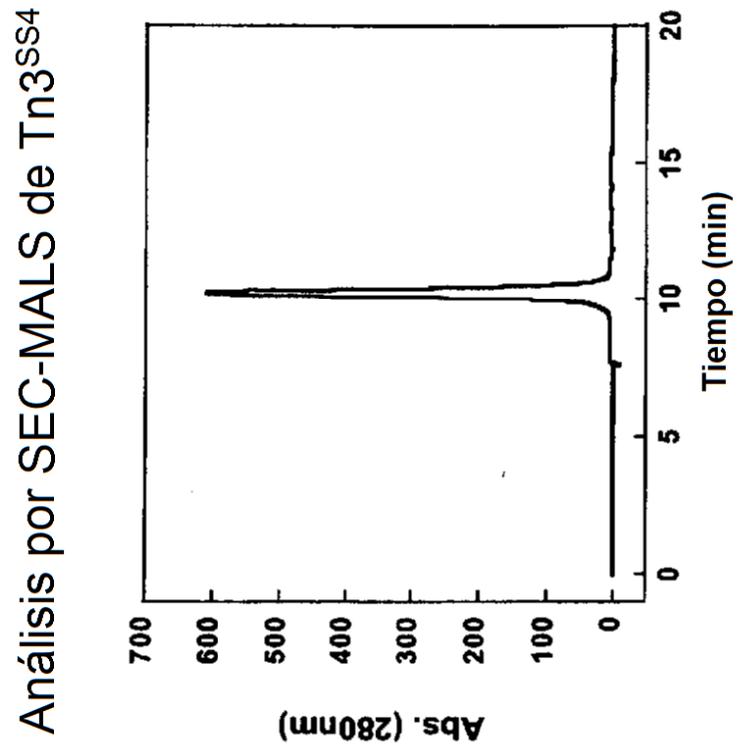


Figura 10J.

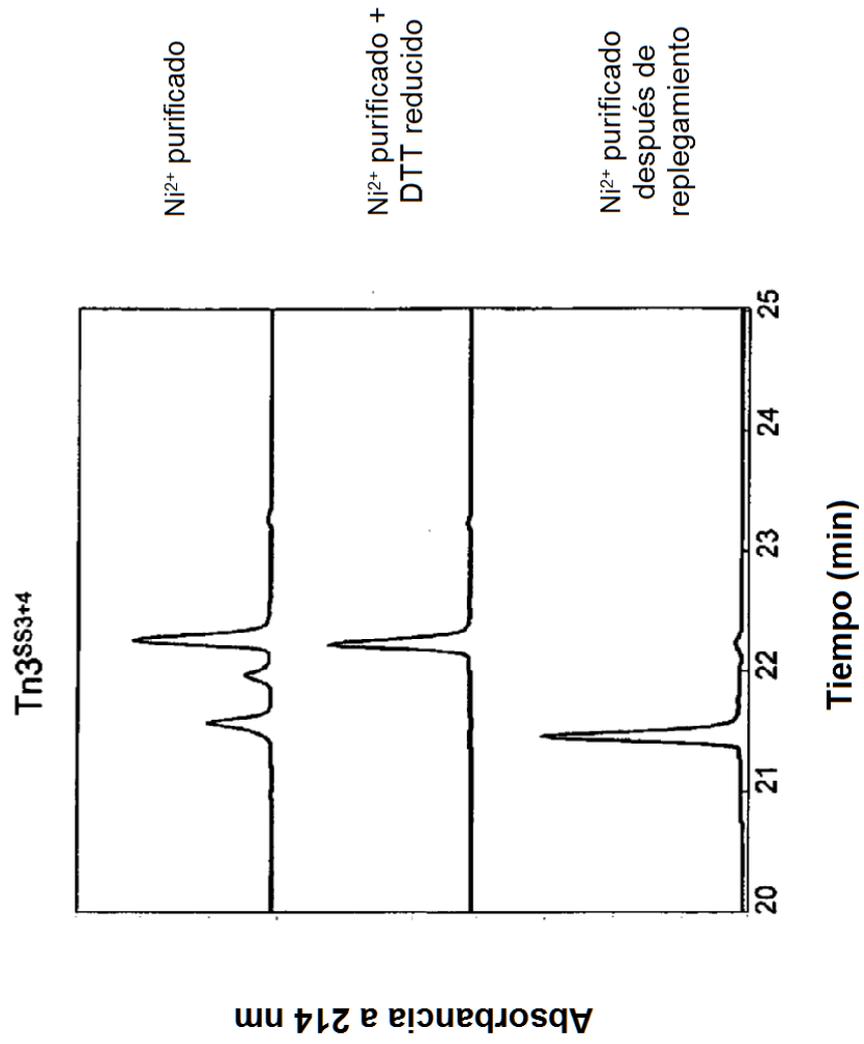


Figura 10K.

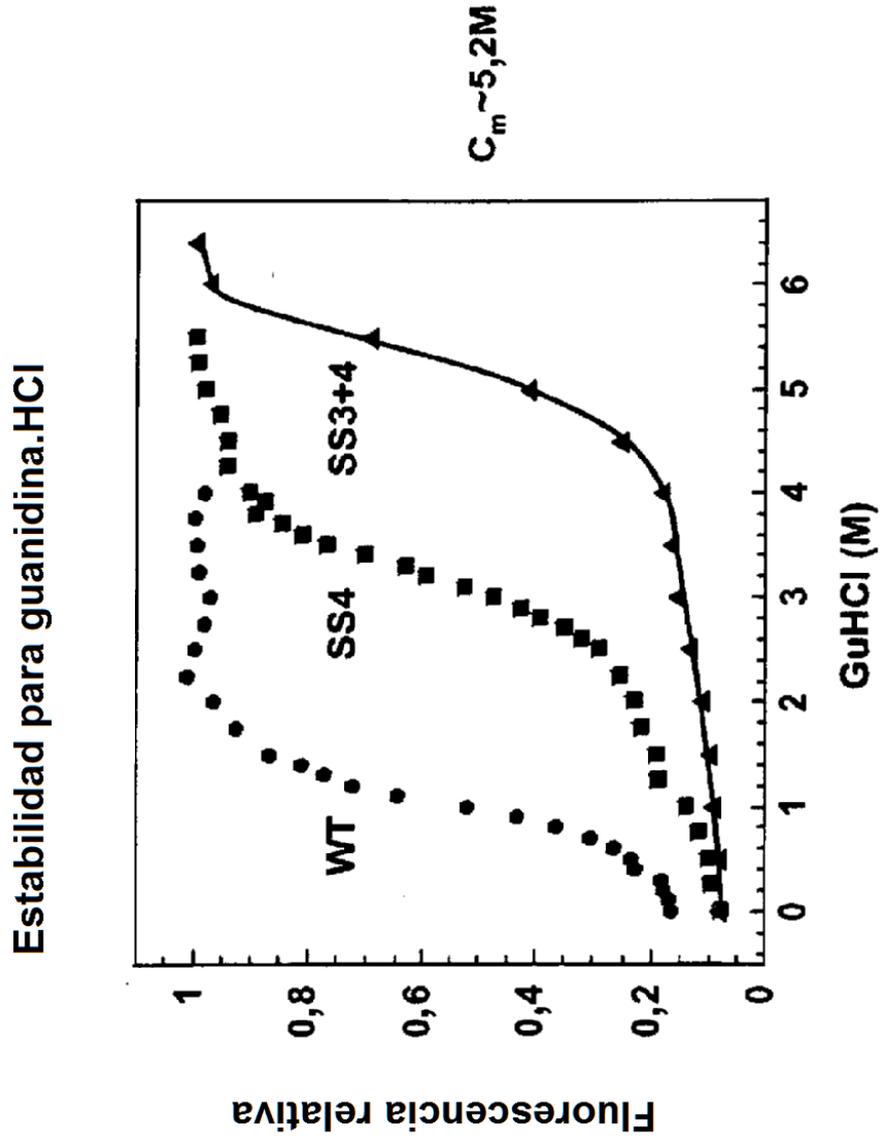


Figura 11A.

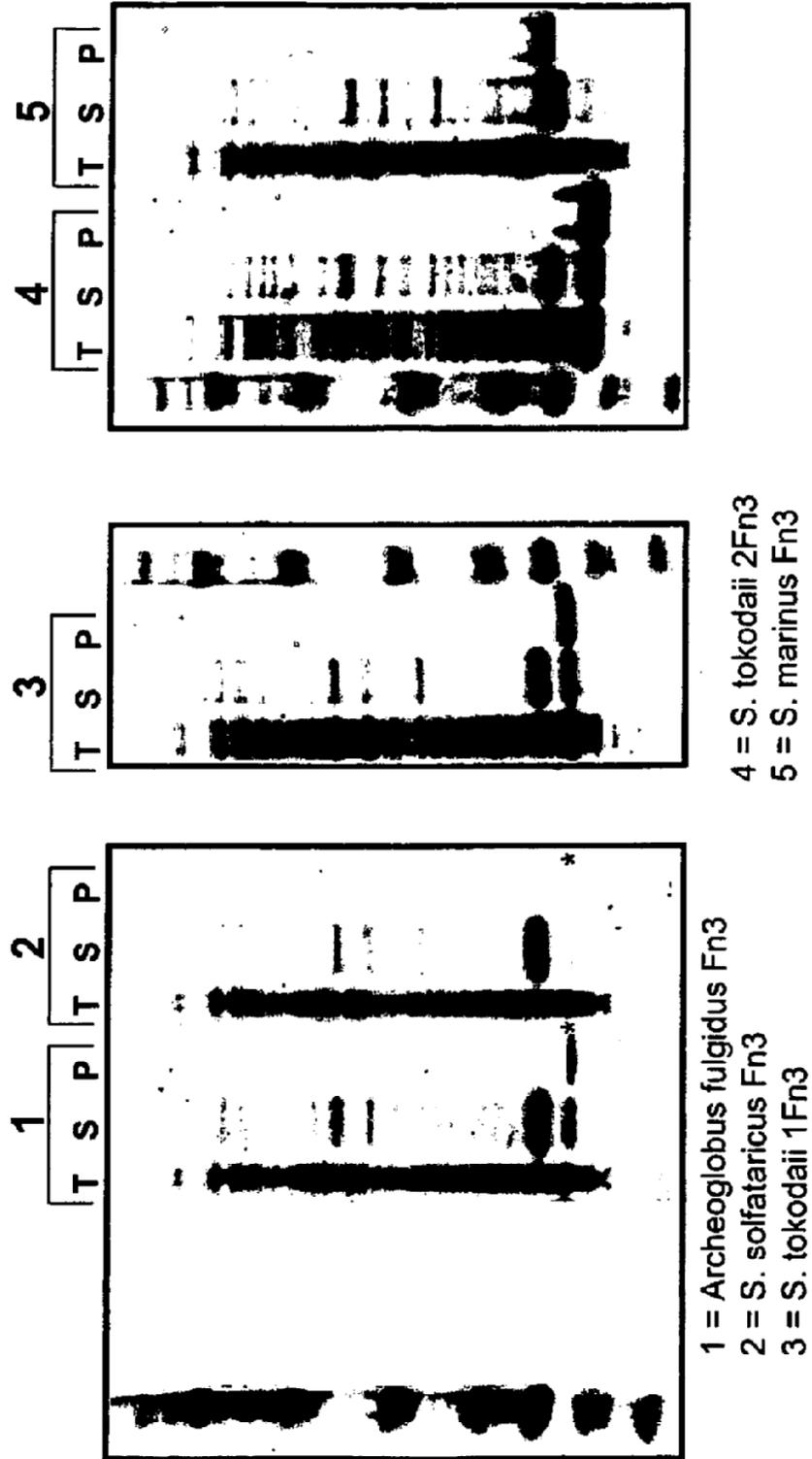


Figura 11B.

