

19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 573 108**

51 Int. Cl.:

C07K 14/78 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **26.05.2011 E 11731571 (3)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **30.03.2016 EP 2576615**

54 Título: **Proteínas de almacén a base de fibronectina que tienen estabilidad mejorada**

30 Prioridad:

26.05.2010 US 348647 P

26.05.2010 US 348663 P

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

06.06.2016

73 Titular/es:

**BRISTOL-MYERS SQUIBB COMPANY (100.0%)
Route 206 and Province Line Road
Princeton, NJ 08543, US**

72 Inventor/es:

**CAMPHAUSEN, RAY;
O'LOUGHLIN, JOHN;
YEUNG, BERNICE y
ZHANG, YIHONG**

74 Agente/Representante:

VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro

ES 2 573 108 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

Proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen estabilidad mejorada

5 **Introducción**

Los armazones a base de fibronectina son una familia de proteínas capaces de evolucionar para unirse a cualquier compuesto de interés. Estas proteínas, que generalmente hacen uso de un armazón derivado de una fibronectina de tipo III (Fn3) o dominio de tipo Fn3, funcionan de una manera característica de los anticuerpos naturales o modificados por ingeniería genética (es decir, anticuerpos policlonales, monoclonales o monocatenarios) y, además, poseen ventajas estructurales. En concreto, la estructura de estos miméticos de anticuerpo se ha diseñado para el plegamiento óptimo, la estabilidad y la solubilidad, incluso en condiciones que normalmente conducen a la pérdida de estructura y de función en los anticuerpos. Un ejemplo de proteínas de armazón basado en fibronectina son las Adnectins™ (Adnexus, una filial enteramente propiedad de Bristol-Myers Squibb).

La fibronectina es una proteína de gran tamaño que desempeña funciones esenciales en la formación de la matriz extracelular y las interacciones de célula-célula; consiste en muchas repeticiones de tres tipos (tipos I, II y III) de pequeños dominios (Baron *et al.*, 1991). La propia Fn3 es el paradigma de una gran subfamilia que incluye partes de moléculas de adhesión celular, la hormona de la superficie celular y receptores de citocinas, chaperones y dominios de unión a hidratos de carbono. Para una revisión, véase Bork y Doolittle, *Proc Natl Acad Sci EE.UU.*, 1 de octubre de 1992; 89 (19):8990-4; Bork *et al.*, *J Mol Biol.* 30 de septiembre de 1994; 242(4):309-20; Campbell y Spitzfaden, *Structure.* 15 de mayo de 1994;2(5):333-7; Harpez y Chothia, *J Mol Biol.* 13 de mayo de 1994; 238(4):528-39).

Los dominios de fibronectina de tipo III (Fn3) comprenden, ordenados desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, una cadena beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una cadena beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una cadena beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una cadena beta o de tipo beta, G. Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión a la diana. Los bucles BC, DE y FG son tanto estructural como funcionalmente análogos a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas. La patente de EE.UU. n.º 7.115.396 describe proteínas de dominio Fn3 en el que las modificaciones en los bucles BC, DE y FG dan lugar a aglutinantes de TNF α de alta afinidad. La publicación de EE.UU. n.º 2007/0148126 describe proteínas de dominio Fn3 en el que las alteraciones en los bucles BC, DE y FG dan lugar a aglutinantes de VEGFR2 de alta afinidad. En el documento WO 2008/153745, se describen proteínas de fusión recombinantes que comprenden, entre otros, una décima parte del dominio Fn3. El documento WO 2009/133208 describe moléculas de unión basadas en Fn3 que se unen a un antígeno diana específico, así como moléculas de unión basadas en Fn3 biespecíficas y multiespecíficas.

Los productos farmacéuticos de proteínas pueden estar asociados a la inestabilidad física y química durante su producción, purificación, almacenamiento y administración. Estos problemas de inestabilidad pueden afectar adversamente a las propiedades biológicas asociadas a la proteína terapéutica, reduciendo con ello la eficacia de dicha proteína terapéutica. Sola, 2009, *J. Pharm Sci*, 98 (4): 1223-1245. Por consiguiente, sería ventajoso obtener proteínas de armazón de dominio de fibronectina mejoradas que estén asociadas a una mejor estabilidad, por ejemplo, una fragmentación y/o agregación reducidas, que se puedan usar tanto con fines terapéuticos como de diagnóstico.

Sumario

La presente invención proporciona nuevas proteínas de armazón a base de fibronectina que están asociadas al aumento de la estabilidad, incluyendo la reducción de la fragmentación y/o la reducción de la agregación.

Las nuevas proteínas de armazón a base de fibronectina son dímeros de proteínas a base de fibronectina que comprenden un primer décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰Fn3) y un segundo dominio ¹⁰Fn3, en las que cada uno de entre el primer dominio ¹⁰Fn3 y el segundo dominio ¹⁰Fn3:

- (i) comprende un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF y un bucle FG, teniendo al menos un bucle seleccionado entre el bucle BC, DE y FG una secuencia de aminoácidos modificada con respecto a la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰Fn3 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60 % de identidad con SEQ ID NO: 1 y se une a una molécula diana con una KD inferior a 100 nM, y
- (iii) comprende una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y no contiene una secuencia DK.

En algunas realizaciones, la cola C-terminal comprende además un resto de cisteína.

En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina se unen a una diana que no está unida por

- 5 un dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre. En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina no se unen a uno o más de EGFR, albúmina de suero humano o PCSK9. En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina multivalentes no se unen a una o más de las siguientes combinaciones de moléculas diana: i) EGFR e IGF-IR; ii) EGFR y cualquier otra proteína diana; o iii) albúmina de suero humano y cualquier otra proteína diana.
- 10 En algunas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 de la proteína de armazón a base de fibronectina comprenden además una extensión N-terminal que comprende de 1 a 10 aminoácidos. En otras realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 de la proteína de armazón a base de fibronectina comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, G, y cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21 y 26-31.
- 15 En algunas realizaciones, el primer y segundo dominio ¹⁰F_n3 se unen a diferentes dianas. En algunas realizaciones, el segundo dominio ¹⁰F_n3 comprende además una extensión N-terminal que comprende de 1 a 10 aminoácidos. En algunas realizaciones, la extensión N-terminal comprende una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, G, y cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21 y 25-31. En algunas realizaciones, el primer y el segundo dominios ¹⁰F_n3 están conectados por un enlazador polipeptídico que comprende de 1 a 30 aminoácidos. En algunas realizaciones, el enlazador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: un enlazador a base de glicina y serina, un enlazador a base de glicina y prolina, un enlazador de prolina y alanina y un enlazador a base de Fn.
- 20 En ciertas realizaciones, los dominios ¹⁰F_n3 comprenden una secuencia de aminoácidos que es al menos el 70 o el 80 % idéntica al dominio ¹⁰F_n3 humano natural representado por SEQ ID NO: 1.
- 25 En otro aspecto, la solicitud proporciona nuevos dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina que están asociados a una fragmentación de proteínas reducida en comparación con los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina descritos en la solicitud PCT WO 2009/142773. En algunas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48.
- 30 En otro aspecto, la solicitud proporciona dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2. En cierta realización, N1 y N2 son extensiones N-terminales opcionales que comprenden de manera independiente de 0 a 10 aminoácidos; D1 y D2 se seleccionan, de manera independiente, del grupo que consiste en: (i) un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, en la que dicho dominio ¹⁰F_n3 se une a IGF-IR con una K_D inferior a 100 nM; e (ii) un dominio ¹⁰F_n3 que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, en la que dicho dominio ¹⁰F_n3 se une a VEGFR2 con una K_D inferior a 100 nM; L es un enlazador polipeptídico que comprende de 0 a 30 restos de aminoácidos; C1 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4; y C2 comprende la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 4 o 6.
- 35 En algunas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que D1 comprende un dominio ¹⁰F_n3 que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, y D2 comprende un dominio ¹⁰F_n3 que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3. En otras realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que D1 comprende un dominio ¹⁰F_n3 que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, y D2 comprende un dominio ¹⁰F_n3 que tiene al menos el 95 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.
- 40 En algunas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que C2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.
- 45 En algunas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que N1 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, G, y una cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21 y 26-31. En realizaciones ilustrativas, N1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En algunas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que N2 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, G, y una cualquiera de las SEQ ID NO: 19-21 y 26-31. En realizaciones ilustrativas, N2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.
- 50 En algunas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que L es un enlazador polipeptídico seleccionado del grupo que consiste en: un enlazador a base de glicina y serina, un enlazador a base de glicina y prolina, un enlazador de prolina y alanina y un enlazador a base de Fn. En otras realizaciones, L comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 7.
- 55 En algunas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina comprenden además uno o más restos farmacocinéticos (PK) seleccionados entre: un resto de polioxilalquileo, una proteína de unión a la albúmina de suero humano, ácido siálico, albúmina de suero humano, transferrina, IgG, una proteína de unión a IgG y un
- 60
- 65

fragmento Fc. En algunas realizaciones, el resto PK es un resto de polioxiálquileo, y dicho resto de polioxiálquileo es polietilenglicol (PEG). En algunas realizaciones, el resto de PEG está unido covalentemente a la proteína de armazón a base de fibronectina a través de un aminoácido Cys o Lys. En algunas realizaciones, el PEG es de entre aproximadamente 0,5 kDa y aproximadamente 100 kDa.

5 En un aspecto, la solicitud proporciona composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden una proteína de armazón a base de fibronectina según lo descrito en el presente documento. En algunas realizaciones, la composición está esencialmente exenta de pirógenos. En algunas realizaciones, la composición está esencialmente exenta de contaminación microbiana, por lo que es adecuada para la administración *in vivo*. La composición se puede formular, por ejemplo, la administración IV, IP o subcutánea. En algunas realizaciones, la composición comprende un vehículo fisiológicamente aceptable. En algunas realizaciones, el pH de la composición está entre 4,0-6,5. En algunas realizaciones, el pH de la composición está entre 4,0-5,5. En otras realizaciones, el pH de la composición es de 5,5. En otras realizaciones, el pH de la composición es de 4,0. En algunas realizaciones, la concentración de la proteína de armazón a base de fibronectina es de 5 mg/ml en la composición.

15 En otro aspecto, la solicitud proporciona una formulación farmacéutica que comprende una proteína de armazón a base de fibronectina, en la que la formulación comprende al menos 5 mg/ml de la proteína de armazón a base de fibronectina, tiene un pH de 4,0 y es adecuada para la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica es estable durante al menos 4 semanas a 25 °C. En algunas realizaciones, la formulación farmacéutica tiene menos del 4 % de fragmentación. En algunas realizaciones, la formulación tiene menos del 4 % de agregados.

20 La formulación farmacéutica se puede usar en un método de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo en un sujeto, que comprende administrar a un sujeto que lo necesita una cantidad terapéuticamente eficaz de la composición descrita en el presente documento.

25 En otro aspecto, la solicitud proporciona un ácido nucleico que codifica una proteína de armazón a base de fibronectina como se describe en el presente documento. También se incluyen vectores que contienen polinucleótidos para dichas proteínas. Los vectores adecuados incluyen, por ejemplo, vectores de expresión. Además, en el presente documento, se describe una célula que comprende un polinucleótido, un vector o un vector de expresión que codifica una proteína de armazón a base de fibronectina. Las secuencias se optimizan preferentemente para maximizar la expresión en el tipo de célula usado. Por ejemplo, la expresión es en una célula bacteriana o en una célula de mamífero. Preferentemente, la expresión es en *E. coli*. La célula puede expresar una proteína de armazón a base de fibronectina. Los polinucleótidos que codifican las proteínas de armazón a base de fibronectina pueden tener los codones optimizados para la expresión en el tipo de célula seleccionado. También se describen métodos de producción de una proteína de armazón a base de fibronectina como se describe en el presente documento, que comprenden cultivar una célula hospedadora que comprende un ácido nucleico, un vector o un vector de expresión, que comprende un ácido nucleico que codifica la proteína de armazón a base de fibronectina y recuperar la proteína de armazón a base de fibronectina expresada del cultivo.

40

Breve descripción de las figuras

45 Figura 1. Datos de cromatografía líquida de exclusión por tamaño de alta presión (SE-HPLC) que muestran la cantidad de agregación de proteínas a lo largo del tiempo para dos concentraciones de V/I(DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 22). La proteína PEGilada se almacenó a 4 °C durante 12 meses en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5 a 3 mg/ml de concentración de proteína.

Figura 2. Datos de SE-HPLC que muestran la cantidad de fragmentación de proteínas a lo largo del tiempo para dos concentraciones de V/I(DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 22). La proteína PEGilada se almacenó a 4 °C durante 12 meses en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 5,5 a 3 mg/ml de concentración de proteína.

50 Figura 3. Datos de SE-HPLC que muestran el efecto del pH sobre la agregación de proteínas a lo largo del tiempo para V/I(DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 22). La proteína PEGilada se almacenó a 25 °C durante 3 semanas en una formulación que contenía NaCl 50 mM, con acetato de sodio 20 mM (pH de 4 y 5) o fosfato de sodio 20 mM (pH de 6 y 7).

55 Figura 4. Datos de SE-HPLC que muestran el efecto del pH sobre la fragmentación de proteínas a lo largo del tiempo para V/I(DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 22). La proteína PEGilada se almacenó a 25 °C durante 3 semanas en una formulación que contenía NaCl 50 mM, con acetato de sodio 20 mM (pH de 4 y 5) o fosfato de sodio 20 mM (pH de 6 y 7).

60 Figura 5. Perfil de cromatografía líquida de alta presión en fase inversa (RP-HPLC) que muestra los sitios de escisión de la molécula de V/I(DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 22) después del almacenamiento a 25 °C durante 4 semanas en acetato 10 mM, NaCl 150 mM a pH 5,5. Como se indica en la figura, la escisión de la proteína se produce inmediatamente después de las posiciones D95, D106, D180 y D200, teniendo lugar la escisión predominantemente inmediatamente después de los sitios D95 y D200. La proteína PEGilada se almacenó durante 4 semanas a 25 °C en acetato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5 a 5 mg/ml de concentración de proteína.

65 Figura 6. Datos de SE-HPLC que muestran el efecto del pH sobre la agregación de proteínas a lo largo del tiempo para la E/I (DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 23). La proteína PEGilada se almacenó durante 4 semanas a

25 °C en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 4,0, 4,5 y 5,5.

Figura 7. Datos de SE-HPLC que muestran el efecto del pH sobre la cantidad de fragmentación de proteínas a lo largo del tiempo para la E/I (DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 23). La proteína PEGilada se almacenó durante 4 semanas a 25 °C en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 4,0, 4,5 y 5,5.

Figura 8. Perfil de RP-HPLC que muestra los sitios de escisión de la E/I (DK+) PEGilada (SEQ ID NO: 23) después del almacenamiento a 25 °C durante 4 semanas en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 4,0, concentración de proteína de 5 mg/ml. Como se indica en la figura, la escisión de la proteína se produce inmediatamente después de las posiciones D95, D199 y D218.

Figura 9. Datos de SE-HPLC que demuestran el efecto del pH sobre la agregación de las proteínas a lo largo del tiempo para diversas construcciones de proteínas de armazón a base de fibronectina. El nivel de agregación para diversas proteínas de armazón a base de fibronectina se ensayó a pH 5,5 o pH 4,0 durante el almacenamiento durante 4 semanas a 25 °C. E/I(DK+) es SEQ ID NO: 23; E/I(DK-, sin término C) es la SEQ ID NO: 24; E/I(2DK-) es SEQ ID NO: 25; y V/I(DK+) es SEQ ID NO: 22.

Figura 10. Datos de RP-HPLC que muestran la cantidad de fragmentación de diversas proteínas de armazón a base de fibronectina a diferentes pH durante el almacenamiento de 4 semanas a 25 °C. Las proteínas de armazón a base de fibronectina que contienen secuencias DK son más susceptibles a la fragmentación a pH 4,0 que a pH 5,5. Las proteínas de armazón a base de fibronectina que no contienen secuencias DK son más resistentes a la fragmentación a pH 4,0 en comparación con las proteínas de armazón a base de fibronectina que contienen secuencias DK. E/I(DK+) es SEQ ID NO: 23; E/I(DK, sin término C) es la SEQ ID NO: 24; E/I(2DK-) es SEQ ID NO: 25; y V/I(DK+) es SEQ ID NO: 22.

Figura 11. Datos de LC-MS que demuestran que el sitio de escisión principal de la molécula E/I(DK-, sin término C) (SEQ ID NO: 24) es D199, mientras que el sitio de escisión principal en la molécula E/I(DK+) (SEQ ID NO: 23) es D218.

Figura 12. Datos de LC-MS que demuestran que el sitio de escisión principal de la molécula E/I(2DK-) (SEQ ID NO: 25) es D199.

Figura 13. Las velocidades de agregación observadas en VI(DK+) (SEQ ID NO: 56) y VI(DK-) (SEQ ID NO: 57), en el almacenamiento a 25 °C durante un máximo de dos meses, evaluadas mediante análisis de SE-HPLC.

Figura 14. Velocidades de recorte observadas en VI(DK+) (SEQ ID NO: 56) y VI(DK-) (SEQ ID NO: 57), en almacenamiento a 25 °C durante hasta dos meses, determinadas mediante análisis de RP-HPLC.

Figura 15. Velocidades de recorte de un cromatograma superpuesto en RP-HPLC de VI(DK+) (SEQ ID NO: 56) y VI(DK-) (SEQ ID NO: 57), tras la incubación durante 2 meses a 25 °C. El % total de recortes para VI (DK +) es del 16 %, mientras que para VI(DK-) es del 6,9 %.

Descripción detallada

Definiciones

Por "polipéptido" se entiende cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, modificación posterior a la traducción o función. "Polipéptido", "péptido" y "proteína" se usan indistintamente en el presente documento. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la patente de EE.UU. n.º 6.559.126. Los polipéptidos también se pueden modificar en cualquiera de varias formas químicas convencionales (por ejemplo, un aminoácido se puede modificar con un grupo protector; el aminoácido carboxi-terminal se puede convertir en un grupo amida terminal; el resto amino-terminal se puede modificar con grupos para, por ejemplo, aumentar la lipofilia; o el polipéptido puede estar glicosilado químicamente o modificado de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de los polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura tal como un compuesto cíclico u otra molécula al polipéptido, y también pueden incluir polipéptidos que contengan uno o más aminoácidos en una configuración modificada (es decir, R o S; o L o D).

"Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos", en el presente documento, se define como el porcentaje de restos de aminoácidos de una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos de una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia, y sin considerar ninguna sustitución conservadora como parte de la identidad de secuencia. La alineación con fines de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos se puede lograr de varias maneras que son competencia de los expertos en la materia, por ejemplo, usando el software informático disponible para el público en general, tal como el software BLAST, BLAST-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros apropiados para medir la alineación, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima a lo largo de todas las secuencias que se comparan. Sin embargo, a los efectos del presente documento, se obtienen valores de % de identidad de secuencia de aminoácidos como se describe más adelante usando el programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2. El programa informático de comparación de secuencias ALIGN-2 fue creado por Genentech, Inc., y se ha presentado con la documentación de usuario en la Oficina de Copyright de EE.UU., Washington D.C., 20559, donde se ha registrado con el n.º de registro de Copyright de EE.UU. TXU510087, y se encuentra a disposición del público en general a través de Genentech, Inc., South San Francisco, California. El programa ALIGN-2 debería compilarse para su uso en un sistema operativo UNIX, preferentemente UNIX V4.0D digital. Todos los parámetros de comparación de secuencias están establecidos por el programa ALIGN-2 y no

varían.

A los efectos del presente documento, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B (que, como alternativa, puede expresarse como una secuencia de aminoácidos dada A que tiene o comprende un cierto % de identidad de secuencia de aminoácidos con respecto a, con o frente a una secuencia de aminoácidos dada B) se calcula de la siguiente manera: 100 veces la fracción X/Y, donde X es el número de restos de aminoácido identificados como apareamientos idénticos por el programa de alineación de secuencias ALIGN-2 en esa alineación del programa de A y B, y donde Y es el número total de restos de aminoácido de B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de la secuencia de aminoácidos de A con respecto a B no será igual al % de identidad de la secuencia de aminoácidos de B con respecto a A.

La expresión "cantidad terapéuticamente eficaz" se refiere a una cantidad de un fármaco eficaz para tratar una enfermedad o un trastorno en un mamífero. En el caso del cáncer, la cantidad terapéuticamente eficaz del fármaco puede reducir el número de células cancerosas; reducir el tamaño del tumor; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la infiltración de las células cancerosas en órganos periféricos; inhibir (es decir, ralentizar en cierto grado y preferentemente detener) la metástasis tumoral; inhibir, en cierta medida, el crecimiento del tumor; y/o aliviar en cierta medida uno o más de los síntomas asociados al trastorno. En la medida en que el fármaco puede prevenir el crecimiento y/o matar las células cancerosas existentes, puede ser citostático y/o citotóxico. Para la terapia del cáncer, la eficacia *in vivo* se puede medir, por ejemplo, mediante la evaluación del tiempo hasta la progresión de la enfermedad (TPE) y/o la determinación de las velocidades de respuesta (TR).

La semivida de una secuencia de aminoácidos o de un compuesto, en general, se puede definir como el tiempo que tarda la concentración en suero del polipéptido en reducirse en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo debido a la degradación de la secuencia o del compuesto y/o al aclaramiento o al secuestro de la secuencia o del compuesto por mecanismos naturales. La semivida se puede determinar de cualquier manera conocida en sí, por ejemplo, por análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la materia, y pueden, por ejemplo en general, implicar las etapas de administrar adecuadamente al primate una dosis adecuada de la secuencia de aminoácidos o del compuesto que se va a tratar; la extracción de muestras de sangre u otras muestras de dicho primate a intervalos regulares; la determinación del nivel o de la concentración de la secuencia de aminoácidos o del compuesto de la invención en dicha muestra de sangre; y el cálculo, a partir de (una representación de) los datos obtenidos de este modo, el tiempo hasta que el nivel o la concentración de la secuencia de aminoácidos o de un compuesto de la invención se ha reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial tras la dosificación. Se hace referencia, por ejemplo, a los manuales convencionales tales como Kenneth, A. *et al*: "Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists"; y en Peters *et al*, "Pharmacokinetic analysis: A Practical Approach" (1996). También se hace referencia a "Pharmacokinetics", M. Gibaldi y D. Perron, publicado por Marcel Dekker, 2ª edición revisada (1982).