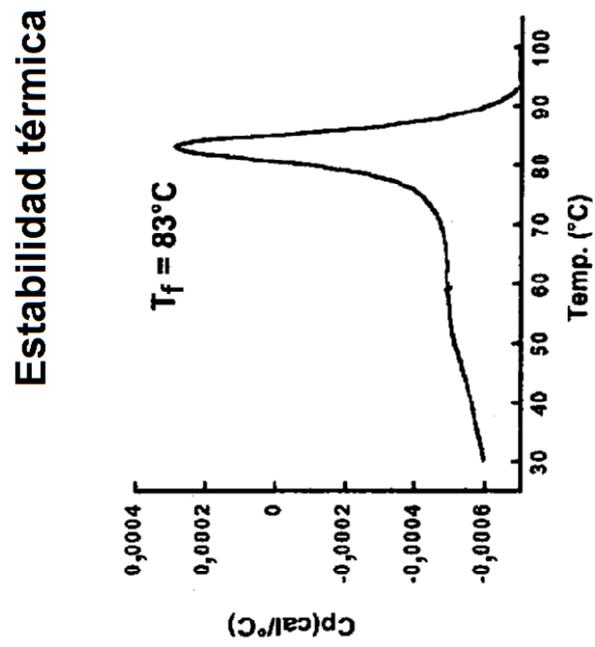


Figura 11C.

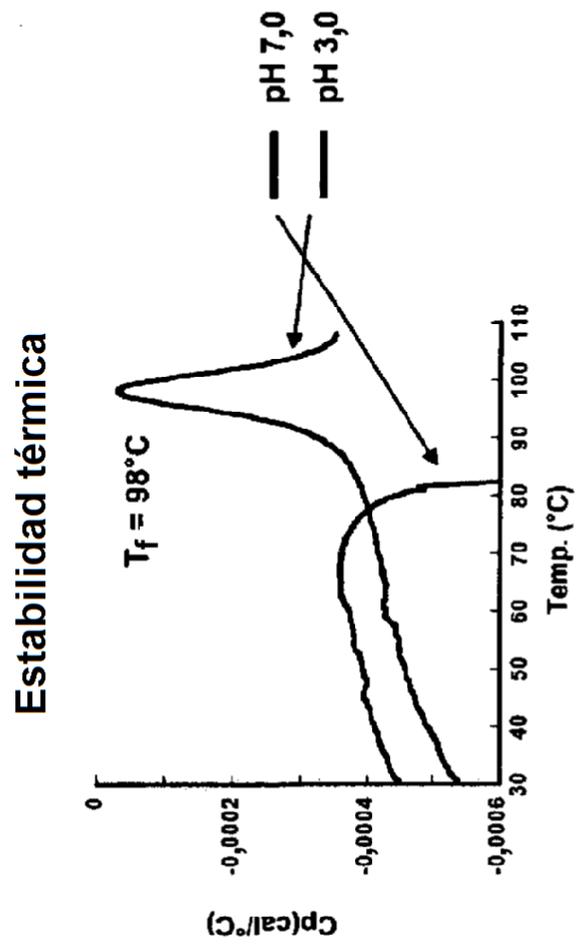


Figura 11D.

Estabilidad para guanidina.HCl

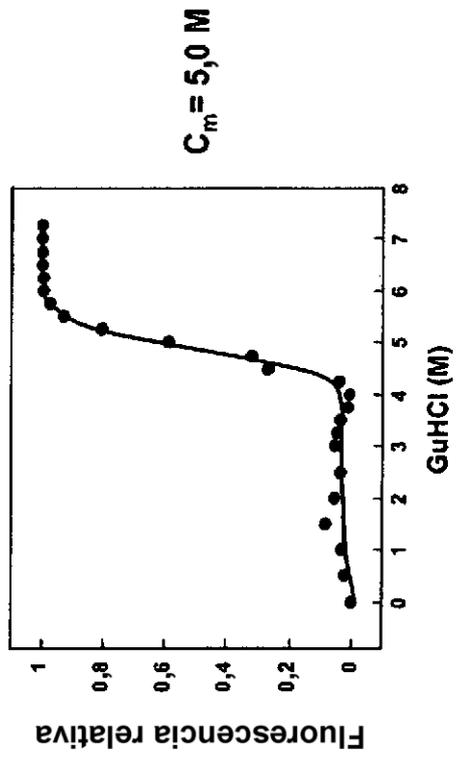


Figura 11E.

Estabilidad para guanidina.HCl

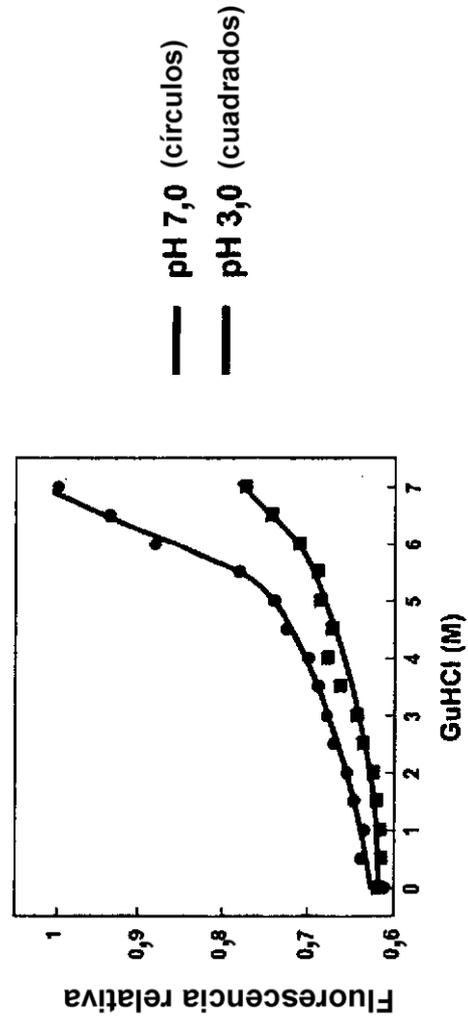


Figura 11F.

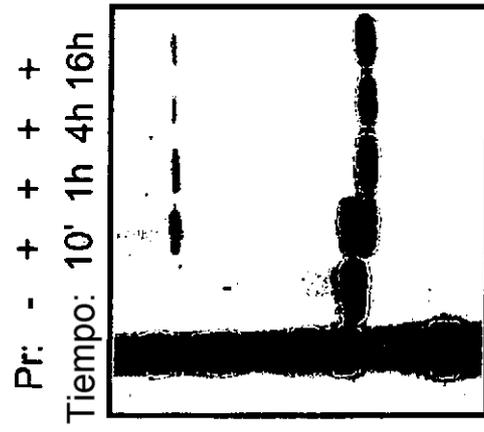


Figura 11G.

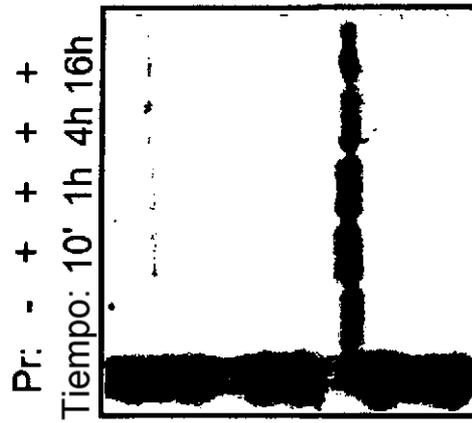


Figura 11H.

Tratamiento con calor

Lisado en bruto 70 °C, 15 minutos

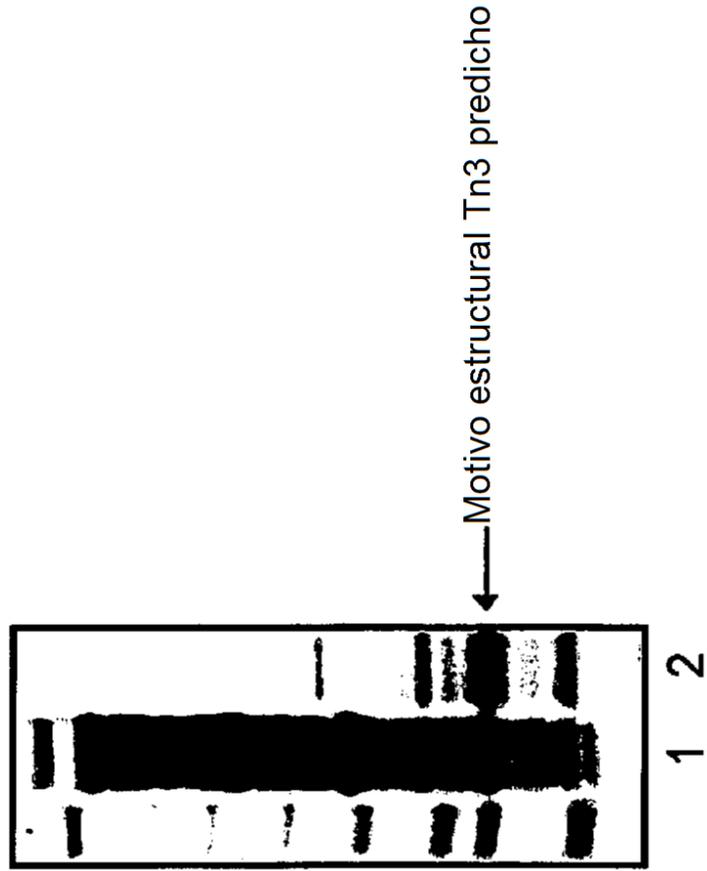


Figura 11I.

Tratamiento proteolítico

**Lisado en bruto + termolisina
55 °C, 45 minutos**

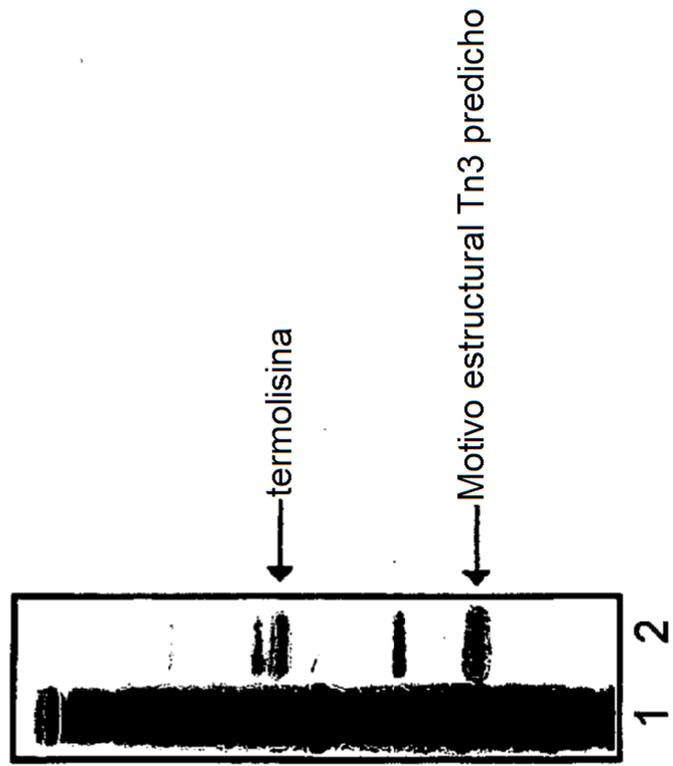


Figura 11J.

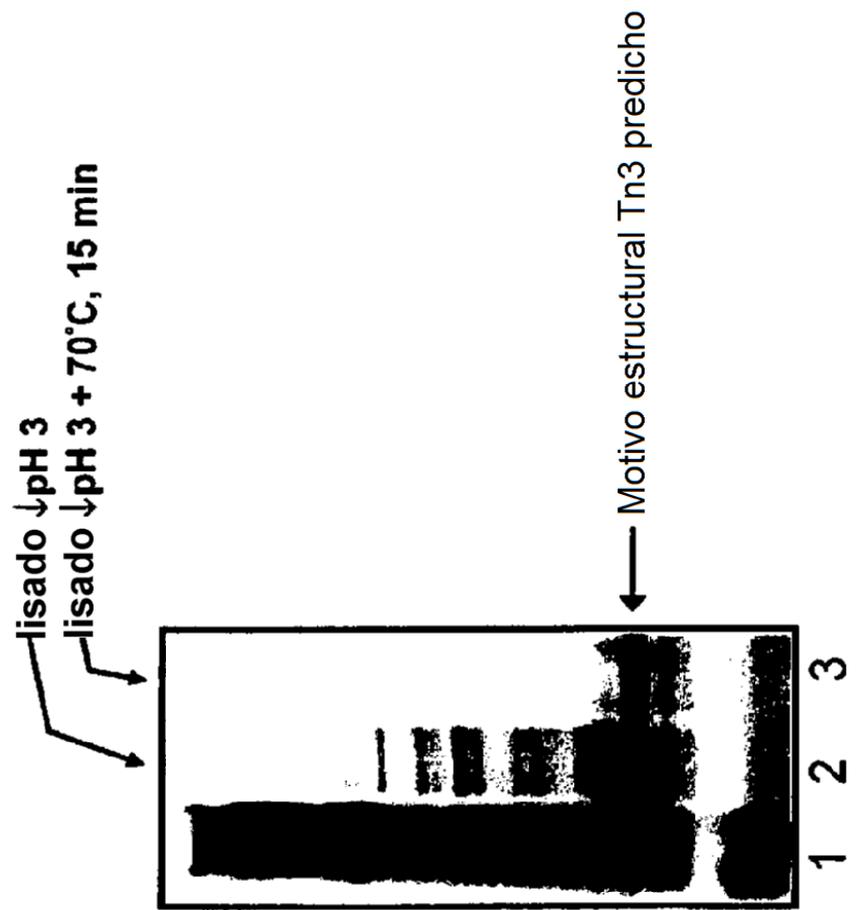


Figura 12

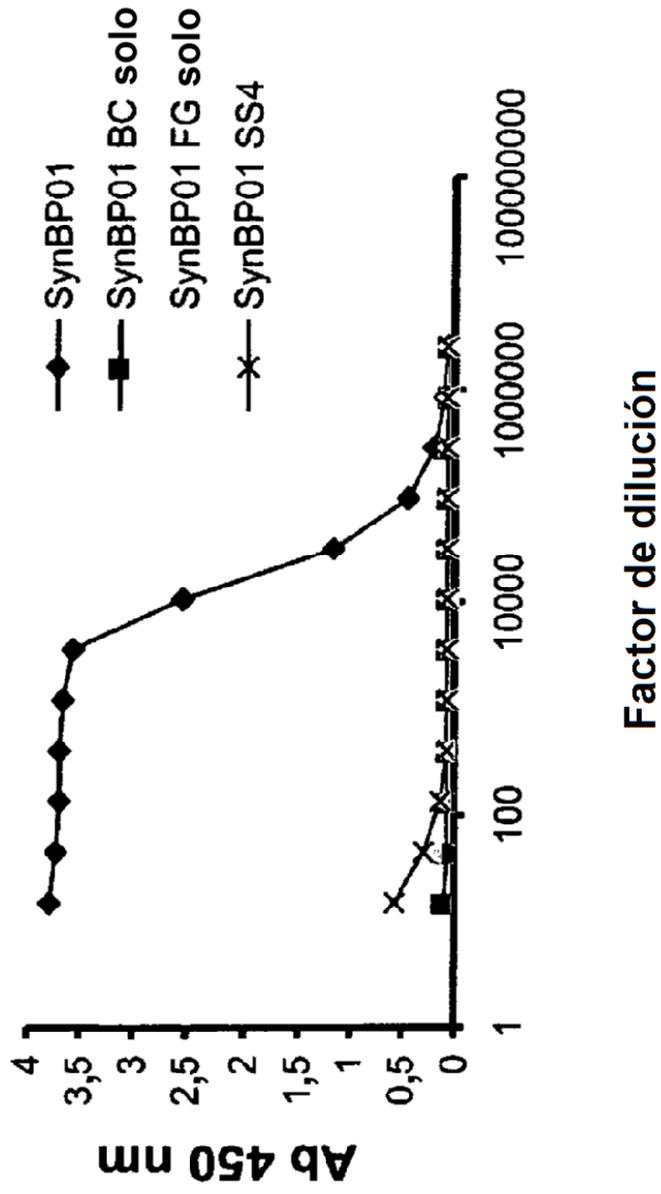


Figura 13.

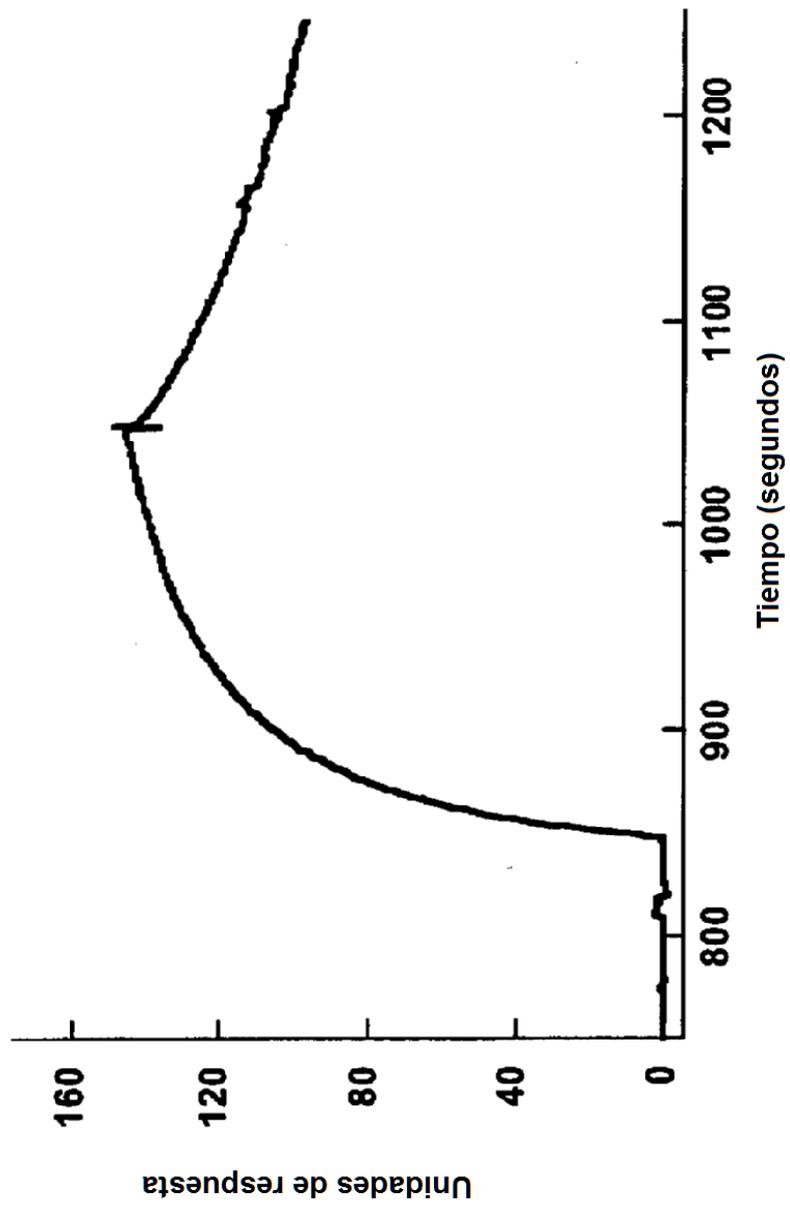


Figura 14.

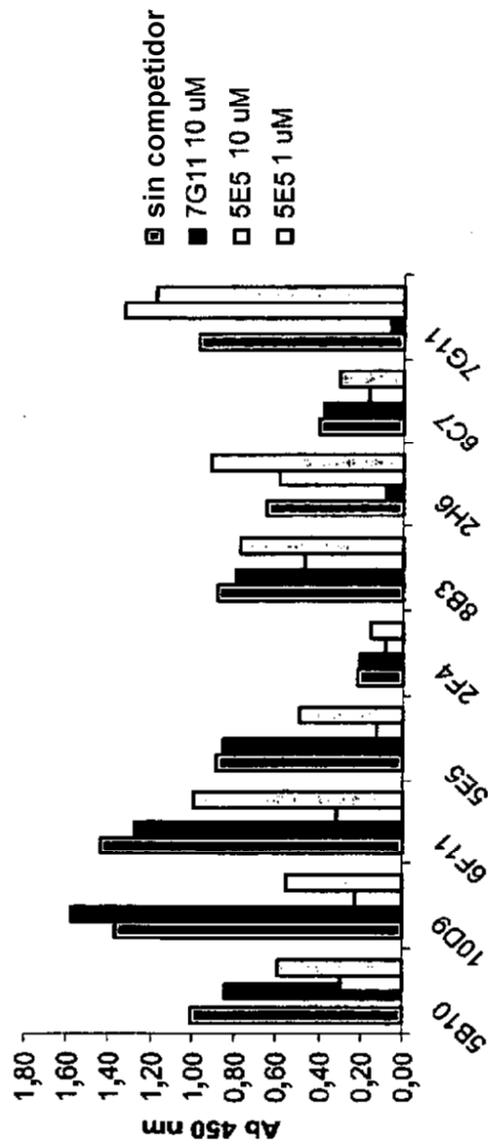
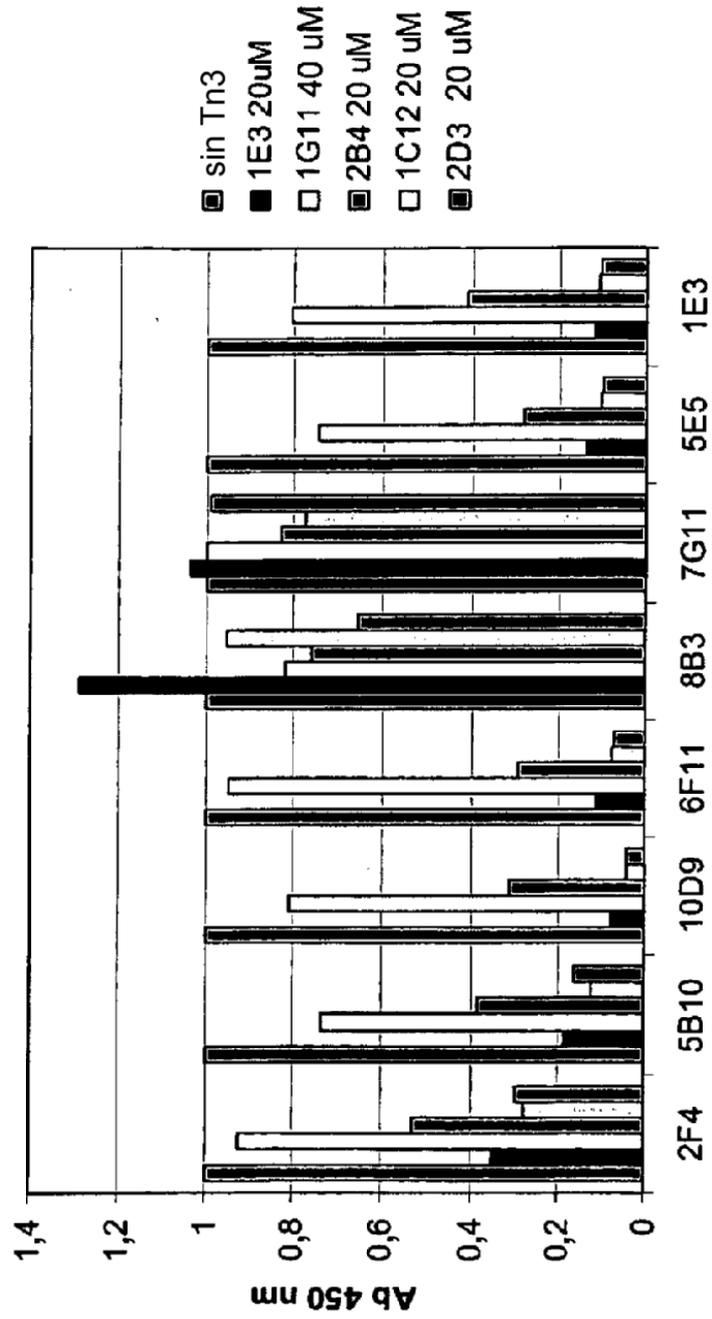