La semivida se puede expresar usando parámetros tales como el $t_{1/2}$ -alfa, $t_{1/2}$ -beta y el área bajo la curva (AUC). En la presente memoria descriptiva, un "aumento en la semivida" se refiere a un aumento en uno cualquiera de estos parámetros, tal como dos cualquiera de estos parámetros, o esencialmente los tres de estos parámetros. Un "aumento de la semivida", en particular, se refiere a un aumento en la $t_{1/2}$ -beta, bien con o sin un aumento de $t_{1/2}$ -alfa y/o la AUC o ambos.

Visión de conjunto

La presente solicitud describe proteínas de armazón a base de fibronectina mejoradas que están asociadas a estabilidad aumentada. Las proteínas de armazón a base de fibronectina descritas en el presente documento comprenden decimos dominios de fibronectina de tipo III humanos que han sido modificados para unirse a una o más dianas deseadas. La presente solicitud también describe mejores dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina de VEGFR2/IGF-IR biespecíficas que están asociados a una mayor estabilidad, que comprenden dos decimos dominios de fibronectina de tipo III humanos, uno que ha sido modificado para unirse específicamente a VEGFR2 y uno que ha sido modificado para unirse específicamente a IGF-IR. La solicitud PCT WO 2009/142773 describe multímeros de armazón de fibronectina que se pueden unir de forma covalente o no covalente, y que se unen tanto a VEGFR2 como a IGF-IR. La presente solicitud se refiere, en parte, al sorprendente descubrimiento de que las proteínas de armazón a base de fibronectina biespecíficas que se unen a VEGFR2 e IGF-IR presentan una alta frecuencia de fragmentación en ciertos restos de aspartato. En particular, se ha descubierto que los restos de aspartato seguidos directamente por un resto de lisina son más sensibles a la escisión en las proteínas de armazón a base de fibronectina en comparación con los restos de aspartato seguidos por otros aminoácidos. La solicitud también se refiere al sorprendente descubrimiento de que el grado de fragmentación de las proteínas de armazón a base de fibronectina de unión a VEGFR2/IGF-IR es considerablemente más alto que el grado de fragmentación asociado a una proteína de armazón a base de fibronectina relacionada, es decir, un dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina de unión a EGFR/IGF-IR biespecífico, a pesar de las condiciones de almacenamiento idénticas y un alto porcentaje de identidad de secuencia compartida entre estas proteínas similares. La solicitud también demuestra que la fragmentación de una proteína de armazón a base de fibronectina de modelo

se puede reducir notablemente si se retiran o se modifican los sitios DK para sustituir el resto de aspartato por un aminoácido diferente, por ejemplo, ácido glutámico. También se proporcionan en el presente documento composiciones mejoradas de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen una mayor estabilidad durante el almacenamiento.

5

Armazones a base de fibronectina

F_n3 se refiere a un dominio de tipo III de fibronectina. Un dominio de F_n3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de enlaces disulfuro y, por lo tanto, es estable en condiciones reductoras. La estructura general de F_n3 se parece al pliegue de la inmunoglobulina. Los dominios F_n3 comprenden, en orden desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal, una cadena beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una cadena beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una cadena beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una cadena beta o de tipo beta, G. Las siete cadenas β antiparalelas están dispuestas como dos láminas beta que forman un núcleo estable, mientras se crean dos "caras" compuestas por los bucles que conectan las cadenas beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF se encuentran en una cara y los bucles BC, DE y FG están situados en la cara opuesta. Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG pueden participar en la unión al ligando. Hay por lo menos 15 módulos diferentes de F_n3, y aunque la homología de secuencia entre los módulos es baja, todos comparten una alta similitud en la estructura terciaria.

10

15

20

Adnectins™ (Adnexus, Bristol-Myers Squibb Company) son proteínas de armazón de unión al ligando basadas en el décimo dominio de fibronectina de tipo III, es decir, el décimo módulo de F_n3, (¹⁰F_n3). La secuencia de aminoácidos del ¹⁰F_n3 humano natural se expone en SEQ ID NO: 37: VSD VPRDLEWAATPTSLLSWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS GLKPGVDYITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 37) (los bucles AB, CD y EF están subrayados, y los bucles BC, FG y DE se señalan en negrita).

25

En SEQ ID NO: 37, el bucle AB corresponde a los restos 15-16, el bucle BC corresponde a los restos 21-30, el bucle CD corresponde a los restos 39-45, el bucle DE corresponde a los restos 51-56, el bucle EF corresponde a los restos 60-66, y el bucle FG corresponde a los restos 76-87. Véase, por ejemplo, Xu *et al.*, *Chemistry & Biology* 2002 9:933-942. Los bucles BC, DE y FG se alinean a lo largo de una cara de la molécula y los bucles AB, CD y EF se alinean a lo largo de la cara opuesta de la molécula. En SEQ ID NO: 37, la cadena beta A corresponde a los restos 9-14, la cadena beta B corresponde a los restos 17-20, la cadena beta C corresponde a los restos 31-38, la cadena beta D corresponde a los restos 46-50, la cadena beta E corresponde a los restos 57-59, la cadena beta F corresponde a los restos 67-75 y la cadena beta G corresponde a los restos 88-94. Las cadenas están conectadas entre sí a través del bucle correspondiente, por ejemplo, las cadenas A y B están conectadas a través del bucle AB en el orden: cadena A, bucle AB, cadena B, etc. Los 8 primeros aminoácidos de SEQ ID NO: 37 (en cursiva anteriormente) se pueden eliminar al tiempo que se conserva la actividad de unión de la molécula. Los restos que participan en la formación del núcleo hidrófobo (los "restos de aminoácidos básicos") en la SEQ ID NO: 37 incluyen los aminoácidos que corresponden a los siguientes aminoácidos de SEQ ID NO: 37: L8, V10, A13, L18, I20, W22, Y32, I34, Y36, F48, V50, A57, I59, L62, Y68, I70, V72, A74, I88, I90 e Y92, en la que los restos de aminoácidos básicos están representados por el código de aminoácidos de una sola letra seguido de la posición en la que se encuentran dentro de SEQ ID NO: 37. Véase, por ejemplo, Dickinson *et al.*, *J. Mol. Biol.* 236: 1079-1092 (1994).

30

35

40

45

Los dominios ¹⁰F_n3 son estructural y funcionalmente análogos a los anticuerpos, específicamente a la región variable de un anticuerpo. Aunque los dominios ¹⁰F_n3 se pueden describir como "miméticos de anticuerpo" o "proteínas de tipo anticuerpo", ofrecen una serie de ventajas frente a los anticuerpos convencionales. En particular, presentan mejores propiedades de plegamiento y termoestabilidad en comparación con los anticuerpos, y carecen de enlaces disulfuro, que se sabe que impiden o previenen el plegamiento apropiado en ciertas condiciones.

50

55

60

Los bucles BC, DE y FG de los dominios ¹⁰F_n3 son análogos a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de las inmunoglobulinas. La modificación de la secuencia de aminoácidos en estas regiones del bucle cambia la especificidad de unión de ¹⁰F_n3. También se pueden crear dominios ¹⁰F_n3 con modificaciones en los bucles AB, CD y EF con el fin de producir una molécula que se una a una diana deseada. Las secuencias de la proteína fuera de los bucles son análogas a las regiones marco de las inmunoglobulinas, y desempeñan un papel en la configuración estructural de ¹⁰F_n3. Las modificaciones en las regiones de tipo marco de ¹⁰F_n3 son permisibles en la medida en que la configuración estructural no esté tan alterada como para interrumpir la unión del ligando. Los métodos para generar aglutinantes específicos del ligando ¹⁰F_n3 se han descrito en las publicaciones PCT n.º WO 00/034787, WO 01/64942 y WO 02/032925, que desvelan aglutinantes de TNFα de alta afinidad, la publicación PCT n.º WO 2008/097497, que desvela aglutinantes de VEGFR2 de alta afinidad, la publicación PCT n.º WO 2008/066752, que desvela aglutinantes de IGF-IR de alta afinidad y WO 2009/142773, que desvela aglutinantes de VEGFR2/IGF-IR multivalentes de alta afinidad. Las referencias adicionales que describen aglutinantes de ¹⁰F_n3 y métodos de selección de aglutinantes incluyen las publicaciones PCT n.º WO 98/056915, WO 02/081497 y WO 2008/031098 y la publicación de EE.UU. n.º 2003/0186385.

65

Como se ha descrito anteriormente, los restos de aminoácidos correspondiente a los restos 21-30, 51-56 y 76-87 de SEQ ID NO: 37 definen los bucles BC, DE y FG, respectivamente. Sin embargo, se debe entender que no es

necesario modificar todos los restos de la región del bucle para lograr un dominio de unión de ¹⁰F_n3 que tenga una fuerte afinidad por una diana deseada, tal como VEGFR2 o IGF-IR. Por ejemplo, en algunas realizaciones, únicamente se modificaron los restos correspondientes a los aminoácidos 23-29 del bucle BC, 52-55 del bucle DE y 77-86 del bucle FG para producir aglutinantes de ¹⁰F_n3 de alta afinidad (véase, por ejemplo, el núcleo de unión a VEGFR2 que tiene la SEQ ID NO: 3). Por consiguiente, en ciertas realizaciones, el bucle BC puede estar definido por los aminoácidos correspondientes a los restos 23-29 de SEQ ID NO: 37, el bucle DE puede estar definido por los aminoácidos que corresponden a los restos 52-55 de SEQ ID NO: 37, y el bucle FG puede estar definido por los aminoácidos que corresponden a los restos 77-86 de SEQ ID NO: 37.

Además, las inserciones y las eliminaciones realizadas en las regiones de bucle también se pueden realizar a la vez que se producen dominios de unión de ¹⁰F_n3 de alta afinidad. Por ejemplo, el bucle FG del aglutinante de VEGFR2 que tiene la SEQ ID NO: 3 tiene la misma longitud de bucle FG que el dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, es decir, los 10 restos 77-86 de SEQ ID NO: 37 se sustituyeron con los diez restos 69-78 de SEQ ID NO: 3. Por el contrario, el bucle FG del aglutinante de IGF-IR que tiene la SEQ ID NO: 2 es más corto que el correspondiente bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, es decir, los 10 restos 77-86 de SEQ ID NO: 37 se sustituyeron con los seis restos 69-74 de SEQ ID NO: 2. Por último, el bucle FG del aglutinante de EGFR que tiene la SEQ ID NO: 39 es más largo que el correspondiente bucle FG del dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, es decir, los 10 restos 77-86 de SEQ ID NO: 37 se sustituyeron con los quince restos 69-83 de SEQ ID NO: 39.

Por consiguiente, en algunas realizaciones, la longitud de uno o más bucles seleccionados entre BC, DE y FG pueden extenderse o acortarse en relación con el bucle correspondiente del ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre. En algunas realizaciones, la longitud del bucle se puede extender en de 2 a 25 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud del bucle se puede reducir en de 1 a 11 aminoácidos. En particular, el bucle FG de ¹⁰F_n3 es de 12 restos de longitud, mientras que el bucle correspondiente de las cadenas pesadas de anticuerpo varía de 4 a 28 restos. Por lo tanto, para optimizar la unión al antígeno, se puede modificar el bucle FG de ¹⁰F_n3 en cuanto a la longitud, así como en secuencia para cubrir el intervalo de CDR3 de 4 a 28 restos con el fin de obtener la mayor flexibilidad posible y la afinidad en la unión al antígeno. En algunas realizaciones, uno o más restos del motivo de unión a integrina "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD) (aminoácidos 78-80 de SEQ ID NO: 37) se pueden sustituir con el fin de romper la unión a la integrina. En una realización, la secuencia RGD se sustituye con una secuencia de aminoácidos polares-aminoácidos neutros-aminoácidos ácidos (en sentido N-terminal a C-terminal). En otra realización, la secuencia RGD se sustituye con SGE.

Las secuencias de unión a un no ligando de ¹⁰F_n3, es decir, el "armazón de ¹⁰F_n3", se pueden modificar siempre que el dominio ¹⁰F_n3 conserve la función de unión al ligando y/o la estabilidad estructural. En algunas realizaciones, uno o más de Asp 7, Glu 9 y Asp 23 están reemplazados por otro aminoácido, tal como, por ejemplo, un resto de aminoácido no cargado negativamente (por ejemplo, Asn, Lys, etc.). Se ha informado que estas mutaciones tienen el efecto de potenciar una mayor estabilidad del ¹⁰F_n3 mutante a pH neutro en comparación con la forma de tipo silvestre (Véase, la publicación PCT n.º WO 02/04523). Se han desvelado varias modificaciones adicionales en el armazón de ¹⁰F_n3 que bien son beneficiosas o neutras. Véase, por ejemplo, Batori *et al.*, *Protein Eng.* 2002 15(12):1015-20; Koide *et al.*, *Biochemistry* 2001 40(34):10326-33.

El armazón de ¹⁰F_n3 se puede modificar mediante una o más sustituciones conservadoras. Se puede modificar tanto como un 5 %, 10 %, 20 % o incluso 30 % o más de los aminoácidos del armazón de ¹⁰F_n3 mediante una sustitución conservadora sin alterar esencialmente la afinidad de ¹⁰F_n3 hacia un ligando. En ciertas realizaciones, el armazón puede comprender en cualquier lugar de entre 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 1-15, 1-10, 1-8, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-15, 2-10, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 5-15 o 5-10 sustituciones de aminoácidos conservadoras. En realizaciones ilustrativas, la modificación del armazón reduce preferentemente la afinidad de unión del aglutinante de ¹⁰F_n3 por un ligando en menos de 100 veces, 50 veces, 25 veces, 10 veces, 5 veces o 2 veces. Puede ser que dichos cambios alteren la inmunogenicidad del ¹⁰F_n3 *in vivo*, y cuando se reduzca la inmunogenicidad, se desearán dichos cambios. En el presente documento, las "sustituciones conservadoras" son restos que son física o funcionalmente similares a los correspondientes restos de referencia. Es decir, una sustitución conservadora y su resto de referencia tienen un tamaño, una forma, una carga eléctrica, propiedades químicas similares, incluyendo la capacidad para formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservadoras preferidas son las que satisfacen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff *et al.*, "Atlas of Protein Sequence and Structure" 5:345-352 (1978 y Supl.). Los ejemplos de sustituciones conservadoras son sustituciones dentro de los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina.

Cada uno de los dominios ¹⁰F_n3 de los dímeros de proteínas de la presente invención tiene una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y que carece de una secuencia DK. Dichas proteínas de armazón a base de fibronectina tienen mejor estabilidad que los armazones a base de fibronectina que contienen una o más secuencias DK.

En algunas realizaciones, cada uno de los dominios ¹⁰F_n3 de los dímeros de proteínas de la presente invención tiene al menos el 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 % o 90 % de identidad con el dominio ¹⁰F_n3 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1. En general, gran parte de la variabilidad ocurrirá en uno o más de los

bucles. Cada una de las cadenas beta o de tipo beta de un dominio ¹⁰F_n3 de una proteína de armazón a base de fibronectina puede comprender, consistir esencialmente en o consistir en una secuencia de aminoácidos que sea al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % idéntica a la secuencia de una cadena beta o de tipo beta correspondiente de SEQ ID NO: 1, siempre que dicha variación no perturbe la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas. En realizaciones ilustrativas, el dominio ¹⁰F_n3 se une a una diana deseada con una K_d inferior a 1 nM, 500 pM, 100 pM o inferior. En realizaciones ilustrativas, la proteína de armazón a base de fibronectina se une específicamente a una diana que no está unida por un dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, en particular, por un dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre.

Cada uno de los dominios ¹⁰F_n3 de los dímeros de proteínas de la presente invención comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle, EF; y un bucle, FG; y tiene al menos un bucle seleccionado entre el bucle BC, DE y FG con una secuencia de aminoácidos modificada con respecto a la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano. En algunas realizaciones, los bucles BC y FG están modificados. En algunas realizaciones, los bucles BC, DE y FG están modificados, es decir, el dominio ¹⁰F_n3 comprende bucles de origen no natural. Por "modificado" se entiende una o más alteraciones de la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia molde (es decir, el dominio de fibronectina humana correspondiente) e incluye adiciones, eliminaciones y sustituciones de aminoácidos. La modificación de una secuencia de aminoácidos puede llevarse a cabo mediante la variación de secuencias intencionada, ciega o espontánea, generalmente, de una secuencia codificante de ácido nucleico, y puede producirse mediante cualquier técnica, por ejemplo, PCR, PCR propensa a error o síntesis química de ADN.

En algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados entre BC, DE y FG se pueden ampliar o reducir de longitud con respecto al bucle de fibronectina humana correspondiente. En algunas realizaciones, la longitud del bucle se puede ampliar en 2-25 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud del bucle se puede reducir en 1-11 aminoácidos. En particular, el bucle FG de ¹⁰F_n3 es de 12 restos de longitud, mientras que el bucle correspondiente de las cadenas pesadas de anticuerpos varía de 4 a 28 restos. Para optimizar la unión al antígeno, por lo tanto, se puede modificar la longitud del bucle FG de un dominio ¹⁰F_n3, así como la secuencia para cubrir el intervalo de 4-28 restos de la CDR3, obteniéndose la mayor flexibilidad posible y la afinidad en la unión al antígeno.

En algunas realizaciones, cada uno de los dominios ¹⁰F_n3 de los dímeros de proteínas de la presente invención tiene una secuencia de aminoácidos al menos un 80, 85, 90, 95, 98 o 100 % idéntica a las regiones no de bucle de SEQ ID NO: 1, en la que al menos un bucle seleccionado entre BC, DE y FG está modificado. En algunas realizaciones, el bucle BC modificado tiene hasta 10 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 eliminaciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el bucle DE modificado tiene hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 eliminaciones de aminoácidos, hasta 13 inserciones de aminoácidos o una combinación de los mismos. En algunas realizaciones, el bucle FG tiene hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 eliminaciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos o una combinación de los mismos.

En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que se define, en general, siguiendo la secuencia:

EVVAATPTSLISW(X)_xRYRITYGETGGNSPVQEFVTP(X)_yTATISGLKPGVDYTITVYA
VT(X)_zPISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 38)

En SEQ ID NO: 38, el bucle BC está representado por X_x, el bucle DE está representado por X_y y el bucle FG está representado por X_z. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice de la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, x, y y z pueden ser cada uno de manera independiente cualquier lugar 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7 o 6-7 aminoácidos. En realizaciones preferidas, x es 7 aminoácidos y es 4 aminoácidos, y z es de 6, 10 o 15 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta (subrayadas) pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 o de 0 a 1 sustituciones, eliminaciones o adiciones en las 7 regiones del armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en SEQ ID NO: 38. En una realización ilustrativa, las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de entre 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 o de 0 a 1 sustituciones conservadoras en las 7 regiones de armazón con respecto a los aminoácidos correspondientes que se muestran en SEQ ID NO: 38. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos básicos son fijos y cualquier sustitución, sustitución conservadora, eliminación o adición se produce en restos distintos de los restos de aminoácidos básicos. La cola de EIEK (SEQ ID NO: 4) mostrada en negrita está fija. En ciertas realizaciones, los aminoácidos que flanquean inmediatamente las regiones de bucle (por ejemplo, los restos no subrayados) pueden estar sustituidos o eliminados cada uno de manera independiente. Cuando se sustituyen los restos que flanquean inmediatamente los bucles, cada uno de los restos puede estar sustituido con una secuencia que tenga el mismo número de aminoácidos o con una secuencia de aminoácidos mayor (por ejemplo, inserciones de 0-10, 0-8, 0-5, 0-3 o 0-2 restos de aminoácidos). Los restos no subrayados son parte de la región del bucle y, por lo tanto, son susceptibles de sustituirse sin afectar significativamente a la estructura del dominio ¹⁰F_n3.

- Los dominios ¹⁰F_n3 generalmente empiezan con el aminoácido número 1 de la SEQ ID NO: 37. Sin embargo, los dominios con eliminaciones de aminoácidos también están englobados por la invención. En algunas realizaciones, se eliminan los primeros ocho aminoácidos de SEQ ID NO: 37. También se pueden añadir secuencias adicionales a los extremos N- o C-terminal de un dominio ¹⁰F_n3 que tenga los aminoácidos correspondientes a 1-94 de SEQ ID NO: 37 o los aminoácidos 9-94 de SEQ ID NO: 37. Por ejemplo, se puede colocar una secuencia de MG adicional en el extremo N-terminal de un dominio ¹⁰F_n3. M normalmente se escindiría, dejando G en el extremo N-terminal. En algunas realizaciones, la extensión N-terminal consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: H, MG, G y cualquiera de SEQ ID NO: 19-21.
- El dominio ¹⁰F_n3 puede comprender opcionalmente una extensión N-terminal de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de extensiones N-terminales incluyen (representadas por el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVS_DVPRDL (SEQ ID NO: 19), VSDVPRDL (SEQ ID NO: 20) y GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 21), o los truncamientos N-terminales de una cualquiera de SEQ ID NO: 19, 20 o 21. Otras extensiones N-terminales adecuadas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 26), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 27), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 28), X_nPRDL (SEQ ID NO: 29), X_nRDL (SEQ ID NO: 30), X_nDL (SEQ ID NO: 31) o X_nL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia Met-Gly al extremo N-terminal de un dominio ¹⁰F_n3, el M normalmente se escinde, dejando una G en el extremo N-terminal.
- Cada uno de los dominios ¹⁰F_n3 de las proteínas de armazón a base de fibronectina proporcionadas en el presente documento tiene una secuencia de la cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. Las colas C-terminales ilustrativas incluyen polipéptidos que tienen una longitud de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5 o 1-4 aminoácidos. Los ejemplos específicos de las secuencias de cola incluyen, por ejemplo, polipéptidos que comprenden, consisten esencialmente en o consisten en EIEK (SEQ ID NO: 4), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32), EIEKP (SEQ ID NO: 33), EIEKPS (SEQ ID NO: 34) o EIEKPC (SEQ ID NO: 35). Dichas secuencias C-terminales se denominan en el presente documento colas o extensiones, y además, se describen en el presente documento. En realizaciones ilustrativas, la cola C-terminal comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6. Las secuencias C-terminales carecen de secuencias DK. En realizaciones ilustrativas, la cola C-terminal comprende un resto que facilita la modificación por PEG, es decir, un resto de lisina o cisteína. En realizaciones preferidas, la cola C-terminal carece de una secuencia DK y comprende un resto de cisteína.
- En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina comprenden un dominio ¹⁰F_n3 que tiene tanto una extensión N-terminal como una cola C-terminal. En algunas realizaciones, se puede colocar un marcador de His6 en el extremo N-terminal o C-terminal.
- En una realización ejemplar, la proteína de armazón a base de fibronectina comprende un dominio ¹⁰F_n3 que se une a VEGFR2. En ciertas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina se une a VEGFR2 con una K_D de menos de 100 nM y el bucle BC comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, el DE comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, el bucle FG comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y la proteína comprende una cola C-terminal que carece de una secuencia DK. En realizaciones ilustrativas, la cola C-terminal comprende EIEK (SEQ ID NO: 4), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32), EIEKP (SEQ ID NO: 33), EIEKPS (SEQ ID NO: 34) o EIEKPC (SEQ ID NO: 35). En realizaciones preferidas, la cola C-terminal comprende EIEK (SEQ ID NO: 4) o EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6).
- La proteína de armazón a base de fibronectina es un dímero de proteínas que comprende dos dominios ¹⁰F_n3. Por ejemplo, la proteína de armazón a base de fibronectina puede comprender dos dominios ¹⁰F_n3 que están asociados covalentemente. La proteína de armazón a base de fibronectina es una proteína biespecífica o dimérica que comprende dos dominios ¹⁰F_n3. La proteína de armazón a base de fibronectina comprende un primer dominio ¹⁰F_n3 que se une a una primera molécula diana y un segundo dominio ¹⁰F_n3 que se une a una segunda molécula diana. La primera y la segunda moléculas diana pueden ser las mismas o diferentes moléculas diana. Cuando la primera y la segunda molécula diana son las mismas, los dominios ¹⁰F_n3, es decir, los bucles de unión, pueden ser iguales o diferentes. Por lo tanto, el primer y el segundo dominios ¹⁰F_n3 pueden unirse a la misma diana, pero en diferentes epítomos.
- En realizaciones ilustrativas, cada dominio ¹⁰F_n3 de la proteína de armazón a base de fibronectina se une a una diana deseada con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor. En realizaciones ilustrativas, cada dominio ¹⁰F_n3 de la proteína de armazón a base de fibronectina se une específicamente a una diana que no está unida por un dominio ¹⁰F_n3 de tipo silvestre, en particular, un dominio ¹⁰F_n3 humano de tipo silvestre.
- Los dominios ¹⁰F_n3 de la proteína de armazón a base de fibronectina pueden estar conectados por un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen polipéptidos que tienen de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 aminoácidos. En el presente documento, se describen adicionalmente ejemplos específicos de enlazadores polipeptídicos adecuados. En ciertas realizaciones, el enlazador puede ser un polipéptido de cola C-terminal según lo descrito en el presente documento, un polipéptido de extensión N-terminal según lo descrito en el presente documento, un polipéptido enlazador según lo descrito a continuación o cualquier combinación de los

mismos.

En ciertas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina comprende dos dominios ¹⁰Fn3, en la que el dominio ¹⁰Fn3 N-terminal comprende una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y el dominio ¹⁰Fn3 C-terminal comprende una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de EIEK (SEQ ID NO: 4), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6), EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32), EIEKP (SEQ ID NO: 33), EIEKPS (SEQ ID NO: 34) o EIEKPC (SEQ ID NO: 35).

Mediante la variación de las secuencias de bucle del dominio ¹⁰Fn3, es posible generar una proteína de armazón a base de fibronectina que se une a cualquier diana deseada. En realizaciones ilustrativas, las proteínas de armazón a base de fibronectina proporcionadas en el presente documento que tienen mayor estabilidad se pueden unir a una diana terapéuticamente deseable tal como, por ejemplo, TNF α , VEGFR2, IGF-IR o EGFR. En ciertas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina no se une a uno o más de las siguientes dianas: EGFR, IGF-IR, HSA y PCSK9, o un fragmento de cualquiera de las anteriores. En ciertas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina que comprende un solo dominio ¹⁰Fn3 no se une a una o más de las siguientes dianas: EGFR, IGF-IR, HSA y PCSK9, o un fragmento de cualquiera de las anteriores. En ciertas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina que comprende dos dominios ¹⁰Fn3 no se une a una o más de las siguientes dianas: EGFR, IGF-IR, HSA y PCSK9, o un fragmento de cualquiera de las anteriores. En ciertas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina que comprende dos dominios ¹⁰Fn3 no se une a una o más de las siguientes combinaciones de moléculas diana: i) EGFR e IGF-IR; ii) EGFR y cualquier otra proteína diana; o iii) albúmina de suero humano y cualquier otra proteína diana. En ciertas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina que comprende dos dominios ¹⁰Fn3 no se une a cualquiera de las siguientes combinaciones de moléculas diana: i) EGFR e IGF-IR; ii) EGFR y cualquier otra proteína diana; o iii) albúmina de suero humano y cualquier otra proteína diana.

Dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina

Las proteínas de armazón a base de fibronectina descritas en el presente documento son dímeros que comprenden dos dominios ¹⁰Fn3. En una realización, la solicitud proporciona dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I que comprenden un primer y un segundo dominio ¹⁰Fn3 seleccionados del grupo que consiste en: (i) un dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4 y 6, en los que el dominio ¹⁰Fn3 se une a IGF-IR; y (ii) un dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4 y 6, en los que el dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2. En realizaciones ilustrativas, cada uno de los dominios ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 e IGF-IR se une a su diana con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor.

En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal un dominio de unión a IGF-IR y un dominio de unión a VEGFR2. En realizaciones ilustrativas, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina comprende: (i) un primer dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a IGF-IR; y (ii) un segundo dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2. En realizaciones ilustrativas, cada uno de los dominios ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 e IGF-IR se une a su diana con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor.

En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende desde el extremo N-terminal hasta el extremo C-terminal un dominio de unión a VEGFR2 y un dominio de unión a IGF-IR. En realizaciones ilustrativas, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina comprende: (i) un primer dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2; y (ii) un segundo dominio ¹⁰Fn3 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a IGF-IR; y en realizaciones ilustrativas, cada uno de los dominios ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 e IGF-IR se une a su diana con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor.

En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende un primer y un segundo dominio ¹⁰Fn3 seleccionado del grupo que consiste en: (i) un dominio ¹⁰Fn3 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 2, en el que el dominio ¹⁰Fn3 comprende, consiste esencialmente en o consiste en una cola C-terminal que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4 y 6, y en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a IGF-IR; e (ii) un dominio ¹⁰Fn3 que comprende, que consiste esencialmente en o que consiste en una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con SEQ ID NO: 3, en el que el dominio ¹⁰Fn3 comprende, consiste esencialmente en o consiste en una cola C-terminal que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 4 y 6, y en el que el dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2. En realizaciones ilustrativas, cada uno de los dominios ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 e IGF-IR se une a su diana con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor. En ciertas realizaciones, el primer y el segundo dominio ¹⁰Fn3 están conectados a través de un enlazador polipeptídico. En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende un dominio ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 N-terminal y un dominio ¹⁰Fn3 de unión a IGF-IR C-terminal. En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende un dominio ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 N-terminal y un dominio ¹⁰Fn3 de unión a VEGFR2 C-terminal. En ciertas realizaciones, el dominio ¹⁰Fn3 N-terminal comprende una cola C-terminal que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

En ciertas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 48-55. En otras realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 48. En algunas realizaciones, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene un 70, 75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de SEQ ID NO: 48-55.

En ciertas realizaciones, un dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina V/I comprende un polipéptido que tiene la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que N1 y N2 son extensiones N-terminales opcionales que comprenden, de manera independiente, de 0 a 10 aminoácidos, en la que D1 y D2 se seleccionan, de manera independiente, del grupo que consiste en: (i) un décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰Fn3) que tiene al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, en la que dicho dominio ¹⁰Fn3 se une a IGF-IR con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menor, y (ii) un dominio ¹⁰Fn3 que tiene al menos un 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, 99 % o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, en la que dicho dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2 con una K_D inferior a 100 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM; en la que L es un enlazador polipeptídico que comprende de 0 a 30 restos de aminoácidos; en la que C1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4; y en la que C2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en una cualquiera de las secuencias de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y 6. En ciertas realizaciones, D1 se une a VEGFR2 y D2 se une a IGF-IR. En otras realizaciones, D1 se une a IGF-IR y D2 se une a VEGFR2.

En ciertas realizaciones, la región D1 o D2 es un dominio ¹⁰Fn3 que se une a VEGFR2 que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45, en la que el dominio ¹⁰Fn3 se une a VEGFR2 con una K_D inferior a 100 nM. En ciertas realizaciones, la región D1 o D2 es un aglutinante de VEGFR2 representado por la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVVAATPTSLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFVPLQPPTATISGLKPGVD

YTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT (SEQ ID NO: 3).

En SEQ ID NO: 3, las secuencias de los bucles BC, DE y FG tienen una secuencia fija, como se muestra en negrita (por ejemplo, un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45) y la secuencia restante que está subrayada (por ejemplo, la secuencia de las 7 cadenas beta y los bucles AB, CD y EF) tiene cualquiera de entre de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2 o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones o adiciones relativas a los aminoácidos correspondientes que se muestran en SEQ ID NO: 3. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos básicos son fijos y cualquier sustitución, sustitución conservadora, eliminación o adición se produce en restos distintos de los restos de aminoácidos básicos.

El dominio ¹⁰Fn3 que se une a VEGFR2 puede estar opcionalmente ligado a una extensión N-terminal (N1 o N2) de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácido de longitud. Los ejemplos de extensiones N-terminales incluyen (los representados por el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 19), VSDVPRDL (SEQ ID NO: 20) y GVSVDVPRDL (SEQ ID NO: 21) o truncamientos N-terminales de una cualquiera de SEQ ID NO: 19, 20 o 21. Otras extensiones N-terminales adecuadas incluyen, por ejemplo, X_nSDVPRDL (SEQ ID NO: 26), X_nDVPRDL (SEQ ID NO: 27), X_nVPRDL (SEQ ID NO: 28), X_nPRDL (SEQ ID NO: 29), X_nRDL (SEQ ID NO: 30), X_nDL (SEQ ID NO: 31) o X_nL, en el que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en las que cuando n = 1, X es Met o Gly, y

cuando $n = 2$, X es Met-Gly. En realizaciones preferidas, N1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En realizaciones preferidas, N2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

5 El dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a VEGFR2 puede comprender opcionalmente una cola C-terminal (C1 o C2). Las colas C-terminales de los dímeros de proteínas armazón a base de fibronectina de la invención reivindicada no contienen una secuencia DK. Las colas C-terminales ilustrativas incluyen polipéptidos que son de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácidos de longitud. Los ejemplos específicos de colas C-terminales incluyen EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6) y EIEK (SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, las colas C-terminales adecuadas pueden ser un fragmento truncado C-terminalmente de SEQ ID N^o: 6 o 32, incluyendo, por ejemplo, una de las siguientes secuencias de aminoácidos (representada por el código de aminoácidos de una sola letra): EIEKP (SEQ ID NO: 33), EIEKPS (SEQ ID NO: 34) o EIEKPC (SEQ ID NO: 35). En ciertas realizaciones, C1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones, C2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 6. En realizaciones preferidas, C1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4, y C2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

20 En ciertas realizaciones, el dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a VEGFR2 comprende tanto una extensión N-terminal como una cola C-terminal. En realizaciones ilustrativas, N1 comienza con Gly o Met-Gly, C1 no contiene un resto de cisteína, N2 no se inicia con una Met y C2 comprende un resto de cisteína. Los ejemplos específicos de dominios $^{10}\text{Fn3}$ que se unen a VEGFR2 son polipéptidos que comprenden: (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3, o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 3.

25 En ciertas realizaciones, la región D1 o D2 es un dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a IGF-IR que comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42, en el que el dominio $^{10}\text{Fn3}$ se une a IGF-IR con una K_D inferior a 100 nM.

30 En ciertas realizaciones, la región D1 o D2 es un aglutinante de IGF-IR representado por la siguiente secuencia de aminoácidos:

EVVAATPTSL LISWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFV PKNVYTATISGLKPGVD
YTITVYAVTRFRDYQPISINYRT (SEQ ID NO: 2).

35 En SEQ ID NO: 2, la secuencia de los bucles BC, DE y FG tienen una secuencia fija, como se muestra en negrita (por ejemplo, un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42) y la secuencia restante que está subrayada (por ejemplo, la secuencia de las 7 cadenas beta y los bucles AB, CD y EF) tiene cualquiera de entre de 0 a 20, de 0 a 15, de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, sustituciones conservadoras, eliminaciones o adiciones relativas a los aminoácidos correspondientes que se muestran en SEQ ID NO: 2. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos básicos son fijos y cualquier sustitución, sustitución conservadora, eliminación o adición se produce en restos distintos de los restos de aminoácidos básicos.

45 El dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a IGF-IR puede estar opcionalmente enlazado a una extensión N-terminal (N1 o N2) de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de extensiones N-terminales incluyen (representados por el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVSVDPRDL (SEQ ID NO: 19), VSDVPRDL (SEQ ID NO: 20) y GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 21), o truncamientos N-terminales de una cualquiera de SEQ ID NO: 19, 20 o 21. Otras extensiones N-terminales adecuadas incluyen, por ejemplo, $X_n\text{SDVPRDL}$ (SEQ ID NO: 26), $X_n\text{DVPRDL}$ (SEQ ID NO: 27), $X_n\text{VPRDL}$ (SEQ ID NO: 28), $X_n\text{PRDL}$ (SEQ ID NO: 29), $X_n\text{RDL}$ (SEQ ID NO: 30), $X_n\text{DL}$ (SEQ ID NO: 31) o $X_n\text{L}$, en las que $n = 0, 1$ o 2 aminoácidos, en la que cuando $n = 1$, X es Met o Gly, y cuando $n = 2$, X es Met-Gly. En realizaciones preferidas, N1, comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 19. En realizaciones preferidas, N2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 20.

55 El dominio $^{10}\text{Fn3}$ que se une a IGF-IR puede comprender opcionalmente una cola C-terminal (C1 o C2). Las colas C-terminales de los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina de la invención reivindicada no contienen una secuencia DK. Las colas C-terminales ilustrativas incluyen polipéptidos que son de entre 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2 o 1 aminoácidos de longitud. Los ejemplos específicos de colas C-terminales incluyen EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32), EIEKPCQ (SEQ ID NO: 6) y EIEK (SEQ ID NO: 4). En otras realizaciones, las colas C-terminales adecuadas pueden ser un fragmento truncado C-terminalmente de SEQ ID NO: 6 o 32, incluyendo, por ejemplo, una de las siguientes secuencias de aminoácidos (representada por el código de aminoácidos de una sola letra): EIEKP (SEQ ID NO: 33), EIEKPS (SEQ ID NO: 34) o EIEKPC (SEQ ID NO: 35). En ciertas realizaciones, C1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4. En ciertas realizaciones,

C2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 o 6. En realizaciones preferidas, C1 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y C2 comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6.

5 En ciertas realizaciones, el dominio ¹⁰F_n3 que se une a IGF-IR comprende tanto una extensión N-terminal como una cola C-terminal. En realizaciones ilustrativas, N1 comienza con Gly o Met-Gly, C1 no contiene un resto de cisteína, N2 no comienza con una Met y C2 comprende un resto de cisteína. Los ejemplos específicos de dominios ¹⁰F_n3 que se unen a IGF-IR son polipéptidos que comprenden: (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2, o
10 (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2.

15 La región L es un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen polipéptidos que tienen entre 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3 o 1-2 aminoácidos. Los ejemplos específicos de enlazadores polipeptídicos adecuados se describen más detalladamente en el presente documento. En ciertas realizaciones, el enlazador puede ser polipéptido de cola C-terminal como se describe en el presente documento, un polipéptido de extensión N-terminal como se describe en el presente documento o una combinación de los mismos.

20 En ciertas realizaciones, uno o más de N1, N2, L, C1 o C2 pueden comprender un resto de aminoácido adecuado para la PEGilación, tal como un resto de cisteína o de lisina. En realizaciones ilustrativas, C2 comprende al menos un aminoácido adecuado para la PEGilación, tal como un resto de cisteína o de lisina. Los ejemplos específicos de enlazadores polipeptídicos adecuados se describen más detalladamente en el presente documento. Los ejemplos específicos de dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen la estructura N1-D1-C1-L-N2-D2-C2 son polipéptidos que comprenden: (i) la secuencia de aminoácidos expuesta en una cualquiera de las SEQ ID
25 NO: 48-55, o (ii) una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % de identidad con una cualquiera de las SEQ ID NO: 48-55.

En ciertas realizaciones, los dímeros de proteínas de armazón a base de fibronectina tendrán la estructura N1-D1-L-N2-D2, en la que cada D1 y D2 comprenden una secuencia de aminoácidos que tiene la siguiente secuencia:

EVVAATPTSL₁ISW(X)_xRYRITYGETGGNSPVQEF₁V_P(X)_yTATISGLKPGVDYITVYA

VT(X)_zPISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 38)

30 En SEQ ID NO: 38, el bucle BC está representado por X_x, el bucle DE está representado por X_y y el bucle FG está representado por X_z. Las secuencias de las cadenas beta (subrayadas) pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, eliminaciones o adiciones por las 7 regiones del armazón relativas a los aminoácidos correspondientes mostrados en SEQ ID NO: 38. En una realización
35 ilustrativa, las secuencias de las cadenas beta pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 35 2, o de 0 a 1 sustituciones conservadoras por las 7 regiones del armazón relativas a los aminoácidos correspondientes mostrados en SEQ ID NO: 38. En ciertas realizaciones, los restos de aminoácidos básicos son fijos y cualquier sustitución, sustitución conservadora, eliminación o adición se produce en restos distintos de los restos de aminoácidos básicos. La cola de EIEK (SEQ ID NO: 4) mostrada en negrita es fija. En
40 ciertas realizaciones, los aminoácidos que flanquean inmediatamente las regiones de bucle (por ejemplo, los restos no subrayados) se pueden sustituir o eliminar cada uno de manera independiente. Cuando se sustituyen los restos que flanquean inmediatamente las regiones de bucle, cada resto se puede sustituir con una secuencia que tenga el mismo número de aminoácidos o con una secuencia de aminoácidos más larga (por ejemplo, inserciones de 0-10, 0-8, 0-5, 0-3, o 0-2 restos de aminoácidos). Los restos no subrayados forman parte de la región bucle y, por lo tanto,
45 son susceptibles a la sustitución sin afectar significativamente a la estructura del dominio ¹⁰F_n3.

En el presente documento, se describe además es un dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina que tiene la estructura N1-D1-L-N2-D2, en la que D1 y D2 se seleccionan del grupo que consiste en: (i) un dominio ¹⁰F_n3 que comprende SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de
50 aminoácidos de SEQ ID NO: 40, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y X_z comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42; y (ii) un dominio ¹⁰F_n3 que comprende SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y X_z comprende, consiste
55 esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

Por ejemplo, el dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina tiene la estructura N1-D1-L-N2-D2, en la que D1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste
60 en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y X_z comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42 y en la que D2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y

X_z comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45.

5 En otro ejemplo, el dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina tiene la estructura N1-D1-L-N2-D2, en la que D1 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 43, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 44 y X_z comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 45; y en la que D2 comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 38, en la que X_x comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, X_y comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41 y X_z comprende, consiste esencialmente en o consiste en la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.

15 El dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que tiene la estructura N1-D1-L-N2-D2 puede comprender además una cola C-terminal. Por ejemplo, la cola C-terminal comprende un resto adecuado para la adición de una fracción de PEG, por ejemplo, un resto de lisina o de cisteína. Preferentemente, la cola C-terminal comprende la secuencia PCQ.

20 El dominio L de un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que tiene la estructura N1-D1-L-N2-D2 puede ser un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen polipéptidos que tienen entre 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 15 o 1-2 aminoácidos. Los ejemplos específicos de enlazadores polipeptídicos adecuados se describen más detalladamente en el presente documento. Además, N1 y N2 son extensiones N-terminales como se describe anteriormente en el presente documento.

25 En realizaciones preferidas, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una mayor estabilidad bien *in vitro*, *in vivo* o ambos. En ciertas realizaciones, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una menor fragmentación y/o una menor agregación durante su conservación en solución. En ciertas realizaciones, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una mayor semivida en suero.

30 En realizaciones ilustrativas, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una fragmentación inferior en comparación con un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que comprende una secuencia DK. En particular, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una mayor estabilidad en comparación con un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que tienen una o más secuencias DK en uno cualquiera de entre: una cola C-terminal, una extensión N-terminal o un enlazador entre dos dominios ¹⁰Fn3. Por ejemplo, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina, en general, son más estables que los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina que tienen una secuencia DK en una o ambas regiones de la cola C-terminal, por ejemplo, que comprenden una cola que tiene SEQ ID NO: 46 detrás de la primera y/o segunda subunidad ¹⁰Fn3. En realizaciones ilustrativas, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento tienen una menor fragmentación en comparación con un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que tiene la fórmula N1-D1-C1-L-N2-D2-C2, en la que C1 y/o C2 comprenden SEQ ID NO: 46. La fragmentación se puede evaluar, por ejemplo, usando el análisis RP-HPLC, según lo descrito en el Ejemplo 3.

45 En realizaciones ilustrativas, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento presentan una fragmentación inferior al 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3,5 %, 3 %, 2 % o menor tras la conservación en solución durante cuatro semanas a pH 4,0. En ciertas realizaciones, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento presentan un nivel de fragmentación que se reduce en al menos un 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % o más en comparación con una versión equivalente del dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que contiene una o más secuencias DK.

50 En realizaciones ilustrativas, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento presentan una semivida en suero que se aumenta en al menos 10 %, 20 %, 25 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o más en comparación con la semivida en suero de una versión equivalente del dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que contiene una o más secuencias DK. En otras realizaciones, los dímeros de proteínas de almacén a base de fibronectina descritos en el presente documento presentan una semivida en suero que se aumenta en al menos 2 veces, 3 veces, 5 veces, 10 veces o más en comparación con la semivida en suero de una versión equivalente del dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina que contiene una o más secuencias DK.

60 En ciertas realizaciones, la solicitud proporciona un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina E/I, que comprende un dominio ¹⁰Fn3 que se une a EGFR y un dominio ¹⁰Fn3 que se une a IGF-IR. En ciertas realizaciones, un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina E/I comprende la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-25. En otras realizaciones, un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina E/I comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 25. En algunas realizaciones, un dímero de proteínas de almacén a base de fibronectina E/I comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos 70,

75, 80, 85, 90, 95, 97, 98, 99 o 100 % de identidad con la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NO: 22-25.