Figura 15 continuación



A

Figura 15 continuación

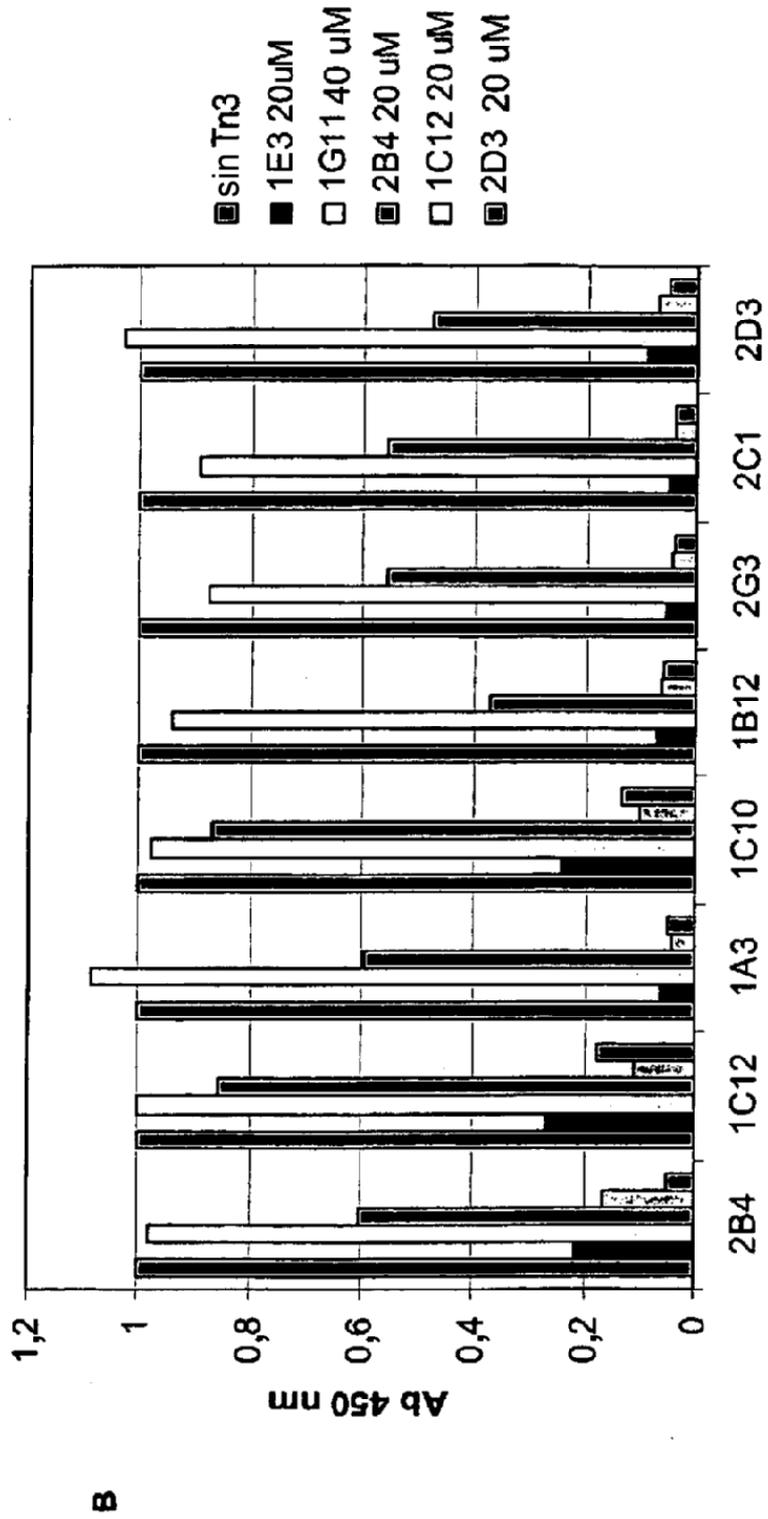


Figura 15 continuación

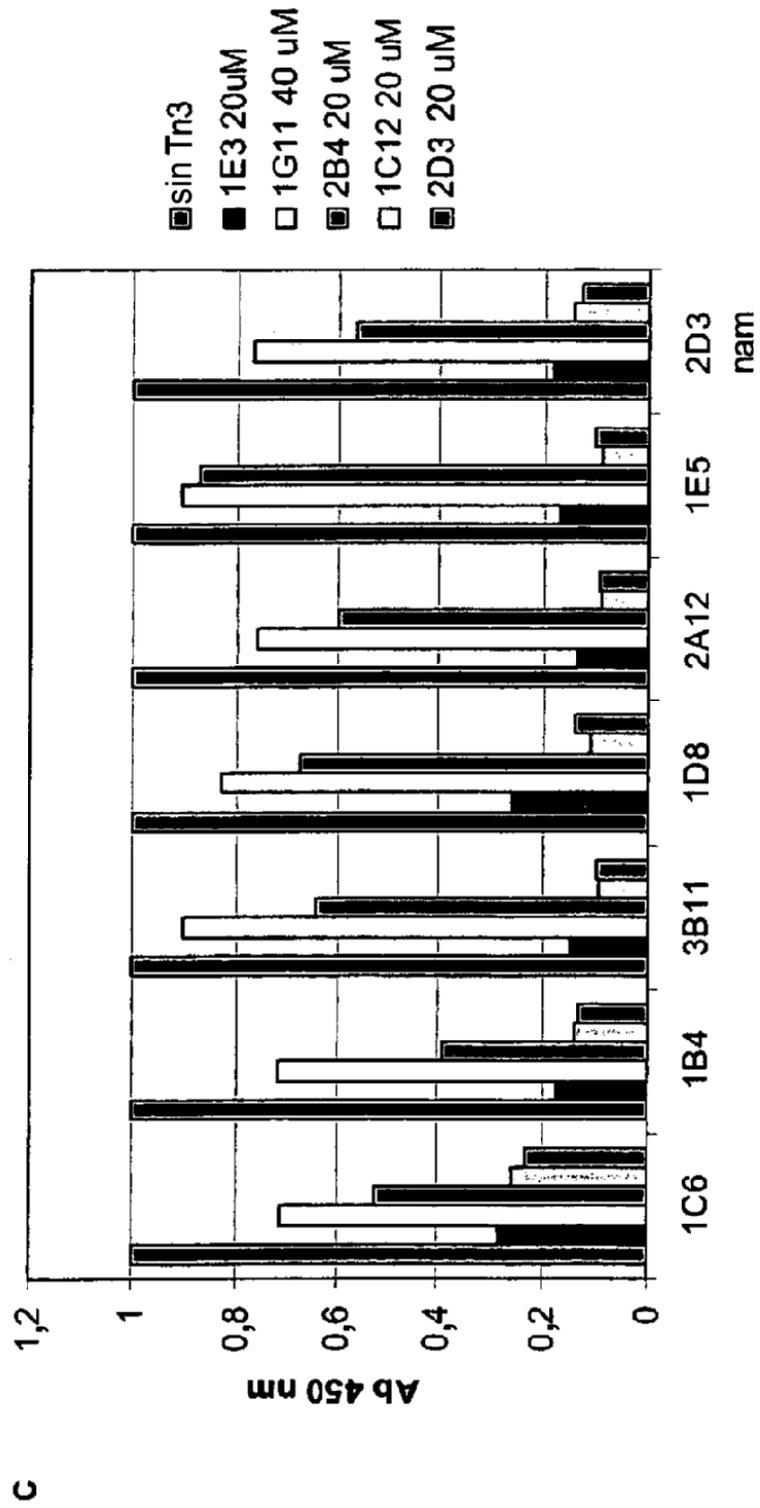


Figura 16

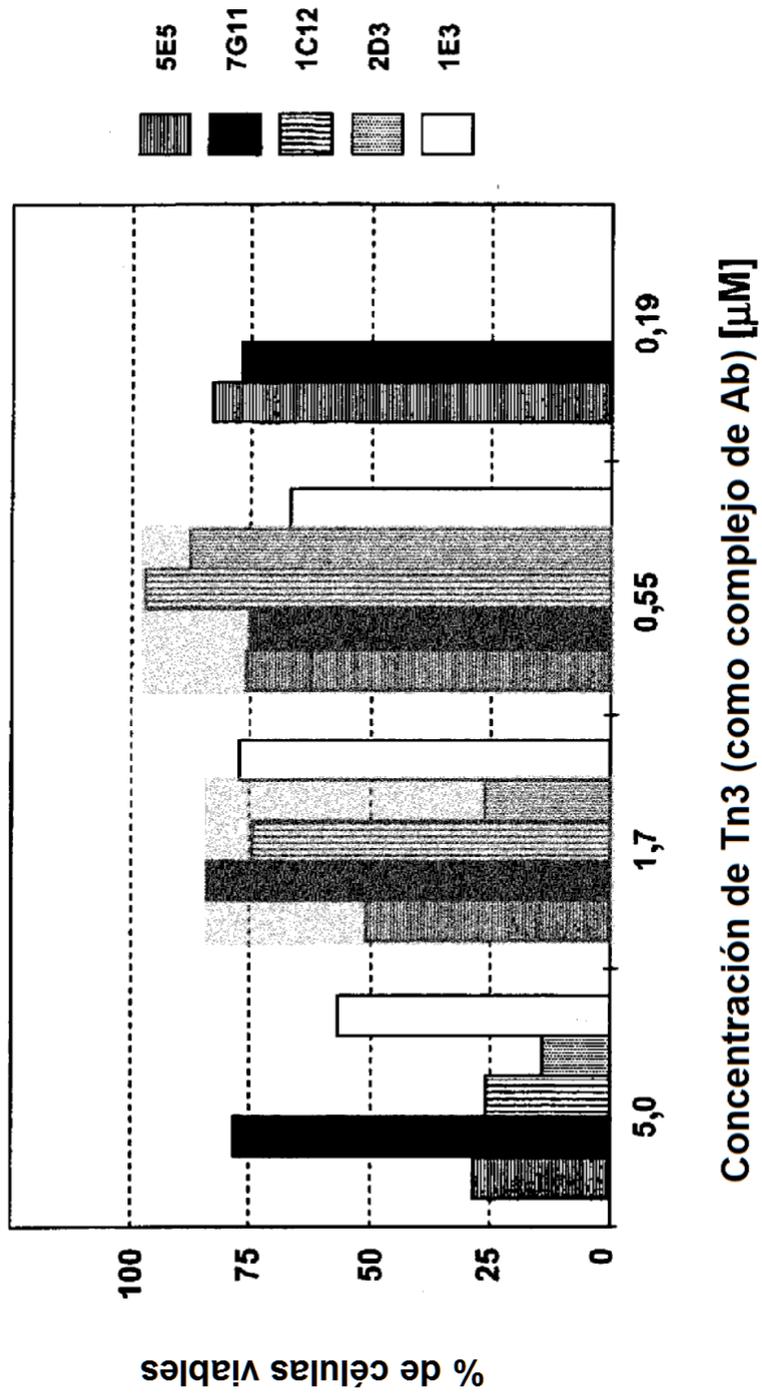
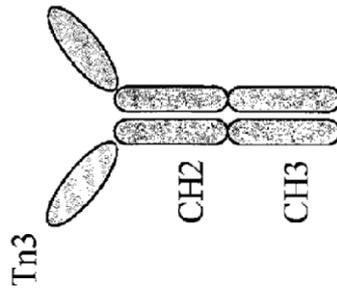


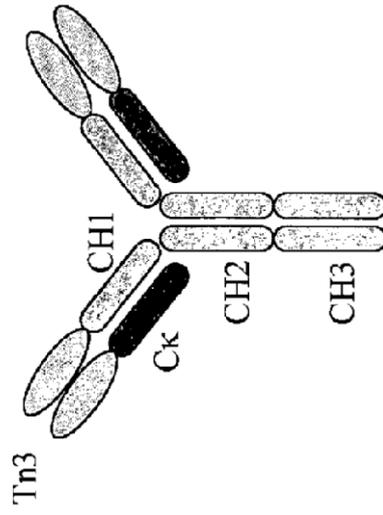
Figura 17A.