Enlazadores polipeptídicos

5 La solicitud proporciona dímeros de armazón a base de fibronectina que comprenden dos dominios ¹⁰F_n3 unidos a través de un enlazador polipeptídico (L). Los polipéptidos comprenden un dominio N-terminal que comprende un primer dominio ¹⁰F_n3, y un dominio C-terminal que comprende un segundo dominio ¹⁰F_n3. El primer y el segundo dominio ¹⁰F_n3 pueden estar enlazados directa o indirectamente por un enlazador polipeptídico (L). Se pueden introducir enlazadores o espaciadores adicionales, por ejemplo, SEQ ID NO: 4, 6 o 32, en el extremo C-terminal de del primer dominio ¹⁰F_n3 entre el dominio ¹⁰F_n3 y el enlazador polipeptídico. Se pueden introducir enlazadores o espaciadores adicionales en el extremo N-terminal del segundo dominio ¹⁰F_n3 entre el dominio ¹⁰F_n3 y el enlazador polipeptídico.

15 Los enlazadores adecuados para unir los dominios ¹⁰F_n3 son aquellos que permiten que los dominios separados se plieguen de manera independiente entre sí formando una estructura tridimensional que permita la unión de alta afinidad a una molécula diana. Los enlazadores adecuados que cumplen estos requisitos comprenden enlazadores a base de glicina-serina, enlazadores a base de glicina-prolina, enlazadores a base de prolina-alanina, así como el enlazador de SEQ ID NO: 7. Los ejemplos descritos en el documento WO 2009/142773 demuestran que los dominios F_n3 unidos a través de estos enlazadores conservan su función de unión a la diana. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador a base de glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina, y pueden ser de entre 8 y 50, 10 y 30, y 10 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen SEQ ID NO: 8-12. En algunas realizaciones, el enlazador polipeptídico se selecciona entre SEQ ID NO: 8 y 9. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador a base de glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina, y pueden ser de entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen SEQ ID NO: 13, 14 y 15. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador a base de prolina-alanina. Estos enlazadores comprenden restos de prolina y alanina, y pueden ser de entre 3 y 30, 10 y 30, 3 y 20, y 6 y 18 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen SEQ ID NO: 16, 17 y 18. Se contempla que es posible determinar la longitud óptima del enlazador y la composición de los aminoácidos mediante la experimentación habitual por métodos bien conocidos en la materia. En algunas realizaciones, el enlazador polipeptídico es SEQ ID NO: 7. En ejemplos ilustrativos, el enlazador no contiene ninguna secuencia DK.

Restos farmacocinéticos

35 En un aspecto, la aplicación proporciona proteínas de armazón a base de fibronectina que comprenden además un resto farmacocinético (PK). La farmacocinética engloba propiedades de un compuesto que incluyen, a modo de ejemplo, la absorción, distribución, metabolismo y eliminación por un sujeto. La mejora de la farmacocinética se puede evaluar de acuerdo con la necesidad terapéutica percibida. A menudo es deseable aumentar la biodisponibilidad y/o aumentar el tiempo entre las dosis, posiblemente aumentando el tiempo que una proteína permanece disponible en el suero tras la dosificación. En algunos casos, es deseable mejorar la continuidad de la concentración sérica de la proteína a lo largo del tiempo (por ejemplo, reducir la diferencia en la concentración en suero de la proteína poco después de la administración y poco antes de la siguiente administración). Las proteínas de armazón a base de fibronectina se pueden unir a un resto que reduce la velocidad de aclaramiento del polipéptido en un mamífero (por ejemplo, ratón, rata o ser humano) en más de tres veces en comparación con el polipéptido no modificado. Otras medidas de mejora de la farmacocinética pueden incluir la semivida en suero, que a menudo se divide en una fase alfa y una fase beta. Una o ambas fases pueden mejorarse significativamente mediante la adición de un resto apropiado. Un resto PK se refiere a cualquier proteína, péptido o resto que afecta a las propiedades farmacocinéticas de una molécula biológicamente activa cuando se fusiona a la molécula biológicamente activa.

50 Los restos PK que tienden a ralentizar el aclaramiento de una proteína de la sangre incluyen restos polioxilquileno, por ejemplo, polietilenglicol, azúcares (por ejemplo, ácido siálico) y restos de proteína bien tolerados (por ejemplo, Fc, fragmentos Fc, transferrina o albúmina sérica). Las proteínas de armazón a base de fibronectina se pueden fusionar a la albúmina o a un fragmento (parte) o variante de la albúmina como se describe en la publicación de EE.UU. n.º 20070048282. En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a la albúmina sérica tal como las descritas en las publicaciones de EE.UU. n.º 2007/0178082 y 2007/0269422. En algunas realizaciones, el resto PK es una proteína de unión a la inmunoglobulina sérica tal como las descritas en la publicación de EE.UU. n.º 2007/0178082.

60 En algunas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina se pueden unir a un resto PK que comprende un polímero no proteico. En algunas realizaciones, el polímero es polietilenglicol ("PEG"), polipropilenglicol o polioxilquilenos, tal como se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.640.835; 4.496.689; 4.301.144; 4.670.417; 4.791.192 o 4.179.337. En realizaciones ilustrativas, el polímero es un resto de PEG.

65 El PEG es un polímero hidrosoluble muy conocido que se encuentra disponible en el mercado o se puede preparar

mediante la polimerización de apertura de anillo de etilenglicol de acuerdo con métodos bien conocidos en la técnica (Sandler y Karo, "Polymer Synthesis", Academic Press, Nueva York, Vol. 3, páginas 138-161). El término "PEG" se usa ampliamente para abarcar cualquier molécula de polietilenglicol, sin tener en cuenta al tamaño o la modificación en un extremo del PEG, y puede representarse por la fórmula: X-O(CH₂CH₂O)_{n-1}CH₂CH₂OH (1), donde n es de 20 a 2.300 y X es H o una modificación terminal, por ejemplo, un alquilo C₁₋₄. En una realización, el PEG de la invención termina en un extremo con hidroxilo o metoxi, es decir, X es H o CH₃ ("metoxi PEG"). Un PEG puede contener otros grupos químicos que sean necesarios para las reacciones de unión; procedentes de la síntesis química de la molécula; o que sea un espaciador para la distancia óptima de partes de la molécula. Además, dicho PEG puede consistir en una o más cadenas laterales de PEG que estén unidas entre sí. Los PEG con más de una cadena de PEG se denominan PEG con múltiples brazos o ramificadas. Los PEG ramificados se pueden preparar, por ejemplo, mediante la adición de óxido de polietileno a varios poliols, incluyendo glicerol, pentaeritriol y sorbitol. Por ejemplo, un PEG ramificado de cuatro brazos se puede preparar a partir de pentaeritriol y óxido de etileno. Los PEG ramificados se describen en, por ejemplo, la solicitud publicada europea n.º 473084A y la patente de EE.UU. n.º 5.932.462. Una forma de PEG incluye dos cadenas laterales de PEG (PEG2) enlazadas a través de los grupos amino primarios de una lisina (Monfardini, C., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69).

La conjugación de PEG con péptidos o proteínas implica, en general, la activación del PEG y el acoplamiento de los productos intermedios de PEG activados directamente a proteínas/péptidos diana o a un enlazador, que posteriormente se activa y se acopla a proteínas/péptidos diana (véase Abuchowski, A. *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 252, 3571 (1977) y *J. Biol. Chem.*, 252, 3582 (1977), Zalipsky, *et al.*, y Harris *et al.*, en: "Poly(ethylene glycol) Chemistry: Biotechnical and Biomedical Applications"; (J. M. Harris ed.) Plenum Press: Nueva York, 1992; Capítulo. 21 y 22). Cabe señalar que una proteína de armazón a base de fibronectina que contiene una molécula de PEG también se conoce como una proteína conjugada, mientras que la proteína que carece de una molécula de PEG unida puede denominarse como no conjugada.

El tamaño del PEG utilizado dependerá de varios factores que incluyen el uso previsto de la proteína de armazón a base de fibronectina. Los PEG más grandes se prefieren para aumentar la semivida en el organismo, la sangre, fluidos o tejidos extracelulares no sanguíneos. Para la actividad celular *in vivo*, se prefieren los PEG del intervalo de aproximadamente 10 a 60 kDa, así como los PEG inferiores a aproximadamente 100 kDa y, más preferentemente, los inferiores a aproximadamente 60 kDa, aunque también se pueden usar tamaños superiores a aproximadamente 100 kDa. Para las aplicaciones de formación de imágenes *in vivo*, se pueden usar PEG más pequeños, generalmente, inferiores a aproximadamente 20 kDa, que no aumenten la semivida tanto como los PEG más grandes con el fin de permitir la distribución más rápida y una semivida inferior. Se pueden seleccionar varias formas de masa molecular de PEG, por ejemplo, de aproximadamente 1.000 Daltons (Da) a 100.000 Da (n es de 20 a 2.300), para la conjugación a las proteínas de armazón a base de fibronectina. El número de unidades de repetición "n" en el PEG se aproxima a la masa molecular descrita en Daltons. Se prefiere que la masa molecular combinada de PEG en un enlazador activado sea adecuada para un uso farmacéutico. Por lo tanto, en una realización, la masa molecular de las moléculas de PEG no supera los 100.000 Da. Por ejemplo, si tres moléculas de PEG están unidas a un enlazador, donde cada molécula de PEG tiene la misma masa molecular de 12.000 Da (cada n es de aproximadamente 270), entonces, la masa molecular total de PEG en el enlazador es de aproximadamente 36.000 Da (n total es de aproximadamente 820). Las masas moleculares del PEG unido al enlazador también pueden ser diferentes, por ejemplo, de tres moléculas en un enlazador, dos moléculas de PEG pueden ser de 5.000 Da cada una (cada n es aproximadamente 110) y una molécula de PEG puede ser de 12.000 Da (n es aproximadamente 270). En algunas realizaciones, un resto de PEG está conjugado a la proteína de armazón a base de fibronectina. En algunas realizaciones, el resto de PEG es de aproximadamente 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 o 90 kDa. En algunas realizaciones, el resto de PEG es de aproximadamente 40 kDa.

En algunas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina PEGiladas contienen uno, dos o más restos de PEG. En una realización, el/los resto/s de PEG está/n unido/s a un resto de aminoácido que está en la superficie de la proteína y/o lejos de la superficie que está en contacto con el ligando diana. En una realización, la masa molecular combinada o total de PEG en una proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada es de aproximadamente 3.000 Da a 60.000 Da, o de aproximadamente 10.000 Da a 36.000 Da. En una realización, el PEG de una proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada es un PEG de cadena lineal esencialmente lineal.

Un experto en la materia puede seleccionar una masa molecular adecuada para PEG, por ejemplo, basándose en cómo se usará terapéuticamente la proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada, la dosis deseada, el tiempo en circulación, la resistencia a la proteólisis, la inmunogenicidad y otras consideraciones. Para una descripción del PEG y de su uso para mejorar las propiedades de las proteínas, véase N.V. Katre, "Advanced Drug Delivery Reviews" 10: 91-114 (1993).

En algunas realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina está covalentemente unida al grupo poli(etilenglicol) de fórmula: -CO-(CH₂)_x-(OCH₂CH₂)_m-OR, con el -CO (es decir, carbonilo) del grupo poli(etilenglicol) formando un enlace de amida con uno de los grupos amino del polipéptido de unión; siendo R alquilo inferior; siendo x 2 o 3; siendo m de aproximadamente 450 a aproximadamente 950; y seleccionándose n y m de manera que el peso molecular del conjugado menos el polipéptido de unión sea de aproximadamente 10 a 40 kDa. En una realización, el grupo ε-amino de una proteína de armazón a base de fibronectina de una lisina es el grupo amino

disponible (libre).

En una realización específica, se usan ésteres de carbonato de PEG para formar los conjugados de proteínas de armazón a base de fibronectina con PEG. Se puede usar N,N'-disuccinimidilcarbonato (DSC) en la reacción con PEG para formar carbonato mixto de PEG-succinimidilo activo que se pueda hacer reaccionar posteriormente con un grupo nucleófilo de un enlazador o un grupo amino de una proteínas de armazón a base de fibronectina (véase la patente de EE.UU. n.º 5.281.698 y la patente de EE.UU. n.º 5.932.462). En un tipo similar de reacción, se pueden hacer reaccionar 1,1'-(dibenzotriazolil)carbonato y di-(2-piridil)carbonato con PEG para formar PEG-benzotriazolilo y carbonato mixto de PEG-piridilo (patente de EE.UU. n.º 5.382.657), respectivamente.

La PEGilación de una proteína de armazón a base de fibronectina se puede realizar de acuerdo con los métodos del estado de la técnica, por ejemplo, mediante la reacción de una proteína de armazón a base de fibronectina con PEG electrofílicamente activos (proveedor: Shearwater Corp., EE.UU., World Wide Web en shearwatercorp.com). Los reactivos de PEG preferidos de la presente invención son, por ejemplo, propionatos de N-hidroxisuccinimidilo (PEG-SPA), butanoatos (PEG-SBA), propionato de PEG-succinimidilo o N-hidroxisuccinimididas ramificadas tales como mPEG2-NHS (Monfardini, C., *et al.*, *Bioconjugate Chem.* 6 (1995) 62-69). Dichos métodos se pueden usar para realizar la PEGilación en un grupo ϵ -amino de una lisina de una proteína de armazón a base de fibronectina o en el grupo amino N-terminal de la proteína de armazón a base de fibronectina.

En otra realización, las moléculas de PEG pueden acoplarse a grupos sulfhidrilo en una proteína de armazón a base de fibronectina (Sartore, L., *et al.*, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, 27, 45 (1991); Morigo *et al.*, *Biocon. Chem.*, 7, 363-368 (1996); Goodson *et al.*, *Bio/Technology* (1990) 8, 343; patente de EE.UU. n.º 5.766.897). Las patentes de EE.UU. n.º 6.610.281 y 5.766.897 describen especies de PEG reactivas ilustrativas que se pueden acoplar a grupos sulfhidrilo.

En algunas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina PEGiladas se producen por PEGilación dirigida al sitio, particularmente por conjugación de PEG con un resto de cisteína. En ciertas realizaciones, el resto de Cys se puede situar en el extremo N-terminal, entre el extremo N-terminal y la cadena beta o de tipo beta más N-terminal, en el extremo C-terminal, o entre el extremo C-terminal y la cadena beta o de tipo beta más C-terminal de la proteína de armazón a base de fibronectina. En ciertas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina es un dímero, y el resto de Cys se puede situar en el extremo N-terminal, entre el extremo N-terminal y la cadena beta o de tipo beta más N-terminal, en el extremo C-terminal, o entre el extremo C-terminal y la cadena beta o de tipo beta más C-terminal de cualquiera de los dominios de unión del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina. En ciertas realizaciones, el resto de Cys se puede situar en el extremo N-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina, entre el extremo N-terminal y la cadena beta o de tipo beta más N-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina (es decir, del dominio de unión N-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina) o en el extremo C-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina, o entre el extremo C-terminal y la cadena beta o de tipo beta más C-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina (es decir, del dominio de unión C-terminal del dímero de proteínas de armazón a base de fibronectina). Un resto de Cys también se puede situar en otras posiciones, particularmente, cualquiera de los bucles que no participan en la unión a la diana o entre dos dominios de unión de una proteína de armazón a base de fibronectina multivalente. Un resto de PEG también se puede unir mediante otra química, incluyendo por conjugación a aminas.

En algunas realizaciones en las que se conjugan moléculas de PEG con restos de cisteína en una proteínas de armazón a base de fibronectina, los restos de cisteína son nativos de las proteínas de armazón a base de fibronectina, mientras que, en otras realizaciones, uno o más restos de cisteína se modifican por ingeniería genética en las proteínas de armazón a base de fibronectina. Es posible introducir mutaciones en una secuencia de codificación de proteínas de armazón a base de fibronectina para generar restos de cisteína. Esto se podría realizar, por ejemplo, mediante la mutación de uno o más restos de aminoácidos a cisteína. Los aminoácidos preferidos para la mutación a un resto de cisteína incluyen serina, treonina, alanina y otros restos hidrófilos. Preferentemente, el resto que se mutará a cisteína es un resto expuesto en la superficie. En la técnica, se conocen algoritmos para la predicción de la accesibilidad a la superficie de los restos basándose en la secuencia primaria o en una proteína. Como alternativa, los restos superficiales se pueden predecir comparando las secuencias de aminoácidos de proteínas de armazón a base de fibronectina, dado que se ha resuelto la estructura cristalina del marco del décimo dominio Fn3 basada en qué proteínas de armazón a base de fibronectina se hayan diseñado (véase Dickinson, *et al.*, *J. Mol. Biol.* 236(4): 1079-92 20 (1994)) y, por lo tanto, se identifican los restos expuestos en la superficie. En una realización, se introducen restos de cisteína en proteínas de armazón a base de fibronectina en o cerca de los extremos N- y/o C-terminal, o dentro de las regiones bucle. La PEGilación de restos de cisteína se puede llevar a cabo usando, por ejemplo, PEG-maleimida, PEG-vinilsulfona, PEG-yodoacetamida o disulfuro de PEG-ortopiridilo.

En algunas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada comprende una molécula de PEG unida covalentemente al grupo amino alfa del aminoácido N-terminal. La aminación reductora N-terminal específica del sitio se describe en Pepinsky *et al.*, (2001) JPET, 297,1059, y en la patente de EE.UU. n.º 5.824.784. El uso de un PEG-aldehído para la aminación reductora de una proteína que utiliza otros grupos amino nucleófilos disponibles se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.002.531, en Wieder *et al.*, (1979) *J. Biol. Chem.* 254,12579, y en Chamow

et al., (1994) *Bioconjugate Chem.* 5, 133.

En otra realización, las proteínas de armazón a base de fibronectina PEGiladas comprenden una o más moléculas de PEG unidas covalentemente a un enlazador, que, a su vez, está unido al grupo amino alfa del resto de aminoácido en el extremo N-terminal de la proteína de armazón a base de fibronectina. Dicha metodología se desvela en la publicación de EE.UU. n.º 2002/0044921 y la publicación PCT n.º WO94/01451.

En una realización, se PEGila una proteína de armazón a base de fibronectina en el extremo C-terminal. En una realización específica, se PEGila una proteína en el extremo C-terminal mediante la introducción de azido-metionina C-terminal y la posterior conjugación de un compuesto de metil-PEG-triarilfosfina a través de la reacción de Staudinger. Este método de conjugación C-terminal se describe en Cazalis *et al.*, "C-Terminal Site-Specific PEGylation of a Truncated Thrombomodulin Mutant with Retention of Full Bioactivity", *Bioconjug Chem.* 2004; 15(5):1005-1009.

En realizaciones ilustrativas, se PEGila una proteínas de armazón a base de fibronectina en una región de la cola C-terminal como se describe más detalladamente en el presente documento. Las colas C-terminales a modo de ejemplo incluyen, por ejemplo, un polipéptido que tiene una cualquiera de SEQ ID NO: 6 o 35.

Se pueden usar técnicas de separación y purificación convencionales conocidas en la materia para purificar proteínas de armazón a base de fibronectina PEGiladas, tales como la cromatografía de exclusión de tamaño (por ejemplo, filtración en gel) y la cromatografía de intercambio de iones. Los productos también se pueden separar usando SDS-PAGE. Los productos que se pueden separar incluyen proteínas de armazón a base de fibronectina mono-, di-, tri-, poli- y des-PEGiladas, así como PEG libre. El porcentaje de conjugados mono-PEG se puede controlar mediante la agrupación de fracciones más amplias en torno al pico de elución para aumentar el porcentaje de mono-PEG en la composición. Aproximadamente el noventa por ciento de los conjugados mono-PEG representa un buen equilibrio de rendimiento y actividad. Se pueden desear composiciones en las que, por ejemplo, al menos el noventa y dos por ciento o al menos el noventa y seis por ciento de los conjugados sea especies mono-PEG. En una realización de la presente invención, el porcentaje de conjugados mono-PEG es del noventa por ciento al noventa y seis por ciento.

En una realización de la invención, el PEG de una proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada no se hidroliza del resto aminoácido PEGilado usando un ensayo de hidroxilamina, por ejemplo, hidroxilamina 450 mM (pH 6,5) durante 8 a 16 horas a temperatura ambiente, siendo, por tanto, estable. En una realización, más del 80 % de la composición es proteína de armazón a base de fibronectina mono-PEG estable, más preferentemente al menos el 90 % y lo más preferentemente al menos el 95 %.

En otra realización, las proteínas de armazón a base de fibronectina PEGiladas conservarán preferentemente al menos aproximadamente el 25 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 % de la actividad biológica asociada a la proteína no modificada. En una realización, la actividad biológica se refiere a su capacidad para unirse a una o más moléculas diana, evaluada mediante la K_D , K_{on} o K_{off} . En una realización específica, la proteína de armazón a base de fibronectina PEGilada muestra un aumento en la unión a una o más moléculas diana con respecto a la proteína de armazón a base de fibronectina no PEGilada.

La velocidad de aclaramiento en suero de las proteínas de armazón a base de fibronectina modificadas con PEG se puede reducir en aproximadamente el 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 % o incluso 90 %, con respecto a la velocidad de aclaramiento de la proteína de armazón a base de fibronectina sin modificar. La proteína de armazón a base de fibronectina modificada con PEG puede tener una semivida ($t_{1/2}$) que sea superior a la semivida de la proteína de armazón a base de fibronectina sin modificar. La semivida de la proteína de armazón a base de fibronectina modificada con PEG puede mejorar en al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, 100 %, 125 %, 150 %, 175 %, 200 %, 250 %, 300 %, 400 % o 500 %, o incluso 1.000 % con respecto a la semivida de la proteína de armazón a base de fibronectina sin modificar. En algunas realizaciones, la semivida de la proteína se determina *in vitro*, tal como en una solución salina tamponada o en suero. En otras realizaciones, la semivida de la proteína es una semivida *in vivo*, tal como la semivida de la proteína de armazón a base de fibronectina en suero u otro fluido corporal de un animal.

55 Tecnología de fusión de ácido nucleico y proteína

En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas de armazón a base de fibronectina que comprenden un dominio de fibronectina de tipo III, que se unen a una diana humana tal como, por ejemplo, TNF-alfa, EGFR, VEGFR2, IGF-IR u otras proteínas. Una forma de crear y ensayar con rapidez dominios Fn3 con propiedades de unión específicas es la tecnología de fusión de ácido nucleico y proteína de Adnexus, una compañía de Bristol-Myers Squibb. Dicha tecnología de expresión y marcaje *in vitro*, denominada PROfusion™, que aprovecha las fusiones de ácido nucleico-proteína (fusiones de ARN y ADN-proteína), se puede usar para identificar nuevos polipéptidos y motivos de aminoácidos que sean importantes para la unión a proteínas. La tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína es una tecnología que acopla covalentemente una proteína a su información genética codificante. Para una descripción detallada de la tecnología de fusión de ARN-proteína y los métodos de rastreo de bibliotecas de proteínas de armazón a base de fibronectina, véase Szostak *et al.*, patentes de EE.UU. n.º: 6.258.558; 6.261.804; 6.214.553;

6.281.344; 6.207.446; 6.518.018; publicaciones PCT n° WO00/34784; WO01/64942; WO02/032925; y Roberts y Szostak, *Proc Natl. Acad. Sci.* 94:12297-12302, 1997.

Vectores y polinucleótidos

5 Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas de armazón a base de fibronectina desveladas en el presente documento se pueden sintetizar química, enzimática o recombinantemente. Se puede seleccionar el uso de codones con el fin de mejorar la expresión en una célula. Dicho uso de codones dependerá del tipo de célula seleccionado. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamífero, células vegetales, células de levadura y células de insectos. Véase, por ejemplo: Mayfield *et al.*, *Proc Natl Acad Sci*, EE.UU. 21 de enero de 2003; 100(2):438-42; Sinclair *et al. Protein Expr Purif.* Octubre de 2002; 26(1):96-105; Connell N. D. *Curr Opin Biotechnol.* Octubre de 2001; 12(5):446-9; Makrides *et al. Microbiol Rev.* Septiembre de 1996; 60(3):512-38; y Sharp *et al. Yeast.* Octubre de 1991; 7(7):657-78.

15 Las técnicas generales para la manipulación de ácidos nucleicos se describen, por ejemplo, en Sambrook *et al.*, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2 ed., 1989, o F. Ausubel *et al.*, "Current Protocols in Molecular Biology" (Green Publishing and Wiley-Interscience: Nueva York, 1987) y actualizaciones periódicas. El ADN que codifica el polipéptido está enlazado operativamente a elementos reguladores de la transcripción o de la traducción, adecuados, derivados de genes de mamíferos, virus o insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión ribosomal del ARNm adecuados, y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. También se incorpora la capacidad para replicarse en un hospedador, generalmente conferida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de los transformantes.

25 Las proteínas de armazón a base de fibronectina descritas en el presente documento se pueden producir de forma recombinante no solo directamente, sino también como un polipéptido de fusión con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia señal u otro polipéptido que tenga un sitio de escisión específico en el extremo N-terminal de la proteína madura o del polipéptido maduro. La secuencia señal heteróloga seleccionada preferentemente es aquella que es reconocida y procesada (es decir, escindida por una peptidasa señal) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen ni procesan una secuencia señal nativa, la secuencia señal se sustituye con una secuencia señal procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de las secuencias líder de fosfatasa alcalina, de penicilinas, de lpp o de enterotoxina II estable al calor. Para la secreción en levaduras, la secuencia señal nativa se puede sustituir, por ejemplo, con la secuencia líder de la invertasa de levadura, una secuencia líder de factor (incluyendo las secuencias líder del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*) o la secuencia líder de la fosfatasa ácida, la secuencia líder de la glucoamilasa de *C. albicans* o la señal descrita en la publicación PCT n.º WO90/13646. En la expresión de células de mamífero, se puede disponer de las secuencias señal de mamíferos, así como de las secuencias líder secretoras virales, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN para dichas regiones precursoras se puede ligar en el marco de lectura al ADN que codifica la proteína.

Los vectores tanto de expresión como de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es aquella que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias de replicación autónoma. Dichas secuencias son muy conocidas para varias bacterias, levaduras y virus. El origen de replicación del plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de las bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido de 2 micrómetros es adecuado para las levaduras, y hay varios orígenes virales (SV40, polioma, adenovirus, VSV o BPV) que son útiles para los vectores de clonación en células de mamífero. En general, no es necesario el componente de origen de replicación para los vectores de expresión de mamíferos (normalmente, solo se puede usar el origen de SV40, porque contiene el promotor temprano).

Los vectores de expresión y clonación pueden contener un gen de selección, también denominado marcador seleccionable. Los genes de selección típicos codifican proteínas que (a) confieren resistencia a antibióticos o a otras toxinas, por ejemplo, ampicilina, neomicina, metotrexato o tetraciclina; (b) complementan las deficiencias auxotróficas; o (c) suministran nutrientes críticos no disponibles en medios complejos, por ejemplo, el gen que codifica la D-alanina racemasa para los bacilos.

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp 1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb *et al.*, *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp 1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC n.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85: 12 (1977). La presencia de la lesión de *trp 1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona entonces un entorno eficaz para detectar la transformación mediante el crecimiento en ausencia de triptófano. De manera similar, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que portan el gen *Leu2*.

65

Los vectores de expresión y clonación habitualmente contienen un promotor que es reconocido por el organismo hospedador y está unido operativamente al ácido nucleico que codifica la proteína de armazón a base de fibronectina. Los promotores adecuados para su uso con hospedadores procariotas incluyen el promotor *phoA*, sistemas promotores de beta-lactamasa y lactosa, fosfatasa alcalina, un sistema promotor de triptófano (*trp*) y promotores híbridos tales como el promotor *tac*. Sin embargo, hay otros promotores bacterianos conocidos que son adecuados. Los promotores para su uso en sistemas bacterianos también contendrán una secuencia de Dalgarno-Shine (S.D.) ligada operativamente al ADN que codifica la proteína de armazón a base de fibronectina.

Se conocen secuencias promotoras para eucariotas. Casi todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT ubicada aproximadamente 25 a 30 bases cadena arriba del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia que se encuentra de 70 a 80 bases cadena arriba del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT, donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA que puede ser la señal para la adición de la cola poli A al extremo 3' de la secuencia codificante. Todas estas secuencias se insertan de forma adecuada en vectores de expresión eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levadura incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato quinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexoquinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructoquinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato quinasa, triosafosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucoquinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de la transcripción controlada por las condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras para la alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradativas asociadas al metabolismo del nitrógeno, metalotioneína, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen más detalladamente en la publicación de patente EP n.º 73.657. Los potenciadores de levadura también se usan ventajosamente con promotores de levadura.

La transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamífero se puede controlar, por ejemplo, mediante promotores obtenidos de los genomas de virus tales como el virus del polioma, el virus de la viruela aviar, adenovirus (tal como Adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, virus de la hepatitis B y, lo más preferentemente, el virus de simio 40 (SV40), de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor de la actina o un promotor de inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, siempre que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

Los promotores temprano y tardío del virus SV40 se obtienen convenientemente como un fragmento de restricción de SV40 que también contiene el origen de replicación viral de SV40. El promotor temprano inmediato del citomegalovirus humano se obtiene convenientemente como un fragmento de restricción HindIII E. Un sistema para expresar ADN en hospedadores mamíferos usando el virus del papiloma bovino como vector se desvela en la patente de EE.UU. n.º 4.419.446. Una modificación de este sistema se describe en la patente de EE.UU. n.º 4.601.978. Véase también Reyes *et al.*, *Nature* 297: 598-601 (1982) sobre la expresión del ADNc del interferón beta humano en células de ratón bajo el control de un promotor de timidina quinasa del virus herpes simple. Como alternativa, se puede usar la repetición terminal larga del virus del sarcoma de Rous como promotor.

La transcripción de un ADN que codifica las proteínas de armazón a base de fibronectina por eucariotas superiores a menudo se aumenta insertando una secuencia potenciadora en el vector. En la actualidad, se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina, alfa-fetoproteína e insulina). Por lo general, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de célula eucariota. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado tardío del origen de replicación (de 100 a 270 pb), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del polioma en el lado tardío del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, *Nature* 297: 17-18 (1982) sobre elementos potenciadores para la activación de promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica un polipéptido, pero se encuentra preferentemente en un sitio 5' del promotor.

Los vectores de expresión usados en las células eucariotas hospedadoras (por ejemplo, de levaduras, hongos, insectos, plantas, animales, seres humanos o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán las secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias normalmente se encuentran disponibles en las regiones no traducidas 5' y, ocasionalmente 3', de los ADN o ADNc eucariotas o virales. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la parte no traducida del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente de terminación de la transcripción útil es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO94/11026 y el vector de expresión desvelado en el mismo.

El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de marcaje de proteínas que pueda ser útil para la purificación de la proteínas de armazón a base de fibronectina. Los ejemplos de marcadores de proteínas incluyen, pero sin limitación, un marcador de histidina, un marcador FLAG, un marcador myc, un marcador HA o un

marcador GST. Los vectores de clonación y expresión apropiados para su uso con hospedadores celulares de bacterias, hongos, levaduras y mamíferos se pueden encontrar en "Cloning Vectors: A Laboratory Manual", (Elsevier, Nueva York, 1985).

5 La construcción de expresión se introduce en la célula hospedadora usando un método apropiado para la célula hospedadora, como será evidente para un experto en la materia. En la técnica, se conocen varios métodos de introducción de ácidos nucleicos en células hospedadoras, incluyendo, pero sin limitación, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo con microproyectiles; lipofección; e infección (donde el vector es un agente infeccioso).

10 Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariontes, levaduras, células de mamíferos o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gram negativos u organismos gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* sp. También se puede usar levadura, preferentemente de especies de *Saccharomyces* tales como *S. cerevisiae*, para la producción de polipéptidos. También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamífero o de insecto para expresar proteínas recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insectos son revisados por Luckow y Summers, (*Bio/Technology*, 6:47, 1988). Los ejemplos de líneas celulares hospedadoras de mamífero adecuadas incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, de ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionarias humanas, HeLa, 293, 293T y las líneas celulares BHK. Las proteínas de armazón a base de fibronectina purificadas se preparan cultivando sistemas de hospedador/vector adecuados para expresar las proteínas recombinantes. Para muchas aplicaciones, el pequeño tamaño de las proteínas de armazón a base de fibronectina haría de la expresión en *E. coli* el método preferido para la expresión. Las proteínas de armazón a base de fibronectina se purifican después de los medios de cultivo o extractos celulares.

25 Producción de proteínas

Las células hospedadoras se transforman con los vectores de expresión o de clonación descritos en el presente documento para la producción de proteínas y se cultivan en medios de nutrientes convencionales modificados según sea apropiado para inducir promotores, seleccionar transformantes o amplificar los genes que codifican las secuencias deseadas.

Las células hospedadoras usadas para producir las proteínas de armazón a base de fibronectina pueden cultivarse en varios medios. Los medios disponibles en el mercado tales como F10 de Ham (Sigma), Medio Esencial Mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640 (Sigma) y medio de Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham *et al.*, *Meth. Enz.* 58:44 (1979), Barnes *et al.*, *Anal. Biochem.* 102:255 (1980), patentes de EE.UU. n.º 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; los documentos WO90/03430; WO87/00195; o la patente de EE.UU. n.º Re. 30.985 se pueden usar como medios de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede suplementarse, según sea necesario, con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tales como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tales como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco GENTAMYCIN™), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos generalmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se puede incluir cualquier otro suplemento necesario a concentraciones apropiadas que serían conocidas por los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, el pH y similares, son las usadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

Las proteínas de armazón a base de fibronectina desveladas en el presente documento también se pueden producir usando sistemas de traducción exentos de células. Para dichos fines, los ácidos nucleicos que codifican las proteínas de armazón a base de fibronectina deben ser modificados para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción exenta de células del ARNm en el sistema exento de células que se esté utilizando en particular (eucariótica, tal como un sistema de traducción exento de células de mamífero o de levadura, o procarionte tal como un sistema de traducción exento de células bacteriano).

Las proteínas de armazón a base de fibronectina también se pueden producir mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en "Solid Phase Peptide Synthesis", 2ª ed., 1984, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL). Las modificaciones de las proteínas de armazón a base de fibronectina también se pueden producir mediante síntesis química.

Las proteínas de armazón a base de fibronectina desveladas en la presente se pueden purificar mediante métodos de aislamiento/purificación para las proteínas generalmente conocidas en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen la extracción, recristalización, precipitación salina (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución a contracorriente

o cualquier combinación de las mismas. Tras la purificación, las proteínas de armazón a base de fibronectina pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse mediante cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, pero sin limitación, filtración y diálisis.

- 5 La proteína de armazón a base de fibronectina purificada es preferentemente al menos un 85 % pura, más preferentemente al menos un 95 % pura y lo más preferentemente al menos un 98 % pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína de armazón a base de fibronectina es suficientemente pura para su uso como un producto farmacéutico.

10 Usos ilustrativos

Las proteínas de armazón a base de fibronectina se pueden marcar con un resto detectable y se pueden usar para varias aplicaciones de diagnóstico. El resto detectable puede ser uno cualquiera que sea capaz de producir, ya sea directa o indirectamente, una señal detectable. Por ejemplo, el resto detectable puede ser un radioisótopo, tal como H³, C¹⁴, C¹³, P³², S³⁵ o I¹³¹; un compuesto fluorescente o quimioluminiscente, tal como isotiocianato de fluoresceína, rodamina o luciferina; o una enzima tal como fosfatasa alcalina, beta-galactosidasa o peroxidasa de rábano picante.

20 Se puede emplear cualquier método conocido en la técnica para conjugar una proteína al resto detectable, incluyendo aquellos métodos descritos por Hunter, *et al.*, *Nature* 144: 945 (1962); David *et al.*, *Biochemistry* 13: 1014 (1974); Pain, *et al.*, *J. Immunol. Meth.* 40: 219 (1981); y Nygren, *J. Histochem. and Cytochem.* 30: 407 (1982). Los métodos *in vitro*, incluyen la química de conjugación bien conocida en la técnica incluyendo la química compatible con proteínas, tal como la química para aminoácidos específicos tales como Cys y Lys. Para enlazar un resto detectable a una proteína de armazón a base de fibronectina, se usa un grupo de enlace o grupo reactivo. Los grupos de enlace adecuados son bien conocidos en la técnica e incluyen grupos disulfuro, grupos tioéter, grupos lábiles ácidos, grupos fotolábiles, grupos lábiles peptidasa y grupos lábiles esterasa. Los grupos de enlace preferidos son grupos disulfuro y grupos tioéter, dependiendo de la aplicación. Para los polipéptidos sin un aminoácido de Cys, se puede diseñar por ingeniería genética una Cys en una ubicación para permitir que haya actividad de la proteína mientras se crea una ubicación para la conjugación.

30 Las proteínas de armazón a base de fibronectina enlazadas con un resto detectable también son útiles para la formación de imágenes *in vivo*. El polipéptido se puede enlazar a un agente radio-opaco o radioisótopo, administrado a un sujeto, preferentemente en el torrente sanguíneo, y ensayarse la presencia y ubicación de la proteína marcada. Esta técnica de formación de imágenes es útil, por ejemplo, en la determinación de la fase y el tratamiento de tumores malignos cuando la proteína de armazón a base de fibronectina se une a una diana asociada al cáncer. La proteína de armazón a base de fibronectina puede marcarse con cualquier resto que sea detectable en un sujeto, ya sea por resonancia magnética nuclear, radiología u otro medio de detección conocido en la técnica.

40 Las proteínas de armazón a base de fibronectina también son útiles como agentes de purificación por afinidad. En este proceso, las proteínas de armazón a base de fibronectina se inmovilizan en un soporte adecuado tal como una resina Sephadex o papel filtro, usando métodos bien conocidos en la técnica.

45 Las proteínas de armazón a base de fibronectina se pueden emplear en cualquier método de ensayo conocido tal como ensayos de unión competitiva, ensayos de sándwich directos e indirectos y ensayos de inmunoprecipitación (Zola, "Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques", pág. 147-158 (CRC Press, Inc., 1987)).

50 Además, en el presente documento, se describen métodos de detección de una molécula diana en una muestra, tal como VEGFR2, IGF-IR o EGFR. Un método puede comprender poner en contacto la muestra con una proteína de armazón a base de fibronectina descrita en el presente documento, en el que dicha proteína en contacto se lleva a cabo en condiciones que permitan la formación de complejos de proteína de armazón a base de fibronectina-diana; y la detección de dicho complejo, detectando así dicha diana en dicha muestra. La detección se puede llevar a cabo usando cualquier técnica conocida en la materia, tal como, por ejemplo, radiografía, ensayo inmunológico, detección por fluorescencia, espectroscopía de masas o resonancia de plasmón de superficie. La muestra a menudo será una muestra biológica, tal como una biopsia, y particularmente una biopsia de un tumor, un presunto tumor. La muestra puede ser de un ser humano o de otro mamífero. La proteína de armazón a base de fibronectina puede marcarse con un resto de marcaje tal como un resto radiactivo, un resto fluorescente, un resto cromogénico, un resto quimioluminiscente o un resto hapteno. La proteína de armazón a base de fibronectina puede inmovilizarse sobre un soporte sólido.

60 En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas de armazón a base de fibronectina útiles en el tratamiento de trastornos. Las enfermedades o los trastornos que se pueden tratar estarán dictados por la especificidad de unión de la proteína de armazón a base de fibronectina. En el presente documento, también se describen métodos para la administración de proteínas de armazón a base de fibronectina a un sujeto. El sujeto puede ser un ser humano. Es conveniente que las proteínas de armazón a base de fibronectina sean farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular para un ser humano. Un polipéptido "farmacéuticamente aceptable" se refiere a un polipéptido que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de

proteínas de armazón a base de fibronectina farmacéuticamente aceptables incluyen dominios ¹⁰Pn3 que carecen del dominio de unión A integrina (RGD) y dominios ¹⁰Fn3 que están esencialmente exentos de endotoxinas o pirógenos o que tienen niveles muy bajos de endotoxinas o pirógenos.

5 En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina, en particular, las proteínas de armazón a base de fibronectina que se unen a IGF-IR, VEGFR2 y/o EGFR, son útiles en el tratamiento de trastornos tales como el cáncer. En ciertas realizaciones, las proteínas de armazón a base de fibronectina son útiles en el tratamiento de los cánceres asociados a las mutaciones o los niveles de expresión de IGF-IR, VEGFR2 y/o EGFR. En algunas realizaciones, la administración de una proteína de armazón a base de fibronectina trata un trastorno antiproliferativo
 10 en un sujeto. En algunas realizaciones, la administración de una proteína de armazón a base de fibronectina inhibe el crecimiento de células tumorales *in vivo*. La célula tumoral puede derivar de cualquier tipo de célula incluyendo, sin limitación, células epidérmicas, epiteliales, endoteliales, de leucemia, de sarcoma, de mieloma múltiple o células mesodérmicas. Los ejemplos de líneas de células tumorales comunes para su uso en estudios de tumores de xenoinjertos incluyen células A549 (células no pequeñas de carcinoma de pulmón), células DU-145 (próstata),
 15 células MCF-7 (mama), células Colo 205 (colon), células 3T3/IGF-IR (fibroblastos de ratón), células NCI H441, células HEP G2 (hepatoma), células MDA MB 231 (mama), células HT-29 (colon), células MDA-MB-435s (mama), células U266, células SH-SY5Y, células Sk-Mel-2, NCI-H929, RPM18226 y células A431. En algunas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina inhibe el crecimiento celular del tumor en comparación con el crecimiento del tumor en un animal no tratado. En algunas realizaciones, la proteína de armazón a base de fibronectina inhibe el crecimiento de las células tumorales en un 50, 60, 70, 80 % o más en comparación con el crecimiento del tumor en un animal no tratado. En algunas realizaciones, la inhibición del crecimiento de células tumorales se mide al menos 7 días o al menos 14 días después de que los animales hayan iniciado el tratamiento con la proteína de armazón a base de fibronectina. En algunas realizaciones, se administra otro agente antineoplásico al animal con la proteína de armazón a base de fibronectina.

25 La administración de proteína de armazón a base de fibronectina puede ser útil para el tratamiento y/o la profilaxis de tumores y/o metástasis tumorales, donde el tumor se selecciona del grupo que consiste en tumor cerebral, tumor del tracto urogenital, tumor del sistema linfático, tumor de estómago, tumor de laringe, leucemia monocítica, adenocarcinoma pulmonar, carcinoma pulmonar de células pequeñas, cáncer de páncreas, glioblastoma y
 30 carcinoma de mama, sin limitación.

La administración de proteínas de armazón a base de fibronectina puede ser útil para el tratamiento de enfermedades cancerosas seleccionadas del grupo que consiste en carcinoma de células escamosas, cáncer de vejiga, cáncer de estómago, cáncer de hígado, cáncer de riñón, cáncer colorrectal, cáncer de mama, cáncer de cabeza, cáncer de cuello, cáncer de esófago, cáncer ginecológico, cáncer de tiroides, linfoma, leucemia crónica y leucemia aguda.

En otras realizaciones, una proteína de armazón a base de fibronectina se une a una diana implicada en la respuesta inflamatoria y/o trastornos autoinmunes tales como, por ejemplo, el factor de necrosis tumoral (TNF) alfa. Dichas proteínas de armazón a base de fibronectina pueden ser útiles para el tratamiento de trastornos autoinmunes tales como artritis reumatoide, espondilitis anquilosante, enfermedad de Crohn, soriasis y asma refractaria.

Formulación y administración

45 La solicitud proporciona además composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden las proteínas de armazón a base de fibronectina descritas en el presente documento, estando la composición esencialmente exenta de endotoxinas o pirógenos.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden proteínas de armazón a base de fibronectina se preparan para su conservación mezclando las proteínas descritas que tienen el grado deseado de pureza con vehículos, excipientes o estabilizantes fisiológicamente aceptables ("Remington's Pharmaceutical Sciences", 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980)), en forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los vehículos, excipientes o estabilizantes no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas, e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencilamonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencilico; parabenes de alquilo tales como metil- o propil-parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas tales como albúmina sérica, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina, o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros carbohidratos incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo, complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos tales como TWEEN™, PLURONICS™ o polietilenglicol (PEG).