Bivalente



Tn3-Fc

Tetravalente



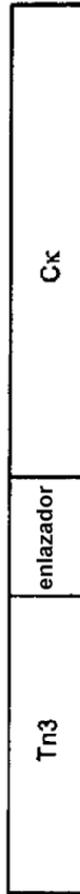
Tn3-C κ /Tn3-IGHG1

Figura 17B.

i) Tn3-Fc



ii) Tn3-Cκ



iii) Tn3-IGHG1

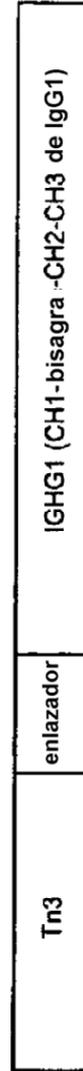


Figura 18.

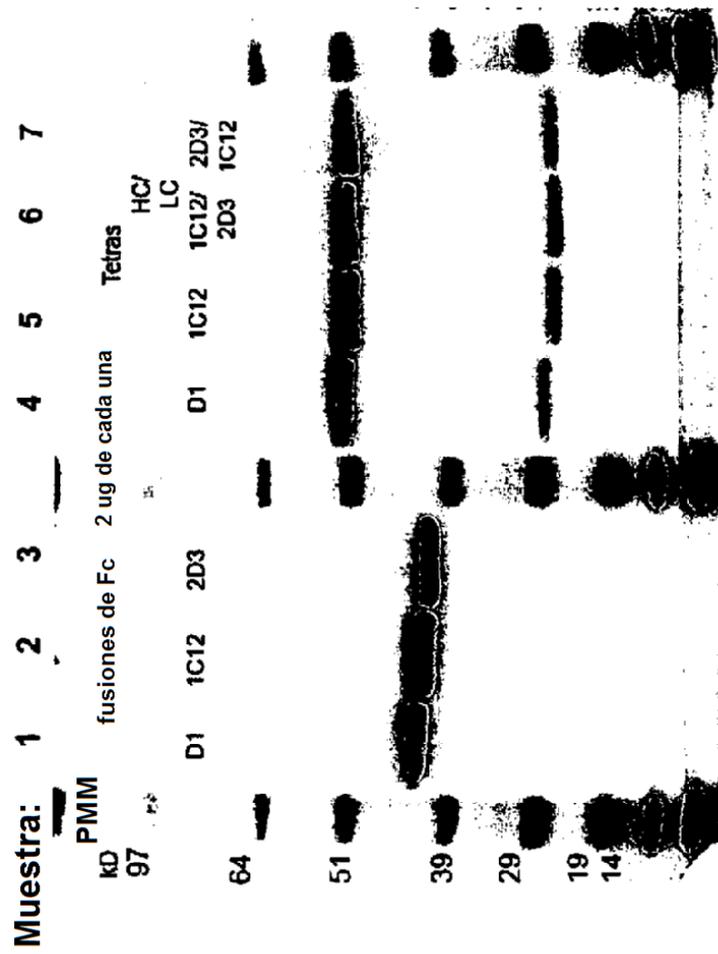


Figura 19.

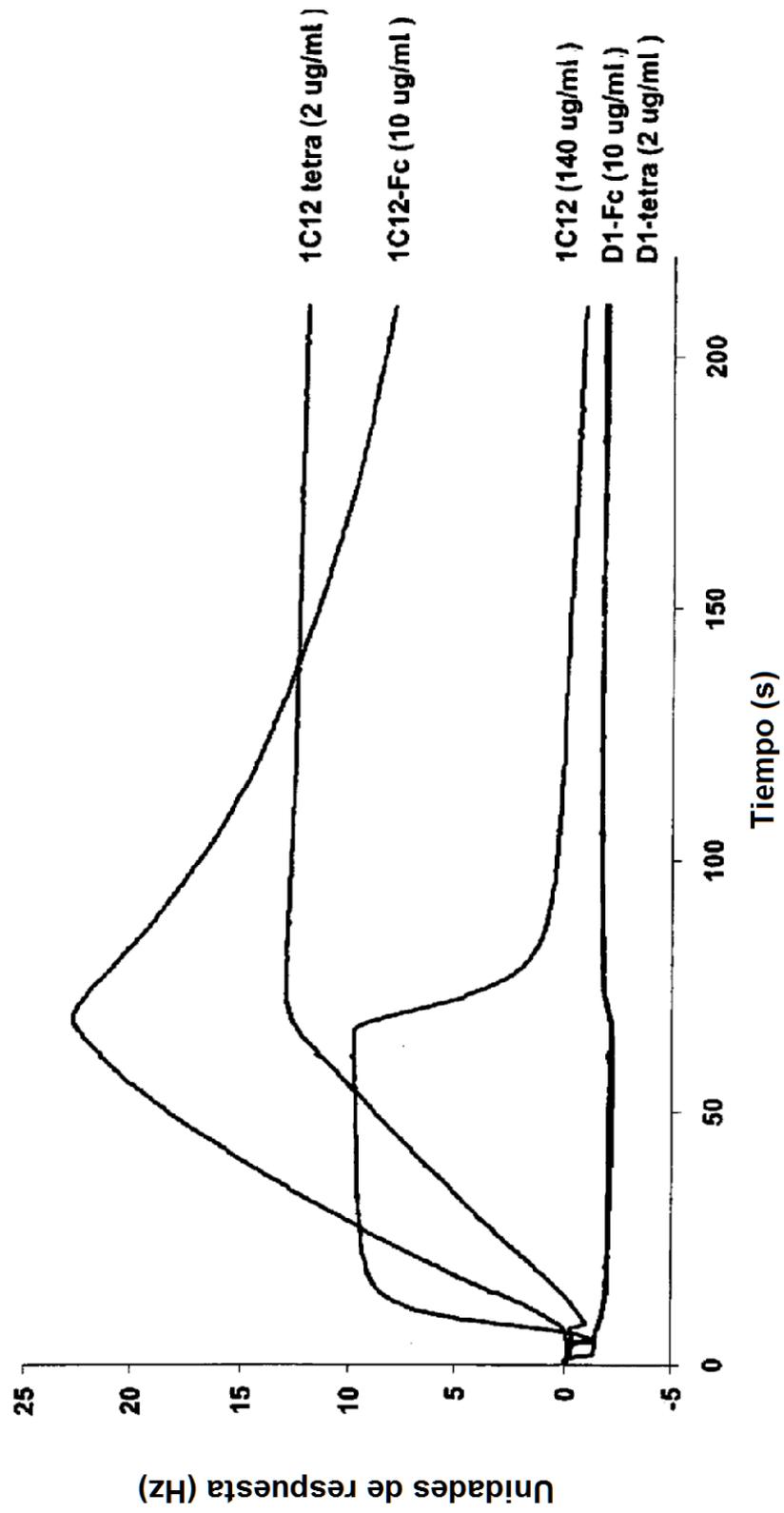


Figura 20.