65

Las formulaciones del presente documento también pueden contener más de un compuesto activo según sea necesario para la indicación particular que se esté tratando, preferentemente aquellos con actividades complementarias que no se afectan de manera adversa entre sí. Dichas moléculas están presentes adecuadamente en combinación en cantidades que son eficaces para el propósito previsto.

5 Las proteínas de armazón a base de fibronectina también pueden atraparse en microcápsulas preparadas, por ejemplo, mediante técnicas de coacervación o mediante polimerización interfacial, por ejemplo, hidroximetilcelulosa o microcápsula de gelatina y microcápsula de poli-(metilmetacrilato), respectivamente, en sistemas de administración de fármacos coloidales (por ejemplo, liposomas, microesferas de albúmina, microemulsiones, nanopartículas y nanocápsulas) o en macroemulsiones. Dichas técnicas se desvelan en "Remington's Pharmaceutical Sciences" 16ª edición, Osol, A. Ed. (1980).

15 En ciertas realizaciones, la solicitud proporciona composiciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen un pH de 4,0 a 6,5. En otras realizaciones, la solicitud proporciona composiciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen un pH de 4,0 a 5,5. En otras realizaciones, la solicitud proporciona composiciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen un pH de 5,5. En otras realizaciones, la solicitud proporciona composiciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen un pH de 4,0. En particular, la solicitud proporciona composiciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina que tienen fragmentación reducida y/o bajos niveles de agregación durante la conservación en solución. Como se demuestra en el apartado de ejemplos, las proteínas de armazón a base de fibronectina descritas en el presente documento tienen mayor estabilidad a pH 4,0 mientras que, al mismo tiempo, presentan menores niveles de agregación a pH 4,0 en comparación con un pH de 5,5. Dichas formulaciones estables, solubles, que tienen un pH de 4,0 son particularmente adecuadas para la administración intravenosa. En algunas realizaciones, la concentración de proteína en dichas formulaciones estables es de al menos 3 mg/ml. En realizaciones ilustrativas, la concentración de proteína en dichas formulaciones estables es de al menos 5 mg/ml. En ciertas realizaciones, la concentración de proteína en dichas formulaciones estables varía de 3-10 mg/ml, 3-8 mg/ml, 3-6 mg/ml, 3-5 mg/ml, 4-10 mg/ml, 4-8 mg/ml, 4-6 mg/ml, 5-10 mg/ml, 5-8 mg/ml o 5-6 mg/ml. En realizaciones ilustrativas, las formulaciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen una reducida agregación en comparación con una formulación equivalente de una proteína de armazón a base de fibronectina a un pH superior. Por ejemplo, las formulaciones estables pueden presentar al menos un 10 %, 20 %, 30 %, 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 % o menos de agregación durante la conservación en solución durante 4 semanas a pH 4,0 en comparación con el nivel de agregación observado durante la conservación de las proteínas de armazón a base de fibronectina durante la conservación de 4 semanas a un pH de 5,5 o superior. En ciertas realizaciones, las formulaciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen menos del 10 %, 8 %, 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3 %, 2 %, 1 % o menos de agregación tras su conservación a 25 °C durante al menos 4 semanas. En ciertas realizaciones, las formulaciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen menos del 7 %, 6 %, 5 %, 4 %, 3,5 %, 3 %, 2 % o menos de fragmentación durante su conservación en solución durante cuatro semanas a un pH de 4,0 y a 25 °C. En ciertas realizaciones, las formulaciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen menos del 5 % de fragmentación y menos del 5 % de agregación durante su conservación en solución a 25 °C durante al menos 4 semanas. En realizaciones ilustrativas, las formulaciones estables de proteínas de armazón a base de fibronectina tienen menos del 4 % de fragmentación y menos del 4 % de la agregación durante su conservación en solución a 25 °C de al menos 4 semanas.

45 Las formulaciones que se usarán para la administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se consigue fácilmente mediante la filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparados de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparados de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen las proteínas de armazón a base de fibronectina descritos en el presente documento, matrices que están en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(alcohol vinílico)), polilactidas (patente de EE.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y etil-L-glutamato, acetato de etilen-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables tales como el LUPRON DEPOT™ (microesferas inyectables compuestas de copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y ácido poli-D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque los polímeros tales como el acetato de etilen-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante más de 100 días, ciertos hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el organismo durante un largo período de tiempo, se pueden desnaturalizar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37 °C, produciendo una pérdida de la actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden idear estrategias racionales para la estabilización dependiendo del mecanismo implicado. Por ejemplo, si el mecanismo de agregación resulta ser la formación de enlaces S-S intermoleculares mediante el intercambio de tio-disulfuro, la estabilización puede conseguirse modificando los restos sulfhidrilo, liofilizando en soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos apropiados y desarrollando composiciones de matriz polimérica específicas.

65 Si bien el experto en la materia entenderá que la dosis de cada proteína de armazón a base de fibronectina dependerá de la identidad de la proteína, las dosis preferidas pueden variar de aproximadamente 10 mg/metro

cuadrado a aproximadamente 2.000 mg/metro cuadrado, más preferentemente de aproximadamente 50 mg/metro cuadrado a aproximadamente 1.000 mg/metro cuadrado.

5 Para las aplicaciones terapéuticas, las proteínas de armazón a base de fibronectina se administran a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa en forma de bolo o por infusión continua durante un periodo de tiempo, por vía intramuscular, subcutánea, intra-articular, intrasinovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. La proteína también se puede administrar por vía intratumoral, peritumoral, intralesional o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos locales, así como sistémicos. Los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y pueden ser
10 determinados por los expertos en la materia según lo justifique la situación clínica. Los ejemplos de vehículos, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH de aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano; (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9 % p/v); y (3) dextrosa al 5 % (p/v). Los métodos de la presente invención se pueden poner en práctica *in vitro*, *in vivo* o *ex vivo*.

15 La administración de proteínas de armazón a base de fibronectina, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, bien administrados conjunta o secuencialmente, puede tener lugar como se describe anteriormente para las aplicaciones terapéuticas. Los expertos en la materia entenderán que los vehículos, diluyentes y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración conjunta dependen de la identidad del agente terapéutico en particular que se esté administrando conjuntamente.

20 Cuando está presente en una forma de dosificación acuosa, en lugar de liofilizada, la proteína de armazón a base de fibronectina, por lo general, se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de la enfermedad, la dosis apropiada de proteínas de armazón a base de fibronectina dependerá del tipo de enfermedad que se vaya a tratar, como se ha
25 definido anteriormente, de la gravedad y el curso de la enfermedad, de si las proteínas de armazón a base de fibronectina se administran con propósitos preventivos o terapéuticos, del curso de la terapia anterior, de la historia clínica del paciente y de la respuesta a la proteína de armazón a base de fibronectina, y de la opinión del médico tratante. La proteína de armazón a base de fibronectina se administra adecuadamente al paciente de una vez o
30 durante una serie de tratamientos.

Listado de secuencias

Secuencia núcleo de tipo silvestre

35 EVVAATPTŠLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDY
TITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 1)

Núcleo I (SEQ ID NO: 2)

EVVAATPTŠLLISWŠARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVD
YTITVYAVTRFRDYQPISINYRT

Núcleo V (SEQ ID NO: 3)

40 EVVAATPTŠLLISWRHPHPTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDY
TITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRT

Cola corta (SEQ ID NO: 4)
EIEK

45 Cola de Cys modificada (SEQ ID NO: 5)
EGSGC

Cola de Cys (SEQ ID NO: 6)
EIEKPCQ

50 Enlazador a base de Fn (SEQ ID NO: 7)
PSTSTST

Enlazador GS₅ (SEQ ID NO: 8)
GSGSGSGSGS

55 Enlazador GS₁₀ (SEQ ID NO: 9)
GSGSGSGSGSGSGSGSGSGS

(GGGGS)₃ (SEQ ID NO: 10)

GGGGS GGGGS GGGGS

(GGGGS)₅ (SEQ ID NO: 11)
GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS GGGGS

5 G₄SG₄SG₃SG (SEQ ID NO: 12)
GGGGS GGGGS GGGGS G

GPG (SEQ ID NO: 13)

10 GPGPGPG (SEQ ID NO: 14)

GPGPGPGPGPG (SEQ ID NO: 15)

15 Enlazador PA3 (SEQ ID NO: 16)
PAPAPA

Enlazador PA6 (SEQ ID NO: 17)
PAPAPAPAPAPA

20 Enlazador PA9 (SEQ ID NO: 18)
PAPAPAPAPAPAPAPAPA

MGVSDVPRDL (SEQ ID NO: 19)

25 VSDVPRDL (SEQ ID NO: 20)

GVSDVPRDL (SEQ ID NO: 21)

30 Enlazador de VEGFR2/IGF-IR DK+ (SEQ ID NO: 22)

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDY TITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAAATPT
SLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDY TITVYAVTD
GRNGRLLSIPISINYRTEIDKPCQ

Enlazador de EGFR/IGF-IR DK+ (SEQ ID NO: 23)

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDY TITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS
DVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAPVDYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG
LKPGVDY TITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIDKPCQ

Enlazador de EGFR/IGF-IR DK- con cola de GSGC (SEQ ID NO: 24)

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDY TITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS
DVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAPVDYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG
LKPGVDY TITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEGSGC

35 Enlazador de EGFR/IGF-IR DK- con cola de EIEKPCQ (SEQ ID NO: 25)

MGVSDVPRDLEVVAAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDY TITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKGSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS
DVPRDLEVVAAATPTSLLISWWAPVDYRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISG
LKPGVDY TITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRTEIEKPCQ

40 X_nSDVPRDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 26)

X_nDVPRDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 27)

45 X_nVPRDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 28)

ES 2 573 108 T3

X_nPRDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 29)

5 X_nRDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 30)

X_nDL, en la que n = 0, 1 o 2 aminoácidos, en la que cuando n = 1, X es Met o Gly, y cuando n = 2, X es Met-Gly (SEQ ID NO: 31)

10 EIEKPSQ (SEQ ID NO: 32)

EIEKP (SEQ ID NO: 33)

15 EIEKPS (SEQ ID NO: 34)

EIEKPC (SEQ ID NO: 35)

EGSGS (SEQ ID NO: 36)

20 Secuencia de fibronectina de tipo silvestre

VSDVPRDLEVVAATPT¹PTSL¹LLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 37)

Núcleo de ¹⁰F_n3 con cola de EIEK

EVVAATPTSL¹LLISW(X)_xRYRITYGETGGNSPVQEFTVP(X)_yTATISGLKPGVDYTITVYAVT(X)_zPISINYRTEIEK (SEQ ID NO: 38)

Núcleo E (SEQ ID NO: 39)

EVVAATPTSL¹LLISWWAPVD¹RYQYYRITYGETGGNSPVQEFTVPRDVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTDYKPHADGPHTYHESPISINYRT

25 Bucle BC de IGF-IR (SEQ ID NO: 40)
SARLKVA

30 Bucle DE de IGF-IR (SEQ ID NO: 41)
KNVY

Bucle FG de IGF-IR (SEQ ID NO: 42)
RFRDYQ

35 Bucle BC de VEGFR2 (SEQ ID NO: 43)
RHPHFPT

Bucle DE de VEGFR2 (SEQ ID NO: 44)
LQPP

40 Bucle FG de VEGFR2 (SEQ ID NO: 45)
DGRNGRLLSI

EIDK (SEQ ID NO: 46)

45 EIDKPCQ (SEQ ID NO: 47)

I-Fn-V(2DK-) con cola de Cys (SEQ ID NO: 48)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSL¹LLISWSARLKVARYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPTSL¹LLISWRHPHFPTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPIISINYRTEIEKPCQ

50 I-Fn-V(2DK-) con cola de ser (SEQ ID NO: 49)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPT
LLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTD
GRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSQ

I-GS5-V(2DKL-) con cola de ser o de cys (SEQ ID NO: 50)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVA
ATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVY
AVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPXQ, en la que X = serina o cisteína

5 I-GS10-V(2DK-) con cola de ser o de cys (SEQ ID NO: 51)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYT
ATISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKSGSGSGSGSGSGSGSGSGSVS
DVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLK
PGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPXQ, en la que X = serina o cisteína

10 V-Fn-I(2DK-) con cola de ser (SEQ ID NO: 52)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATP
TLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAV
TRFRDYQPISINYRTEIEKPSQ

V-Fn-I(2DK-) con cola de cys (SEQ ID NO: 53)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATP
TLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTITVYAV
TRFRDYQPISINYRTEIEKPCQ

15 V-GS5-I(2DK-) con cola de ser o de cys (SEQ ID NO: 54)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKSGSGSGSGSVSDVPRDLEVVA
AATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISGLKPGVDYTIT
VYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPXQ, en la que X = serina o cisteína

V-GS10-I(2DK-) con cola de ser o de cys (SEQ ID NO: 55)

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTDGRNGRLLSIPISINYRTEIEKSGSGSGSGSGSGSGSGSV
SDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTATISG
LKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPXQ, en la que X = serina o cisteína

20 VI(DK+) (SEQ ID NO: 56)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIDKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPTS
LISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTDG
RNGRLLSIPISINYRTEIDKPCQ

VI(DK-) (SEQ ID NO: 57)

GVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWSARLKVARYYRITYGETGGNSPVQEFTVPKNVYTAT
ISGLKPGVDYTITVYAVTRFRDYQPISINYRTEIEKPSTSTSTVSDVPRDLEVVAATPTS
LISWRHPHFTRYRITYGETGGNSPVQEFTVPLQPPTATISGLKPGVDYTITVYAVTDG
RNGRLLSIPISINYRTEIEKPCQ

25

Ejemplos

La invención se describe ahora con referencia a los siguientes ejemplos, que son meramente ilustrativos, y no pretenden limitar la presente invención.

5

Ejemplo 1. Proteínas de armazón a base de fibronectina

Se generaron diversas proteínas de armazón a base de fibronectina, incluyendo aglutinantes de VEGFR2/IGF-IR ("aglutinantes V/I") y aglutinantes de EGFR/IGF-IR ("aglutinantes E/I"). La siguiente tabla representa las construcciones descritas en el presente documento y sus correspondientes SEQ ID NO.

10

Tabla 1. Visión de conjunto de los diversos aglutinantes V/I y E/I

Construcción	Descripción	SEQ ID NO:	Abreviatura
Aglutinante de IGF-IR/VEGFR2 DK+ con cola de EIDKPCQ	Una construcción de V/I bivalente con una cola C1 que consiste en SEQ ID NO: 46 y una cola C2 que consiste en SEQ ID NO: 47	22	V/I(DK+)
Aglutinante de EGFR/IGF-IR DK+ con cola de EIDKPCQ	Una construcción de E/I bivalente con una cola C1 que consiste en SEQ ID NO: 46 y una cola C2 que consiste en SEQ ID NO: 47	23	E/I(DK+)
Aglutinante de EGFR/IGF-IR DK- con cola de EGSGC	Una construcción de E/I bivalente con una cola C1 que consiste en SEQ ID NO: 4 y una cola C2 que consiste en SEQ ID NO: 5	24	E/I(DK-, sin extremo C-terminal)
Aglutinante de EGFR/IGF-IR DK- con cola de EIEKPCQ	Una construcción de E/I bivalente con una cola C1 que consiste en SEQ ID NO: 4 y una cola C2 que consiste en SEQ ID NO: 6	25	E/I(2DK-)

La SEQ ID NO: 22 es la secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente V/I(DK+) que fue descrita por primera vez en el documento WO 2009/142773. V/I(DK+) comprende dominios de fibronectina que se unen a IGF-IR y VEGFR2. El núcleo de fibronectina de unión a IGF-IR tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 y el núcleo de fibronectina de unión a VEGFR2 tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 3. Los dos dominios están conectados por un enlazador polipeptídico derivado de la secuencia de aminoácidos que conecta el primer y el segundo dominio Fn3 en la fibronectina humana (SEQ ID NO: 7). La subunidad de unión a I de V/I(DK+) contiene una extensión C-terminal (C1) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46, es decir, que contiene un sitio DK. La subunidad de unión a V de V/I (DK+) contiene una extensión C-terminal (C2) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, es decir, que contiene un sitio DK.

15

20

La SEQ ID NO: 23 es la secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente E/I(DK+). E/I(DK+) comprende dominios de fibronectina que se unen a IGF-IR y a EGFR. El núcleo de fibronectina de unión a IGF-IR tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 2 y el núcleo de fibronectina de unión a EGFR2 tiene la secuencia expuesta en SEQ ID NO: 39. Los dos dominios están unidos por un enlazador polipeptídico de glicina-serina que tiene la SEQ ID NO: 9. La subunidad de unión a I de E/I(DK+) contiene una extensión C-terminal (C1) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 46, es decir, que contiene un sitio DK. La subunidad de unión a E de E/I(DK+) contiene una extensión C-terminal (C2) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 47, es decir, que contiene un sitio DK.

25

30

La SEQ ID NO: 24 es la secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente E/I(DK-, sin terminal C). La E/I(DK-, sin terminal C) comprende el núcleo de IGF-IR (SEQ ID NO: 2) y el núcleo de EGFR (SEQ ID NO: 39) unidos por un enlazador de glicina-serina (SEQ ID NO: 9). La subunidad de unión a IGF-IR contiene una extensión C-terminal (C1) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, es decir, que contiene un sitio EK en lugar de un sitio DK. La subunidad de unión a EGFR contiene una extensión C-terminal (C2) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 5, es decir, que carece de un sitio DK.

35

La SEQ ID NO: 25 es la secuencia de aminoácidos de la construcción bivalente E/I(2DK-). E/I(2DK-) comprende el núcleo de IGF-IR (SEQ ID NO: 2) y el núcleo de EGFR (SEQ ID NO: 39) unidos por un enlazador de glicina-serina (SEQ ID NO: 9). La subunidad de unión a IGF-IR contiene una extensión C-terminal (C1) que tiene la secuencia de aminoácidos SEQ ID NO: 4, es decir, que contiene un sitio EK en lugar de un sitio DK. La subunidad de unión a EGFR contiene una extensión C-terminal (C2) que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 6, es decir, que contiene un sitio EK en lugar de un sitio DK.

40

45

Ejemplo 2: Expresión y purificación de proteínas de armazón a base de fibronectina

Expresión de moléculas E/I

50

Se expresaron construcciones bivalentes E/I en células de *E. coli* en forma soluble. Se extrajeron los cuerpos de inclusión mediante disrupción celular y centrifugación. Se filtran las proteínas E/I y se capturan usando cromatografía en columna. A continuación, se une la proteína purificada covalentemente a un PEG a través de la química de maleimida en un solo resto de cisteína. Entonces, se purifica el producto PEGilado usando cromatografía de columna y se formula usando filtración de flujo tangencial.

Expresión de moléculas V/I

Para la expresión de construcciones bivalentes V/I, se clona una secuencia de nucleótidos que codifica la construcción en un vector de expresión inducible y se expresa en cuerpos de inclusión intracelulares en células de *E. coli*. Se usan viales de bancos de células generados a partir de un cultivo de una sola colonia sembrada para inocular un cultivo en matraz de agitación como un inóculo para un fermentador a gran escala. Como alternativa, se usa un fermentador de siembra para un cultivo de inóculo, dependiendo del volumen de fermentación final. La fermentación a gran escala contiene una fase de crecimiento para acumular biomasa y una fase de producción para generar las proteínas de armazón a base de fibronectina. Para la recuperación principal, se liberan cuerpos de inclusión intracelulares de las células cosechadas usando un microfluidizador y se extraen por centrifugación, seguido de lavados con tampón y agua.

El proceso de purificación para las construcciones bivalentes usa un resolubilización a base de guanidina-HCl de cuerpos de inclusión, seguida del replegamiento de la proteína. Se filtra la proteína replegada y se carga en una columna de cromatografía de intercambio catiónico. A continuación, se purifica el producto, usando una columna de interacción hidrófoba y se PEGila la combinación de elución resultante mediante la adición del reactivo de PEG para producir la proteína PEGilada.

Luego, se purifica la proteína PEGilada sobre una segunda columna de cromatografía de intercambio de cationes. La elución se concentra hasta una concentración de proteína diana y luego se intercambia en el tampón de formulación usando ultrafiltración/diafiltración (UF/DF). Se filtra el producto de UF/DF usando un filtro de 0,22 µm final. Luego se llena el producto filtrado en viales para producir el producto de fármaco final.

30 Ejemplo 3: Efectos de la concentración de proteínas sobre la estabilidad de las proteínas V/I

Se examinaron los efectos de la concentración de proteína sobre la estabilidad física (agregación) y química (fragmentación) de V/I(DK+) purificada (SEQ ID NO: 22). Se formuló la proteína V/I(DK+) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 % a pH 5,5. La concentración de proteína V/I fue bien de 3 mg/ml o de 5 mg/ml. Se conservaron las muestras a 4 °C durante un período de 12 meses, recogiendo las muestras y analizándose a 1 mes, 6 semanas, 2 meses, 3 meses, 6 meses, 9 meses y 12 meses.

Se mide la cantidad de agregación mediante la evaluación del porcentaje de la proteína total que ha formado agregados (medida como especie de alto peso molecular ("HMW")) a lo largo del tiempo. Se determinó la agregación usando análisis de cromatografía líquida de alta resolución de exclusión por tamaño (SE-HPLC) para evaluar los niveles de HMW a lo largo del tiempo. Se realizó el análisis de SE-HPLC usando una columna Superdex 200 10/300 GL, con una fase móvil de fosfato de potasio 0,2 M, cloruro de sodio 0,15 M, azida de sodio al 0,02 %, pH 6,8. El caudal fue de 0,5 ml/min con detección a 280 nm. Los efectos de la concentración de proteína en la agregación de la proteína V/I en el tiempo (0-12 meses) se representan en la Figura 1. V/I(DK+) se agrega a una velocidad del 0,3 %/mes a una concentración de 3 mg/ml. La concentración de proteína más alta (5 mg/ml) conduce a una velocidad de agregación más rápida.

Se mide la fragmentación mediante la evaluación del porcentaje de proteína total que se ha fragmentado o "recortado" con el tiempo. Se determinaron los niveles de proteína recortada mediante la utilización de cromatografía líquida de alta resolución de fase inversa (RP-HPLC). La RP-HPLC se realizó usando una columna Varian PLRP-S (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm). La separación de las diversas especies se consigue mediante un gradiente compuesto de agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético. El caudal fue de 1,0 ml/min. La detección dual se realizó a 280 nm (para las especies relacionadas con la proteína) y con dispersión de la luz por evaporación (ELS, para las especies relacionadas con PEG). La Figura 2 demuestra que la fragmentación de V/I(DK+) resultó ser menos dependiente de la concentración de proteína que la agregación. La velocidad de fragmentación para V/I(DK+) fue del ~ 0,1 %/mes a 4 °C.