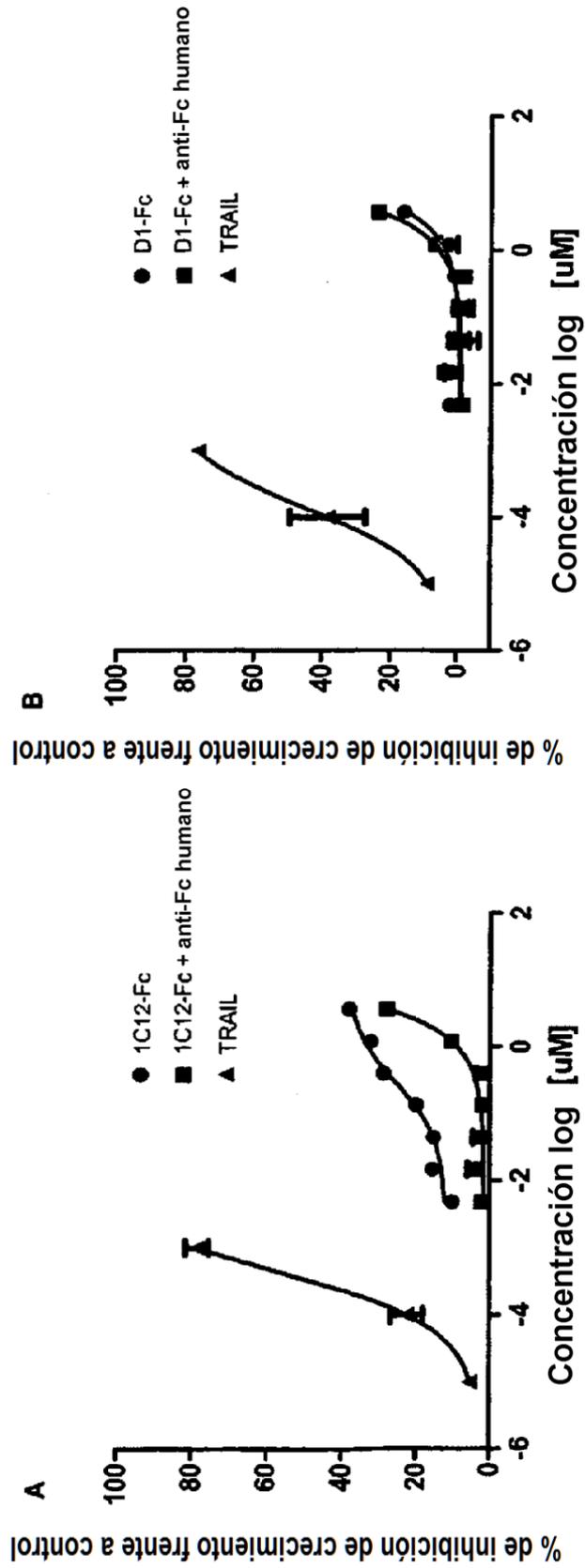


Figura 21

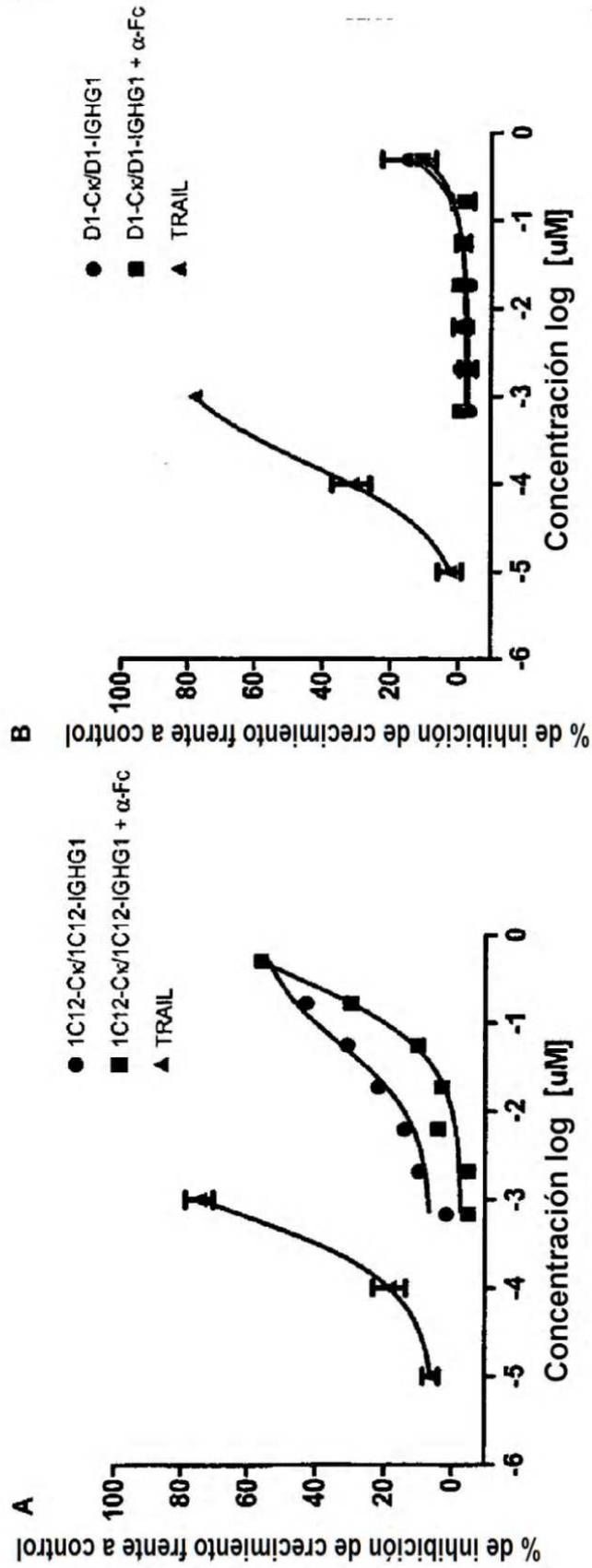


Figura 22

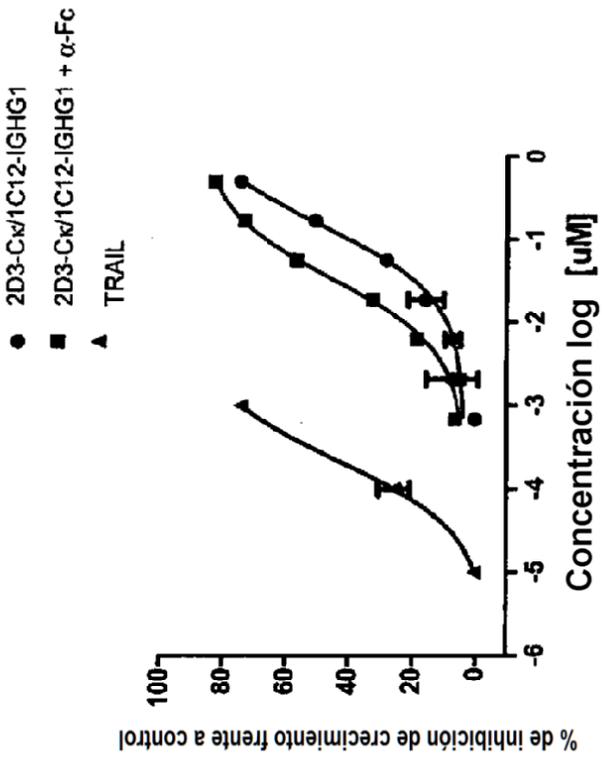
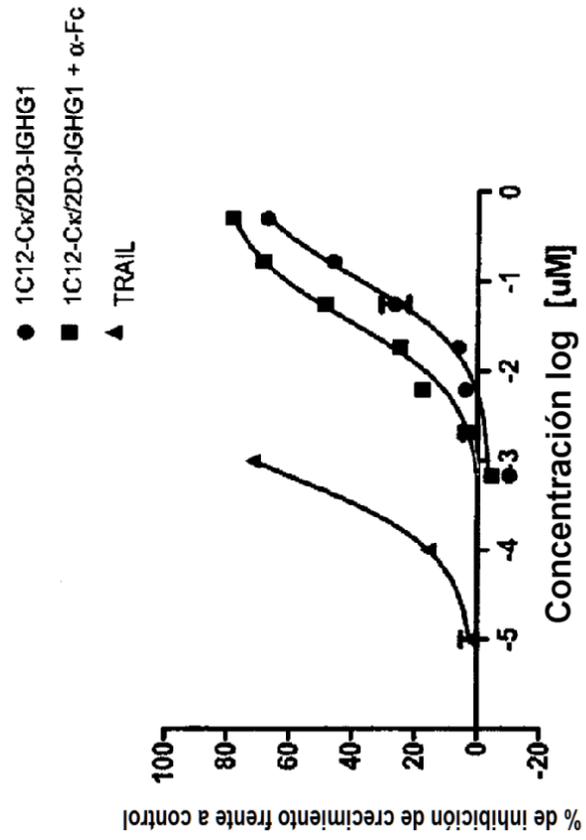


Figura 23.

A

MTNITKRSLVAGVLAALMAGNVALAAIEVKDVTDTTALITWFKPLAEID
GCELTYGIKDVPGDRRTTIDLTEDEENQYSIGNLKPDT EYEVS LICRRGDM
SSNPAKETFTTGGGTLGHHHHHHHH (SEC ID N°: 289)



Figura 24.

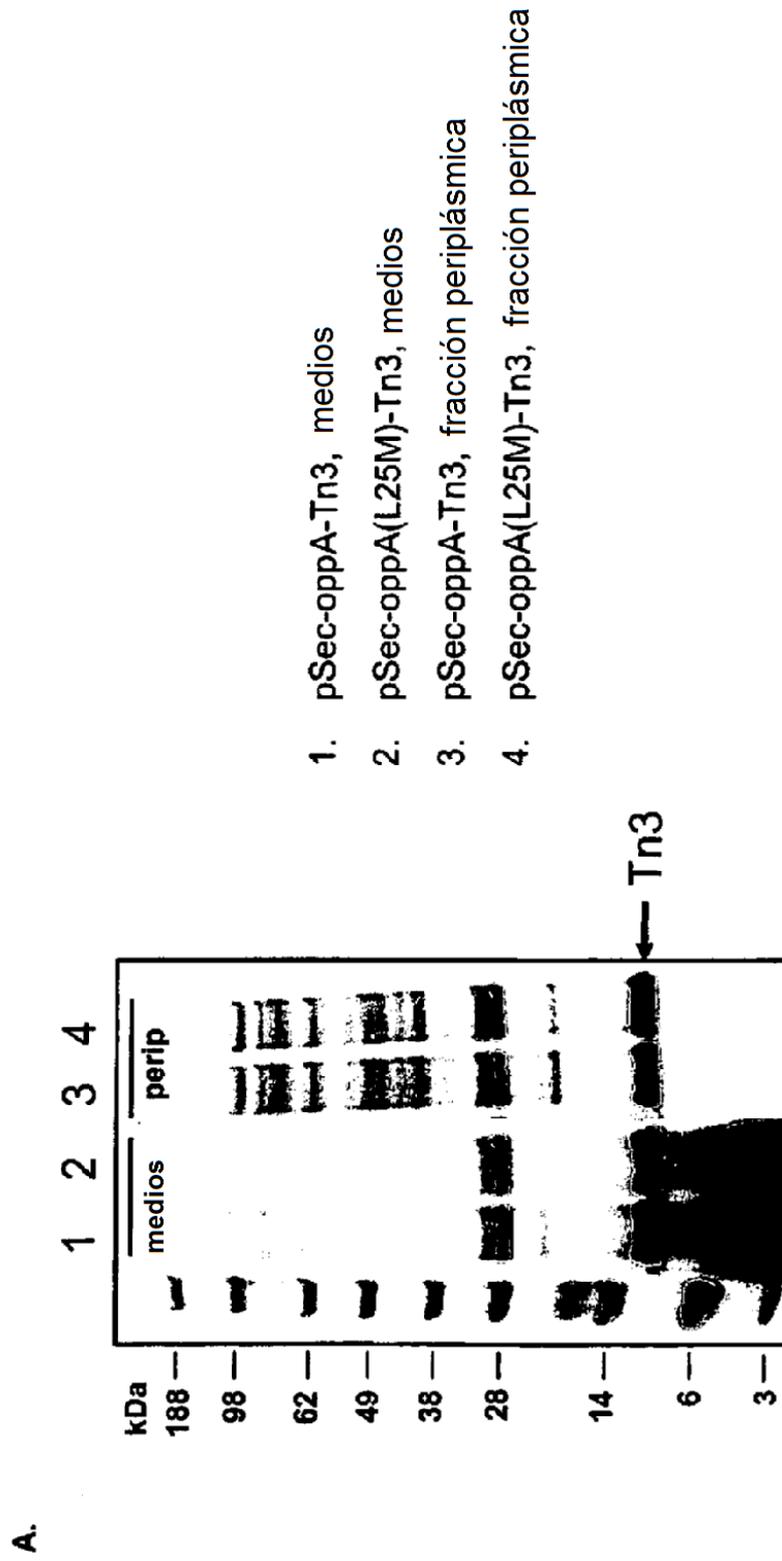


Figura 24. Continuación

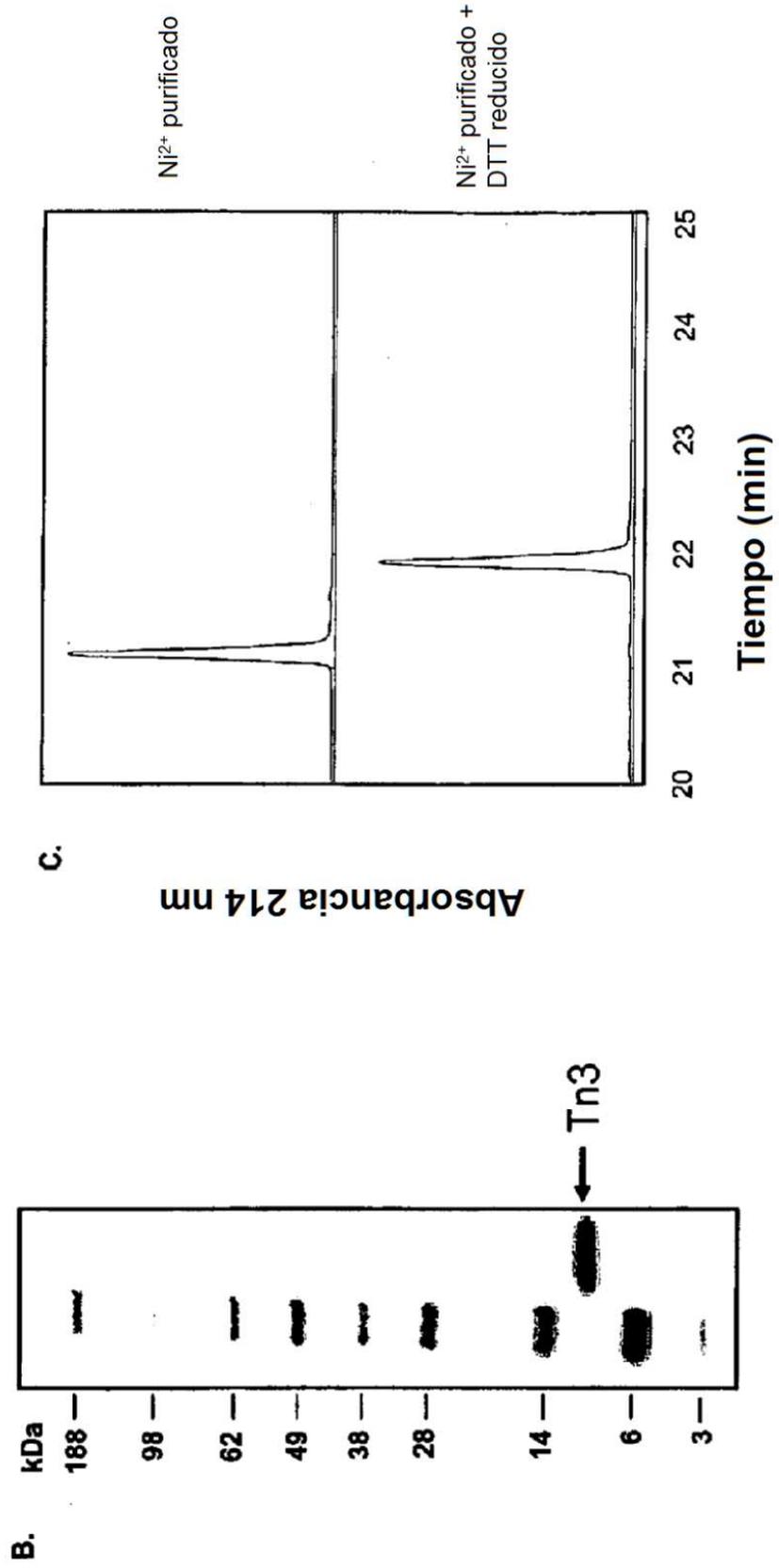


Figura 25

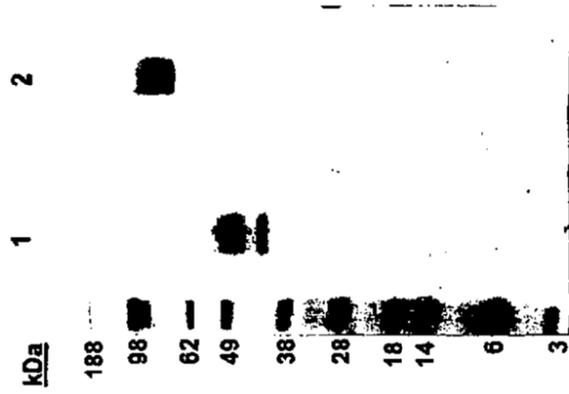


Figura 26.

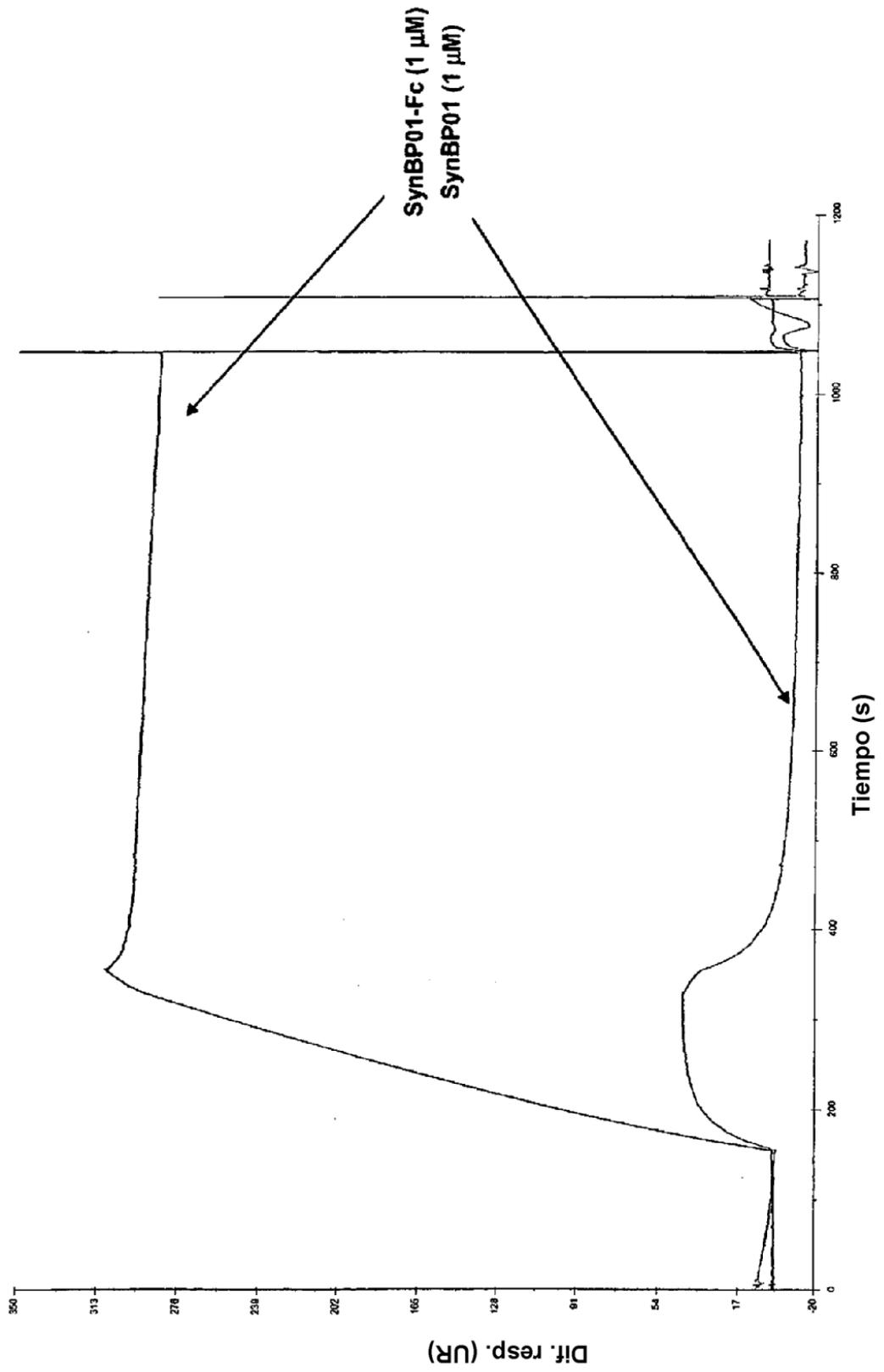


Figura 27.

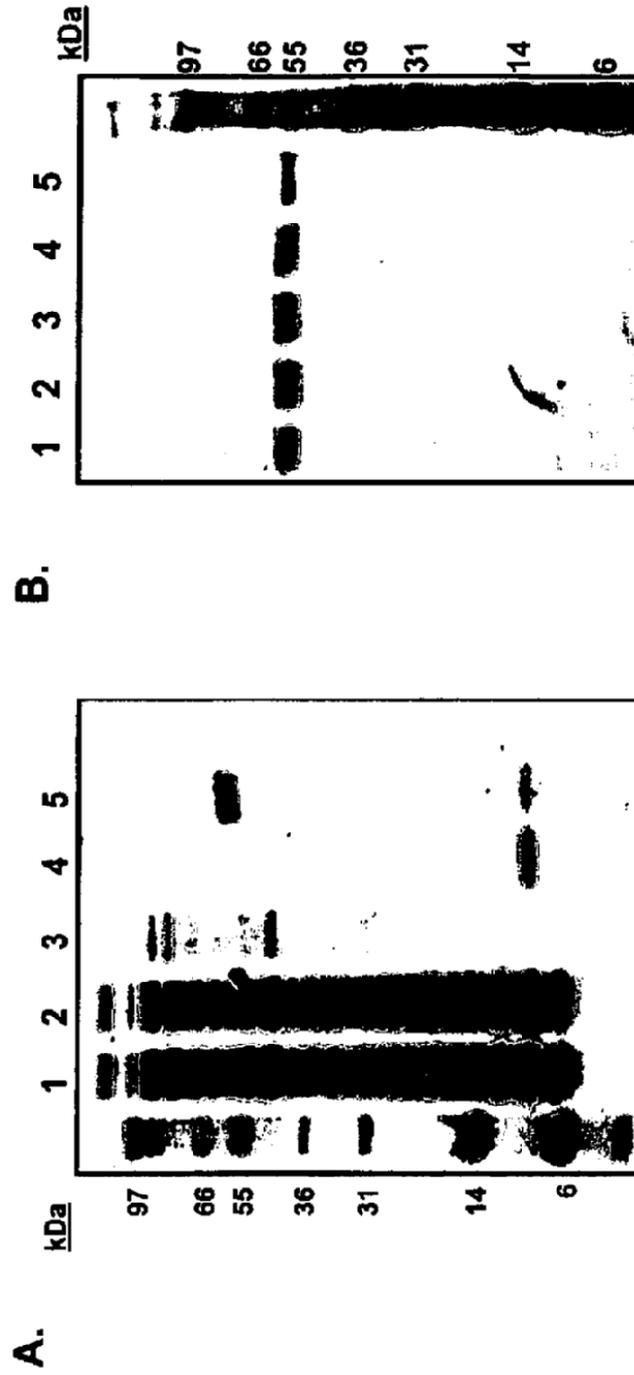


Figura 28.

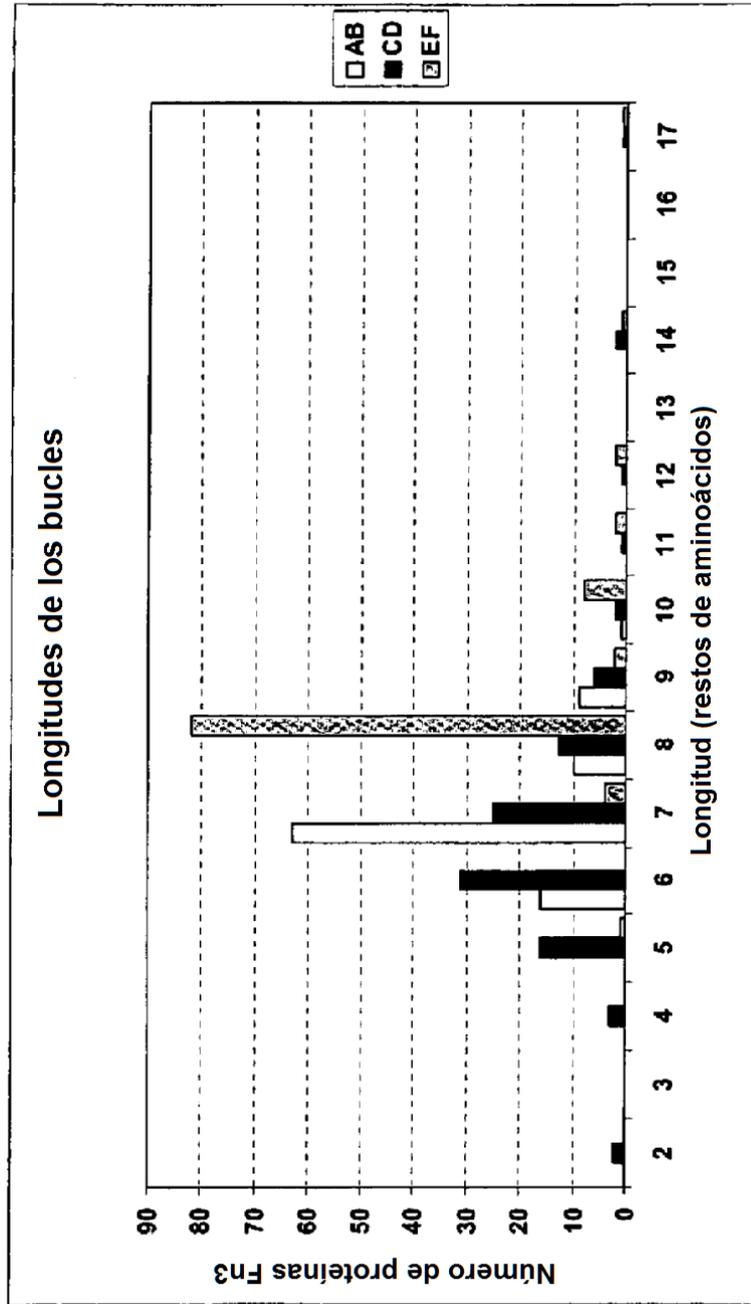


Figura 29.