Basándose en estos datos de agregación y fragmentación, se preferiría una formulación de V/I(DK+) que tuviera una concentración de proteína de 3 mg/ml frente a una concentración de 5 mg/ml con el fin de minimizar la agregación y garantizar una estabilidad suficiente durante un año.

Ejemplo 4: Efectos del pH sobre la estabilidad de las proteínas V/I

Se examinaron los efectos del pH sobre la estabilidad física y química de V/I(DK+) purificada (SEQ ID NO 22). Se formuló proteína V/I(DK+) en cloruro de sodio 50 mM, siendo el componente de tamponamiento acetato de sodio 20 mM (para pH 4 y 5) o fosfato de sodio 20 mM (pH 6 y 7), y se conservó a 25 °C.

Las muestras se recogieron una vez por semana durante un período de cuatro semanas, y la evaluación de la agregación se llevó a cabo usando el análisis de SE-HPLC como se describe en el Ejemplo 3. Los efectos del pH sobre la agregación de la proteína V/I(DK+) en el tiempo (0-4 semanas) se representan en la Figura 3. La velocidad de agregación más baja se observó en las muestras que tenían el pH más bajo ensayado (pH 4,0). La velocidad de agregación más alta se observó en las muestras que tenían el pH más alto ensayado (pH 7,0).

Las muestras se recogieron una vez por semana durante un período de cuatro semanas, y la evaluación de la fragmentación se llevó a cabo usando el análisis de SE-HPLC como se describe en el Ejemplo 3. Los efectos del pH sobre la fragmentación de la proteína V/I(DK+) se representan en la Figura 4. Si bien se encontró que un pH bajo (pH 4,0) evita la agregación en el tiempo de la proteína V/I(DK+) (Figura 3), se encontró que un pH bajo conducía a un aumento de la fragmentación de proteínas de la proteína V/I(DK+) (Figura 4).

Para identificar los sitios de recorte de la proteína V/I(DK+) fragmentada, se realizó la cromatografía líquida-espectrometría de masa (LC-MS). Se formuló la proteína V/I(DK+) en acetato de sodio 10 mM, cloruro de sodio 150 mM, pH 5,5, a 5 mg/ml de concentración de proteína. La LC-MS se realizó de acuerdo con el método de RP-HPLC descrito en el Ejemplo 3, seguido por el acoplamiento a un espectrómetro de masas de trampa de iones Thermo LTQ (MS). Se repartió el eluyente de HPLC 1:5 con caudal de 0,2 ml/min desviado para la MS. Se mantuvo la detección en línea a 280 nm. La Figura 5 representa los datos de LC-MS de este experimento, y demuestra que varios restos de aspartato (D) están implicados en la fragmentación, siendo D95 y D200 los sitios predominantes en los que se produce la fragmentación. Cabe señalar que si bien hay varios restos D a lo largo de la proteína V/I(DK+) (por ejemplo, D5, D9, D110), solo los restos D95 y D200 están seguidos inmediatamente por un resto de lisina. "VI des Met" indica que se produce una escisión en el enlace de maleimida de la conjugación de PEG como resultado del proceso térmico.

Basándose en estos experimentos, la agregación y la fragmentación se equilibran mejor mediante la fijación del pH de la formulación a 5,5. Sin embargo, no se podría eliminar ninguna vía de degradación (agregación y fragmentación), apoyándose únicamente en este nivel de pH.

Ejemplo 5: Evaluación de la agregación y la fragmentación de proteínas E/I

Para confirmar que los problemas de inestabilidad de agregación y fragmentación observados en V/I(DK+) (SEQ ID NO: 22) eran problemas comunes a otras construcciones bivalentes estructuralmente relacionadas, también se evaluaron las propiedades de agregación y fragmentación de E/I(DK+) (SEQ ID NO : 23) a varios niveles de pH.

Se formuló E/I(DK+) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 % y a un pH de 4,0, 4,5 o 5,5. Se formuló E/I(DK+) en la formulación deseada a través de filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana MWCO de 30 kD. Se intercambiaron al menos seis dia-volúmenes de tampón para lograr la formulación final. La concentración de la proteína resultante se verificó mediante A280 y se ajustó a 5 mg/ml con tampón de formulación adicional. Se esterilizó por filtración la E/I(DK+) formulada en una campana de flujo laminar, y se usó para llenar viales de vidrio esterilizados con el fin de realizar un seguimiento de la estabilidad. Los viales se taparon y se engarzaron, tras lo que se colocaron en incubadoras de temperatura controlada a 4, 25 y 37 °C.

Se evaluó la velocidad de agregación de E/I(DK+) mediante la realización de análisis de SE-HPLC. El SE-HPLC se realizó usando una columna de HPLC Shodex KW404-4F (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm) y una fase móvil compuesta de ácido succínico 10 mM/sorbitol al 3 %/arginina 0,4 M a pH 5,5. El caudal era de 0,35 ml/min, y la detección se realizó a 280 nm. La Figura 6 muestra que, al igual que V/I(DK+), la velocidad de agregación de E/I(DK+) fue mayor para las muestras conservadas a niveles de pH más altos, a 25 °C, que para las muestras conservadas a niveles de pH inferiores a 25 °C. También se observaron las mismas tendencias de los datos para las muestras sometidas a 37 °C.

También se evaluó el efecto de la concentración de proteína sobre la velocidad de agregación de E/I(DK+). Al igual que para V/I(DK+), la Tabla 2 ilustra que las concentraciones más altas (7 mg/ml) de E/I(DK+) se asociaron a un mayor porcentaje de formación de agregados (menor porcentaje de monómeros) después de 4 semanas. La Tabla 2 también demuestra que, mediante la reducción del pH junto con la concentración de proteínas, se puede reducir todavía más el porcentaje de agregación.

Tabla 2

Concentración de proteína	pH de la formulación	% de monómero
7,5 mg/ml	5,5	94,30 %
5,0 mg/ml	5,5	97,70 %
5,0 mg/ml	4,0	99,20 %

Se evaluó la fragmentación de la E/I(DK+) mediante la realización del análisis de RP-HPLC como se describe en el Ejemplo 3. La Figura 7 muestra que, al igual que V/I(DK+), la velocidad de fragmentación de E/I(DK+) fue más alta para las muestras conservadas a niveles de pH inferiores a 25 °C que para las muestras conservadas a niveles de pH superiores a 25 °C. También se observaron las mismas tendencias de los datos para las muestras sometidas a 37 °C.

Para identificar los sitios de recorte de la proteína E/I(DK+) fragmentada, se realizó la LC-MS como se describe en el Ejemplo 4. Se formuló la E/I(DK+) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 4,0, a 5 mg/ml de concentración de proteína, y se mantuvo a 25 °C para inducir el estrés de la proteína. La Figura 8 representa los datos de LC-MS de este experimento, y demuestra que varios restos de aspartato (D) están implicados en la fragmentación, incluyendo D95 y D218 (la posición homóloga a D200 en V/I(DK+)). La fragmentación también se observó en D199. El sitio D199 es específico de estas moléculas de E/I, y no se encuentra en las moléculas V/I, ya que se encuentra dentro del bucle de unión FG de la región de unión a EGFR.

15 **Ejemplo 6: Evaluación de la agregación y de la fragmentación en variantes de E/I menos DK**

Se formularon diversos aglutinantes de E/I (SEQ ID NO: 23-25), y se comparó su estabilidad física (agregación) y química (fragmentación) entre sí en condiciones idénticas (véase la Tabla 1). Basándose en la caracterización de los sitios recortados D95 y D218 observados en E/I(DK+) (Ejemplo 5), y basándose en el hecho de que estos sitios recortados DK están situados en las colas C-terminales estructuralmente no esenciales, se generaron dos construcciones E/I diferentes en las que los sitios DK de cola C-terminal se retiraron o se sustituyeron.

La molécula E/I(DK+) (SEQ ID NO: 23) es el aglutinante de E/I de control que contiene una cola C-terminal que comprende sitios DK (D95 y D218) detrás de cada uno de los dos dominios de unión. La estabilidad física y química de esta molécula se caracterizó en el Ejemplo 5. La molécula de E/I(DK-, sin extremo C-terminal) (SEC ID N°: 24) no contiene ningún sitio DK. En esta molécula, el aspartato de la posición 95 se mutó a un ácido glutámico, y la cola EIDKPCQ (SEQ ID NO: 47) se reemplazó por una cola EGSGC (SEQ ID NO: 5). La molécula de E/I(2DK-) (SEQ ID NO: 25) tampoco contenía sitios DK. En esta molécula, los aspartatos de las posiciones 95 y 218 se han reemplazado por ácidos glutámicos. V/I(DK+) se incluyó en este estudio como control.

Se formularon las proteínas E/I (SEQ ID NO: 23-25) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 % a pH 4,0. Además, se formularon E/I(DK+) (SEQ ID NO: 23) y V/I(DK+) (SEQ ID NO: 22) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 % a pH 5,5. No se encontró que el tensioactivo fuera necesario basándose en la exploración de tensioactivo preliminar. Se formuló E/I(DK+) en la formulación deseada a través de filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana MWCO de 30 kD. Se intercambiaron al menos seis día-volúmenes de tampón para lograr la formulación final. La concentración de la proteína resultante se verificó mediante A280 y se ajustó a 5 mg/ml con tampón de formulación adicional. Se esterilizó por filtración cada construcción bivalente formulada en una campana de flujo laminar, y se usó para llenar viales de vidrio esterilizados con el fin de realizar un seguimiento de la estabilidad. Los viales se taparon y se engarzaron, tras lo que se colocaron en incubadoras de temperatura controlada a 4, 25 y 37 °C.

La velocidad de agregación se determinó para las diferentes moléculas de E/I mediante la realización de SE-HPLC como se describe de acuerdo con el Ejemplo 5, y los resultados de este experimento se ilustran en la Figura 9. Como era de esperar, la velocidad de agregación es significativamente mayor a pH 5,5 que a pH 4,0 para E/I(DK+) a 25 °C. Basándose en las pendientes observadas en la Figura 9, la velocidad de agregación para E/I(DK+) es aproximadamente 7 veces superior a pH 5,5 que a pH 4,0 a 25 °C. Para las dos moléculas de E/I que carecen de DK, la velocidad de agregación no se vio afectada a un pH de 4,0. E/I(DK+) y V/I(DK+) mostraron velocidades de agregación similares a pH 5,5.

La velocidad de fragmentación para las diferentes moléculas de E/I se determinó mediante la realización de RP-HPLC de acuerdo con el Ejemplo 3, y los resultados de este experimento se ilustran en la Figura 10. En términos de recorte, la Figura 10 muestra velocidades de recorte inferiores a pH 5,5 que a pH 4,0 para E/I(DK+) a 25 °C. Entre las moléculas representadas en la Figura 10, la velocidad de recorte más alta se observó en E/I(DK+) a pH 4,0, que se minimizó significativamente al aumentar el pH de la formulación hasta pH 5,5. Sin embargo, como se ha descrito anteriormente, la velocidad de agregación fue la más alta a pH 5,5 para esta molécula. Para las otras dos moléculas de E/I que carecían de sitios DK, las velocidades de recorte a pH 4,0 se redujeron en aproximadamente 3 veces en comparación con E/I(DK+) al mismo pH. V/I(DK+) presentó un mayor grado de fragmentación en comparación con E/I(DK+) al mismo pH (pH 5,5), lo que indica que, aunque las moléculas de V/I(DK+) y E/I(DK+) sean similares, la molécula de V/I(DK+) es más susceptible a la fragmentación.

La caracterización de los sitios recortados para E/I(DK-, sin extremo C-terminal), en comparación con los sitios recortados para E/I(DK+), se realizó usando LC-MS como se describe en el Ejemplo 4. Se formuló cada uno de los dos aglutinantes de E/I diferentes en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 % sorbitol, pH 4,0, a concentración de proteína de 5 mg/ml y se mantuvieron a 25 °C para inducir el estrés de la proteína. La Figura 11 representa los datos de LC-MS de este experimento, y demuestra que los perfiles de fragmentación difieren entre los dos aglutinantes de E/I diferentes. Los restos de aspartato (D) predominantes que participan en la fragmentación de E/I(DK+) fueron D95, D218 y D199. Por el contrario, los restos de aspartato predominantes implicados en la fragmentación de

E/I(DK-, sin extremo C-terminal) fueron D199, D82 y D193. Sin embargo, como se ilustra en la siguiente Tabla 3, el porcentaje de recortes totales fue casi la mitad en E/I (DK-, sin extremo C-terminal) después de 4 semanas en comparación con E/I(DK+) después de este mismo periodo (3,8 % frente al 7,5 %). Estos resultados indican que E/I(DK-, sin extremo C-terminal) se asocia a la fragmentación reducida en comparación con E/I(DK+).

La caracterización de los sitios recortados en E/I(2DK-) se realizó mediante LC-MS como se describe en el Ejemplo 4. Se formuló E/I(2DK-) en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, pH 4,0, a concentración de proteína de 5 mg/ml y se mantuvo a 25 °C para inducir la proteína al estrés. La Figura 12 representa los datos de LC-MS de este experimento, y demuestra que, al igual que E/I(DK, sin extremo C-terminal), los restos de aspartato predominantes implicados en la fragmentación de E/I(2DK-) fueron D199, D82 y D193. Además, como se ilustra en la siguiente Tabla 3, el porcentaje de recortes totales fue más de la mitad en E/I(2DK-) después de 4 semanas que en E/I(DK+) después de este mismo periodo (3,5 % frente al 7,5 %). Estos resultados indican que E/I(2DK-) se asocia a una fragmentación reducida en comparación con E/I(DK+).

Tabla 3. Cantidad y ubicación de la fragmentación para diversos aglutinantes de E/I después de cuatro semanas de conservación a 25 °C.

Construcción	SEQ ID NO	Sitios de recorte identificados (para la intensidad)	% de recortes totales a las 4 semanas (valor a T = 0)
E/I(DK+)	23	D218K D199G D95K	7,5 % (0,5 %)
E/I(DK-, sin extremo C-terminal)	24	D199G D193Y D82Y	3,8 % (1,4 %)
E/I(2DK-)	25	D199G D193Y D82Y	3,5 % (0,9 %)

Como se ha descrito anteriormente, el sitio D199 está situado dentro del bucle de unión FG de la región de unión a EGFR. Como tal, probablemente, D199 es necesario para la función de unión y será difícil retirarlo de las moléculas E/I(2DK-) o E/I(DK-, extremo C-terminal).

El mecanismo exacto de recortes en los sitios de ácido aspártico observados en V/I(DK+) y E/I(DK+) no está claro. Basándose en los valores de pKa aparentes de tres ácidos aspárticos en el glucagón medidos mediante métodos de RMN, Joshi *et al.* (*Journal of Pharmaceutical Sciences*, 94 (9), 2005) propusieron varios mecanismos para la reacción de escisión en los sitios de ácido aspártico. Sin desear quedar ligados a teoría alguna, es posible que algunos de los mecanismos propuestos impliquen la ciclación de la cadena lateral de ácido aspártico para formar un anillo de cinco miembros, seguida del ataque nucleófilo sobre el carbonilo del péptido que luego conducirá a la escisión del enlace peptídico. Mediante la sustitución del ácido aspártico con ácido glutámico, es posible que la formación del anillo no se produzca tan fácilmente debido al impedimento estérico, evitando así la escisión del enlace peptídico en esa ubicación.

Ejemplo 7: Evaluación de la agregación y la fragmentación en variantes V/I menos DK

Se ha comparado la estabilidad de dos proteínas de armazón a base de fibronectina VEGFR-IGFR (VI). La primera construcción es VI(DK+) (SEQ ID NO: 56) y la segunda construcción es VI(DK-) (SEQ ID NO: 57), que contiene la sustitución de ácido aspártico con ácido glutámico en las posiciones 94 y 199 de la SEQ ID NO: 56.

Ambas moléculas se formularon a concentración de proteína de 3 mg/ml, en ácido succínico 10 mM, sorbitol al 5 %, a pH 4,0, 4,5 y 5,5. Se realizó la estabilidad limitada de estas formulaciones a 4 y 25 °C durante un máximo de dos meses, con puntos temporales periódicos para el análisis de SE-HPLC y RP-HPLC. Además, se realizó la caracterización de LC-MS en las muestras de 2 meses a 25 °C para determinar los sitios recortados exactos en ambas proteínas.

Efectos del pH sobre la velocidad de agregación en las proteínas de armazón a base de fibronectina VI

Basándose en la experiencia con las últimas proteínas de armazón a base de fibronectina, se ha reconocido que las formulaciones de pH bajo proporcionan la mejor estabilidad biofísica para estas moléculas (es decir, la menor agregación). En el estudio actual, las dos construcciones VI demuestran la misma tendencia que la observada anteriormente, como se ilustra en la Figura 13. Aunque los niveles iniciales de los agregados son ligeramente diferentes entre las dos moléculas, las velocidades observadas durante el periodo de estabilidad son muy similares

a cada pH dado, mostrando las velocidades de agregación para ambas moléculas el mismo orden, pH 5,5>>pH 4,5>pH 4,0.

Efectos del pH sobre la velocidad de recorte en las proteínas de armazón a base de fibronectina VI

Basándose en la experiencia con las últimas proteínas de armazón a base de fibronectina, se ha reconocido que las formulaciones de pH bajo proporcionan al menos estabilidad química a estas proteínas si existen sitios susceptibles al recorte en la secuencia proteica. En los estudios de estabilidad pasados realizados para VI(DK+) (SEQ ID NO: 56), se han identificado numerosos sitios de recorte, siendo los más graves los recortes en D94 y D199. En el estudio actual, las dos construcciones VI demuestran la misma tendencia que se había observado antes, como se ilustra en la Figura 14, siendo los efectos del pH sobre la velocidad de recorte peores para VI(DK+) que para VI(DK-). Mientras que la velocidad de recorte sigue la tendencia general de pH 4,0>4,5 pH>pH 5,5 para ambas moléculas, VI(DK-) presenta una diferencia mucho menor en su velocidad de recorte a los tres valores de pH.

A partir de las tendencias de los datos de estabilidad mostradas en las Figuras 13 y 14, la velocidad de recorte por semana para VI(DK+) aumenta en 3,3 veces cuando el pH de la formulación se reduce de 5,5 a 4,0, mientras que para la molécula VI(DK-), esta velocidad se aumenta en 1,6 veces, debido a la eliminación de los principales sitios de recorte en dos posiciones. Por lo tanto, con estas sustituciones de aminoácidos, la velocidad de recorte de la proteína de armazón a base de fibronectina VI ha disminuido en aproximadamente un 50 % durante el mismo período de estabilidad cuando se usa la formulación de pH 4. Por otra parte, las velocidades de agregación por semana para VI(DK+) y VI(DK-) se reducen en 86 y 216 veces, respectivamente, cuando el pH de la formulación se reduce de 5,5 a 4,0. El efecto del pH sobre la velocidad de agregación, por lo tanto, es más drástico que en la velocidad de recorte de las proteínas de armazón a base de fibronectina VI.

Identificación de sitios recortados por LC-MS

Se ha realizado la caracterización estructural de los sitios recortados observados en VI(DK+) y VI(DK-) mediante LC-MS. En la Figura 15, se puede observar el cromatograma de RP-HPLC superpuesto de la región de recorte del punto temporal de 2 meses a 25 °C, y la identificación de los picos se resume en la Tabla 4.

Tabla 4. Resumen de la identificación de los picos mediante espectrometría de masas. Los restos resaltados en rojo indican los ácidos aspárticos que existen en la secuencia VI original que se han reemplazado por los ácidos glutámicos en la construcción VI(DK-).

n.º de pico	Estructura de recortes de VI(DK+)	% del área bajo el pico entre todos los recortes de VI(DK+)	Estructura de recortes de VI(DK-)	% del área bajo el pico entre todos los recortes de VI(DK-)
1	G1-D105	11,6	G1-D105	37,8
2	G1-D81	3,1	G1-D81	7,9
3	G1-D94	24,7	G1-R80	36,3
4	G1-D199	43,0	G1-D179	14,1
5	G1-K200	3,7	T15-D81	3,9
6	(G1-D199)-18	5,1	n/d	n/d
7	(G1-D199)-35	3,2	n/d	n/d
8	D109-Q203	1,9	n/d	n/d

Aunque algunos recortes permanecen idénticos entre las dos moléculas, se han eliminado los principales sitios de recorte en D94 y D199 de VI(DK-), llevando el nivel de recortes totales hasta el 6,9 % después de 2 meses de estrés a 25 °C. Por otro lado, los recortes totales de VI(DK+) permanecieron altos al 16,0 % en el mismo período de estabilidad. También se han identificado otros recortes a bajo nivel en VI(DK-), que no se encuentran en VI(DK+).

Tabla 5. Comparación de las velocidades de recorte en VI(DK+) y VI(DK-).

pH de la formulación	Velocidad para VI(DK+) (% por semana)	Velocidad para VI(DK-) (% por semana)
4,0	1,6650	0,6350
4,5	1,0375	0,4330
5,5	0,4975	0,3925

La velocidad de recorte de VI(DK+) a pH 4,0 fue 1,6 veces y 3,3 veces más rápida que la velocidad de recorte de VI(DK+) a pH 4,5 y 5,5, respectivamente. La velocidad de recorte de VI(DK-) a pH 4,0 fue 1,5 veces y 1,6 veces más rápida que la velocidad de recorte de VI(DK-) a pH 4,5 y 5,5, respectivamente.

Tabla 6. Comparación de la velocidad de agregación de VI(DK+) y VI(DK-).

pH de la formulación	Velocidad para VI(DK+) (% por semana)	Velocidad para VI(DK-) (% por semana)
4,0	0,0225	-0,0075
4,5	0,4450	0,4050
1,9400	1,9400	1,6200

5 Las velocidades de agregación de VI(DK+) a pH 4,5 y 5,0 fueron 4,4 veces y 86 veces más rápidas, respectivamente, que la velocidad de agregación de VI(DK+) a pH 4,0. Las velocidades de agregación de VI(DK-) a pH 4,5 y 5,0 fueron 4,0 veces y 216 veces más rápidas, respectivamente, que la velocidad de agregación de VI(DK-) a pH 4,0.