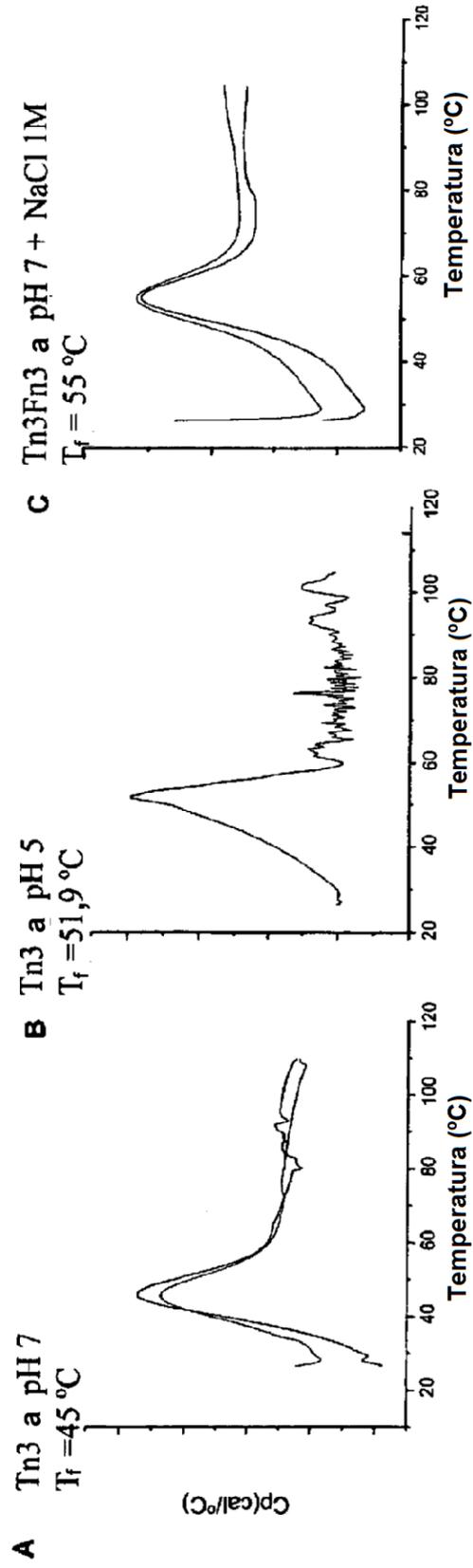


Figura 30.

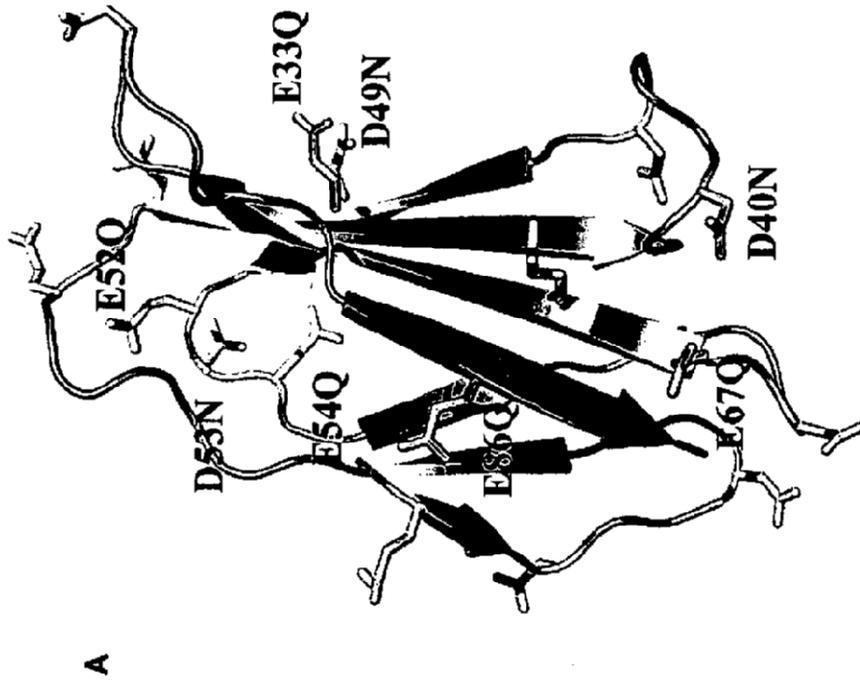


Figura 30 continuación

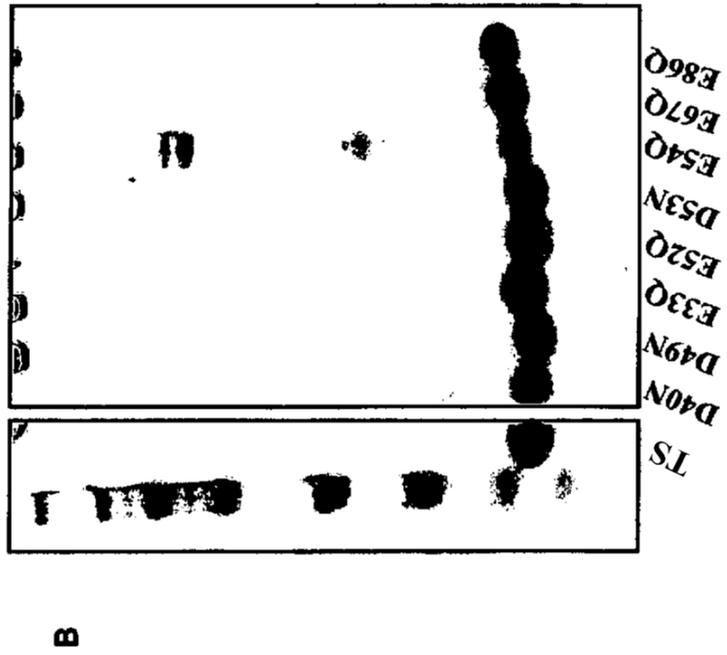


Figura 31

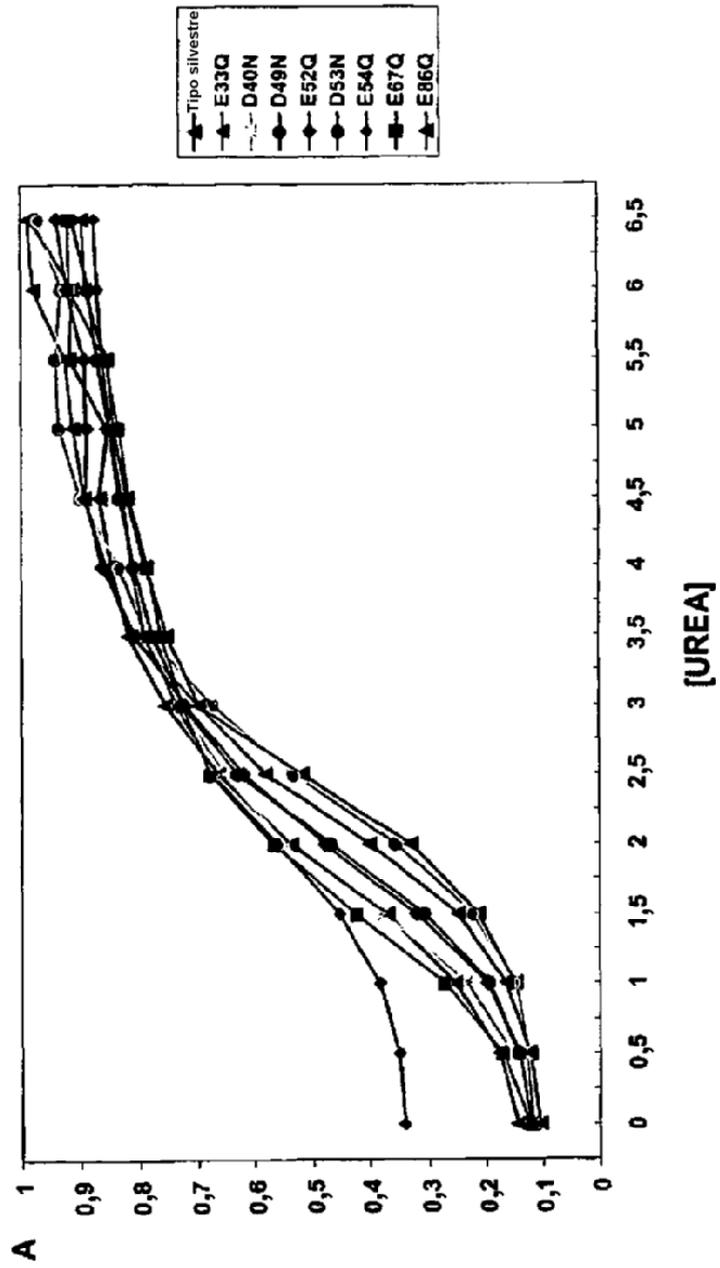


Figura 31 continuación

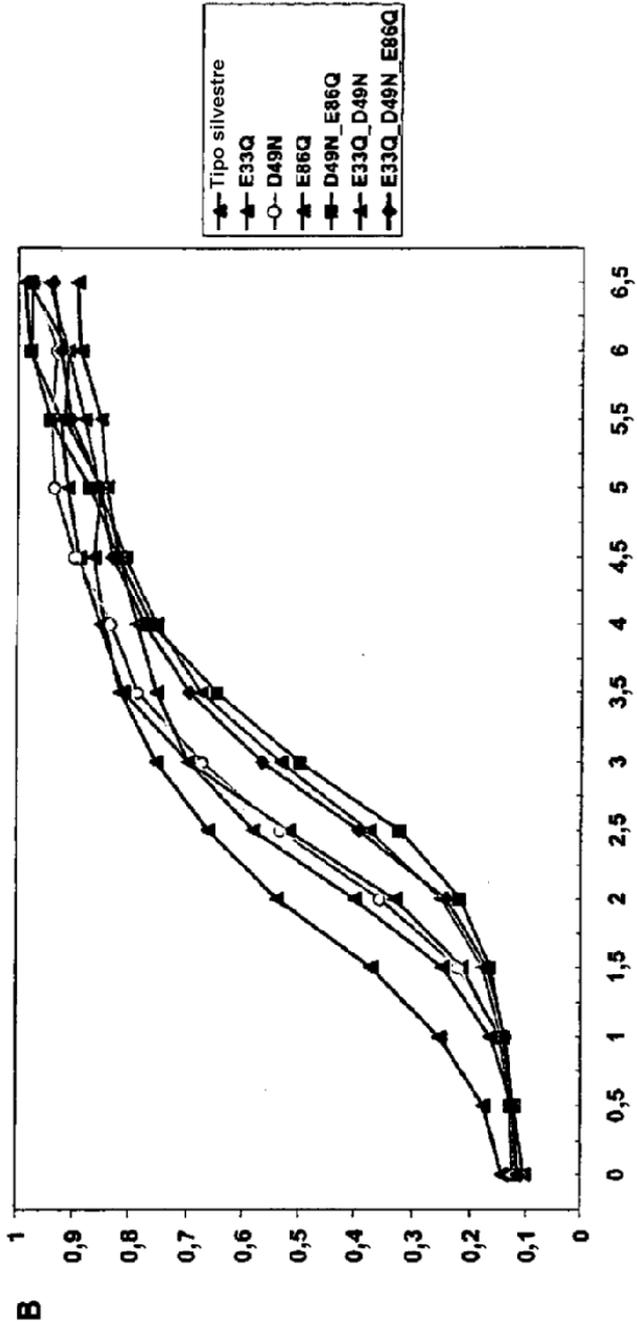


Figura 32