10 Los resultados de estabilidad obtenidos en dos versiones de las proteínas de armazón a base de fibronectina VI demuestran la eficacia y los beneficios de las sustituciones selectivas de ácidos aspárticos problemáticos a ácidos glutámicos, con el fin de eliminar la degradación química específica en la proteína de armazón a base de fibronectina. Con la degradación química principal eliminada a través de dicha metodología, ahora se puede obtener una mejor estabilidad biofísica en las proteínas de armazón a base de fibronectina a través de la formulación al pH inferior. Los resultados del presente estudio con VI, así como los obtenidos anteriormente a partir de las proteínas de armazón a base de fibronectina bifuncionales, demuestran la necesidad de eliminar determinados restos de ácido aspártico conocidos por ser propensos al recorte, lo que a su vez permite el uso de formulaciones a pH ácido para maximizar la estabilidad biofísica en las proteínas de armazón a base de fibronectina.

Materiales y métodos

20 *Formulación:* cada molécula se formuló en las formulaciones deseadas a través de filtración de flujo tangencial (TFF) usando una membrana MWCO de 30 kD. Se intercambiaron al menos seis dia-volúmenes de tampón para lograr la formulación final. La concentración de la proteína resultante se verificó por A280 y se ajustó a 3 mg/ml con tampón de formulación adicional.

25 Llenado y estabilidad de los viales: cada proteína formulada se esterilizó por filtración en una campana de flujo laminar, y se introdujo en viales de vidrio esterilizados para el seguimiento de la estabilidad. Los viales se taparon y se engarzaron, tras lo que se colocaron en incubadoras de temperatura controlada a 4 y 25 °C.

Métodos analíticos:

30 *HPLC de exclusión por tamaño (SE-HPLC):* el análisis se realizó usando una columna de HPLC Shodex KW404-4F (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm) y una fase móvil compuesta de ácido succínico 10 mM/sorbitol al 3 %/arginina 0,4 M a pH 5,5. El caudal fue de 0,35 ml/min y la detección se realizó a 280 nm.

35 *HPLC de fase inversa (RP-HPLC):* el análisis se realizó usando una columna de PLRP-S Varian (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm). La separación de las diversas especies se realiza mediante un gradiente compuesto de agua/acetonitrilo/ácido trifluoroacético. El caudal fue de 1,0 ml/min. La detección dual se realizó a 280 nm (para las especies relacionadas con la proteína) y con la dispersión de la luz por evaporación (ELS, para las especies relacionadas con PEG).

40 *LC-MS:* la caracterización de los sitios recortados se realizó usando una columna C18 Jupiter (4,6 x 250 mm, tamaño de poro de 300 Å, tamaño de partícula de 5 µm) acoplada a un espectrómetro de masas de trampa de iones Thermo LTQ (MS). El eluyente de HPLC se repartió a 1:5 con caudal de 0,2 ml/min desviado para la MS. Se mantuvo la detección en línea a 280 nm.

REIVINDICACIONES

- 5 1. Un dímero de proteínas a base de fibronectina que comprende un primer décimo dominio de fibronectina de tipo III (¹⁰F_n3) y un segundo dominio ¹⁰F_n3, en donde cada uno de entre el primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3:
- 10 (i) comprende un bucle AB, un bucle BC, un bucle CD, un bucle DE, un bucle EF y un bucle FG, teniendo al menos un bucle seleccionado entre el bucle BC, DE y FG una secuencia de aminoácidos modificada con respecto a la secuencia del bucle correspondiente del dominio ¹⁰F_n3 humano que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 1;
- (ii) comprende una secuencia de aminoácidos que tiene al menos el 60 % de identidad con SEQ ID NO: 1 y se une a una molécula diana con una KD inferior a 100 nM; y
- 15 (iii) comprende una cola C-terminal que comprende la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 4 y no contiene una secuencia DK.
2. El dímero de proteínas de la reivindicación 1, en el que la cola C-terminal de uno o ambos del primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3 comprende además un resto de cisteína.
- 20 3. El dímero de proteínas de la reivindicación 1 o de la reivindicación 2, en el que la cola C-terminal de uno o ambos del primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3 comprende una secuencia de aminoácidos seleccionada, de manera independiente, del grupo que consiste en SEQ ID NO: 6, SEQ ID NO: 32, SEQ ID NO: 33, SEQ ID NO: 34 y SEQ ID NO: 35.
- 25 4. El dímero de proteínas de una cualquiera de las realizaciones 1-3, en el que uno o ambos del primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3 comprende/n además una extensión N-terminal que comprende de 1 a 10 aminoácidos, tal como una secuencia seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, G y cualquiera de SEQ ID NO: 19-21 y 26-31.
- 30 5. El dímero de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-4, en el que el primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3 se unen a diferentes dianas.
6. El dímero de proteínas de la reivindicación 5, en el que el primer dominio ¹⁰F_n3 y el segundo dominio ¹⁰F_n3 están conectados por un enlazador polipeptídico que comprende de 1 a 30 aminoácidos, de modo que un enlazador polipeptídico se selecciona del grupo que consiste en: un enlazador a base de glicina-serina, un enlazador a base de glicina-prolina, un enlazador de prolina-alanina y un enlazador a base de Fn.
- 35 7. El dímero de proteínas de la reivindicación 5 o de la reivindicación 6 que comprende:
- (i) un dominio ¹⁰F_n3 que se une a IGF-IR y otro dominio ¹⁰F_n3 que se une a EGFR, o
- 40 (ii) un dominio ¹⁰F_n3 que se une a VEGFR2 y otro dominio ¹⁰F_n3 que se une a IGF-IR.
8. El dímero de proteínas de la reivindicación 7, en el que el dominio ¹⁰F_n3 que se une a IGF-IR comprende:
- 45 (i) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2;
- (ii) una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 2;
- (iii) la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 2.
- 50 9. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(ii), en el que el dominio ¹⁰F_n3 que se une a IGF-IR comprende un bucle BC que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 40, un bucle DE que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 41, un bucle FG que tiene la secuencia de aminoácidos de SEQ ID NO: 42.
10. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(i), en donde el dímero de proteínas comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25.
- 55 11. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(i), en donde el dímero de proteínas comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 85 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25.
- 60 12. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(i), en donde el dímero de proteínas comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 90 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25.
13. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(i), en donde el dímero de proteínas comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 95 % idéntica a la secuencia de aminoácidos expuesta en SEQ ID NO: 25.
- 65 14. El dímero de proteínas de la reivindicación 7(i), en donde el dímero de proteínas comprende la secuencia de

aminoácidos de SEQ ID NO: 25.

- 5 15. El dímero de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-14, en donde el dímero de proteínas tiene menos del 4 % de fragmentación durante la conservación en solución a pH 4,0 durante al menos 4 semanas.
16. El dímero de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-15, que comprende además uno o más restos farmacocinéticos (PK) seleccionados entre: un resto de polioxialquileo, una proteína de unión a la albúmina de suero humana, ácido siálico, albúmina de suero humana, transferrina y un fragmento Fc.
- 10 17. Una composición farmacéutica que comprende el dímero de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.
- 15 18. La composición de la reivindicación 17 para su uso en un método de tratamiento de un trastorno hiperproliferativo.
19. Un ácido nucleico que codifica el dímero de proteínas de una cualquiera de las reivindicaciones 1-16.

FIGURA 1

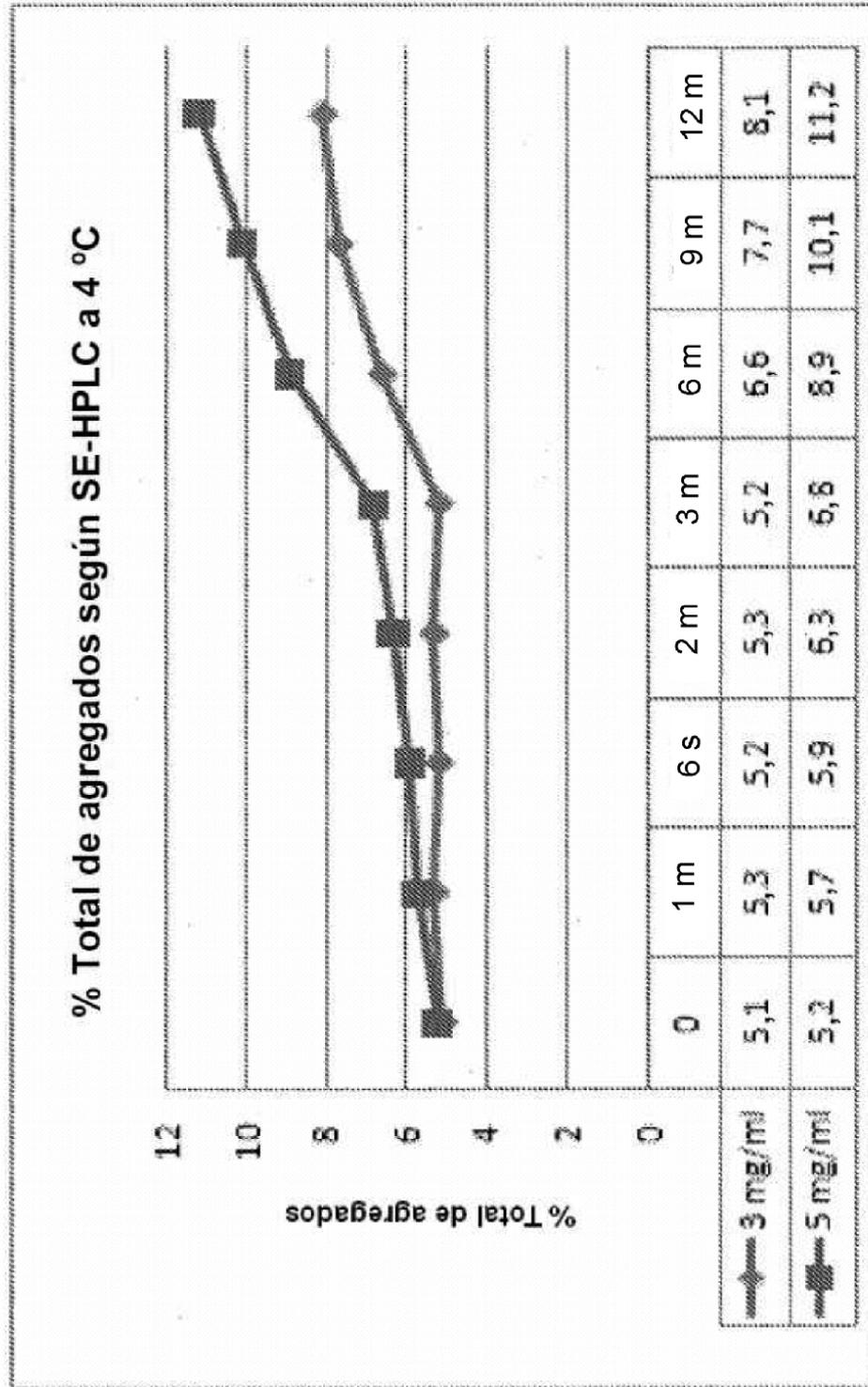


FIGURA 2

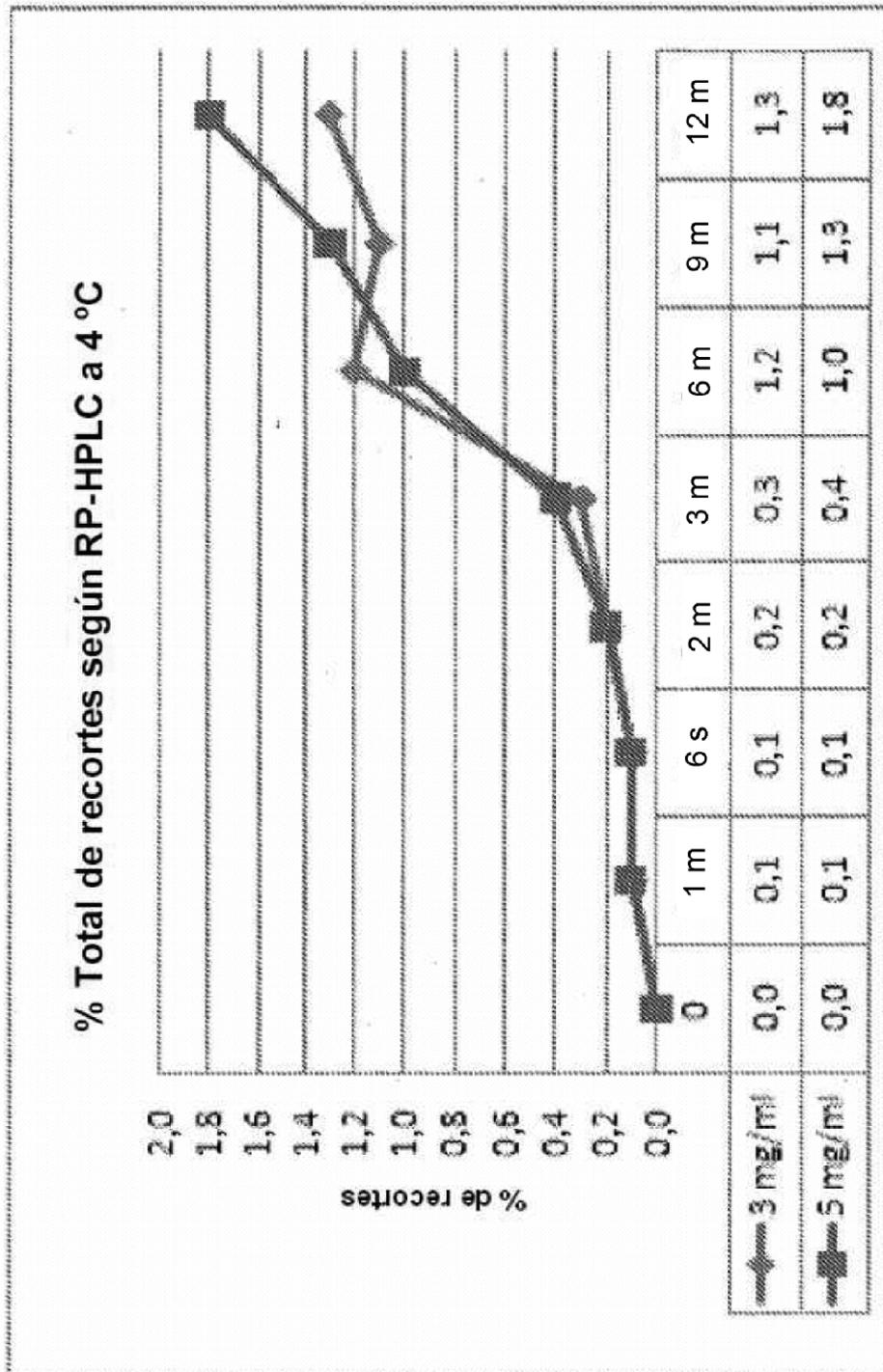


FIGURA 3
% de agregados según SE-HPLC a 25 °C

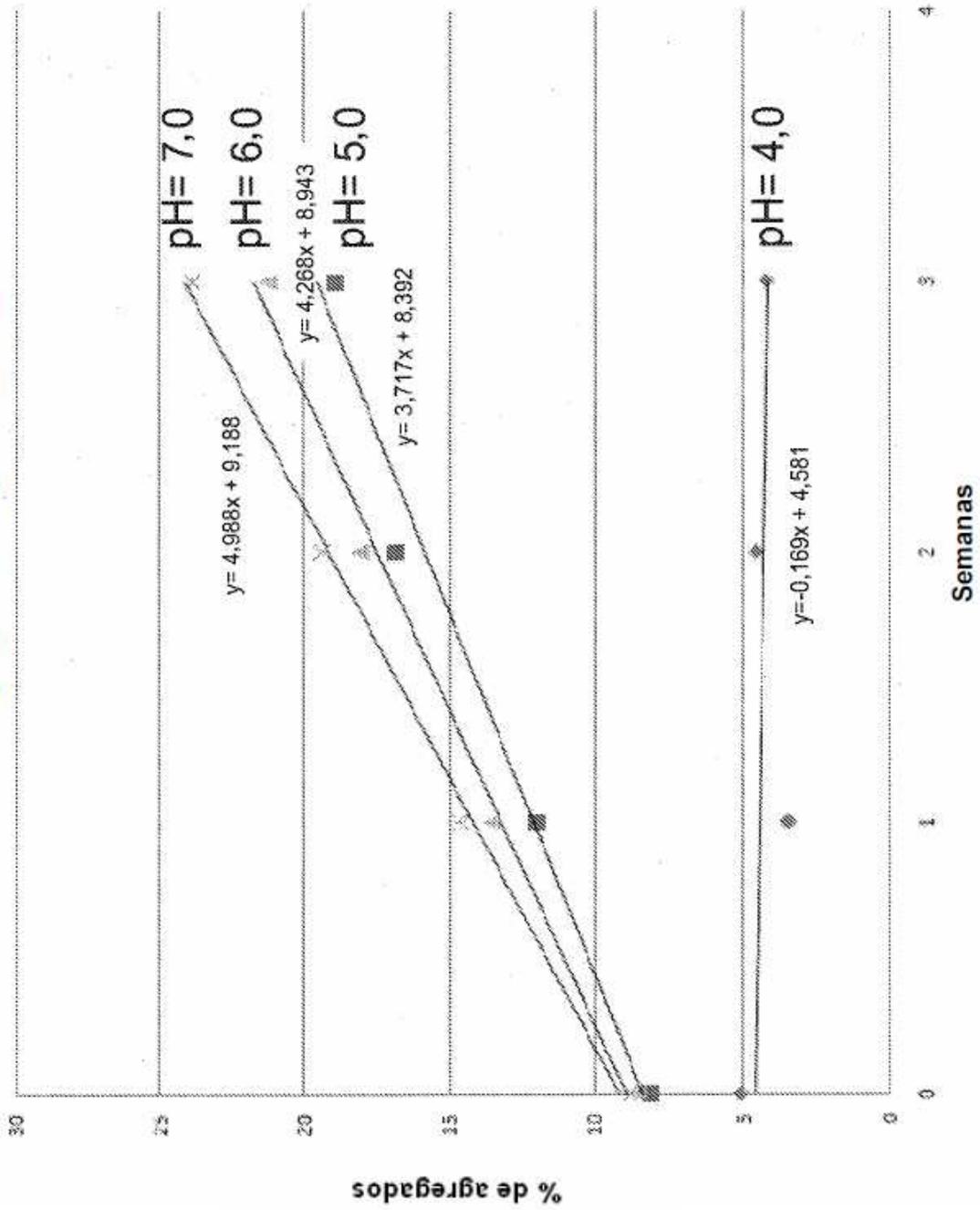


FIGURA 4

% Total de recortes según SE-HPLC a 25 °C

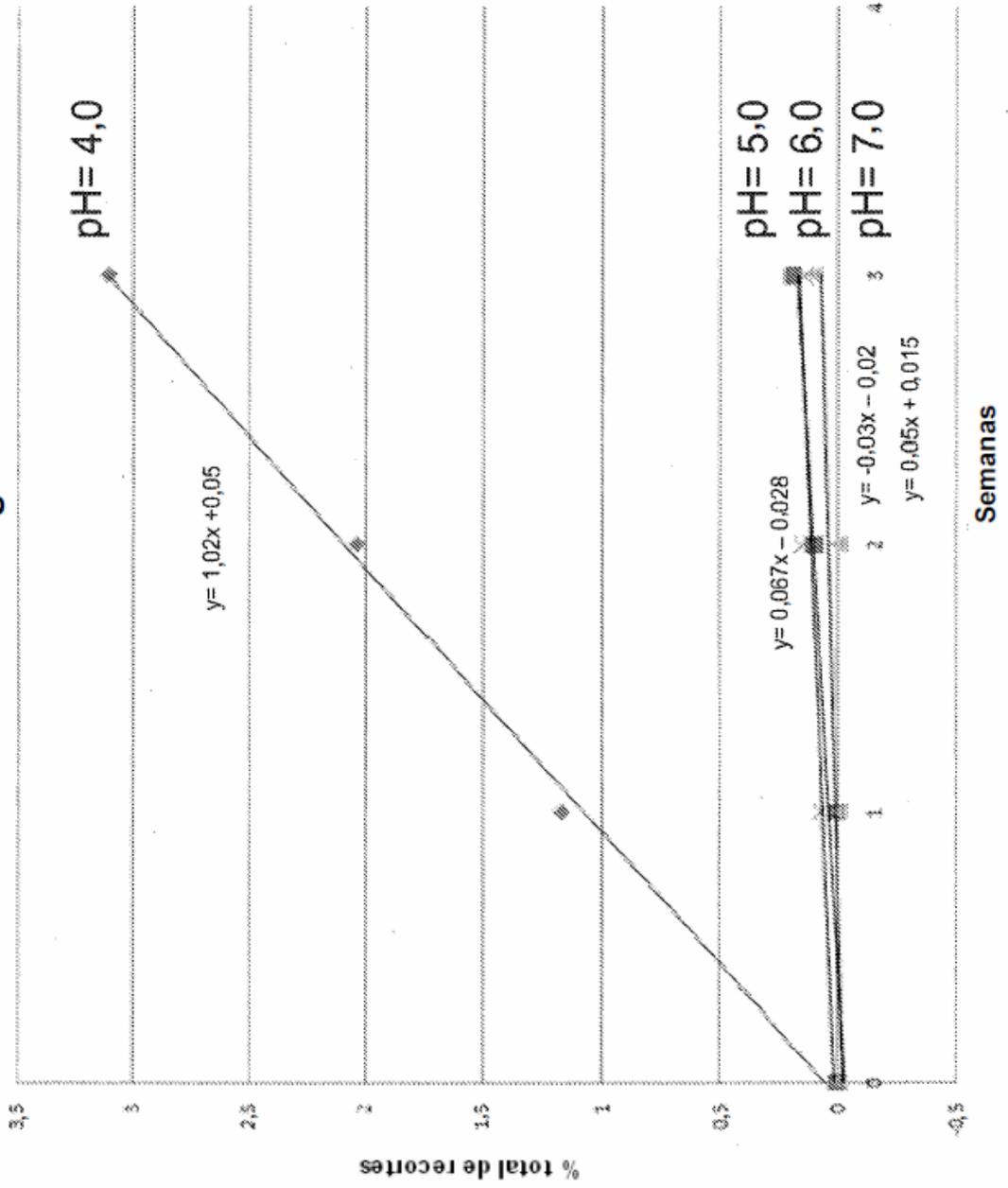
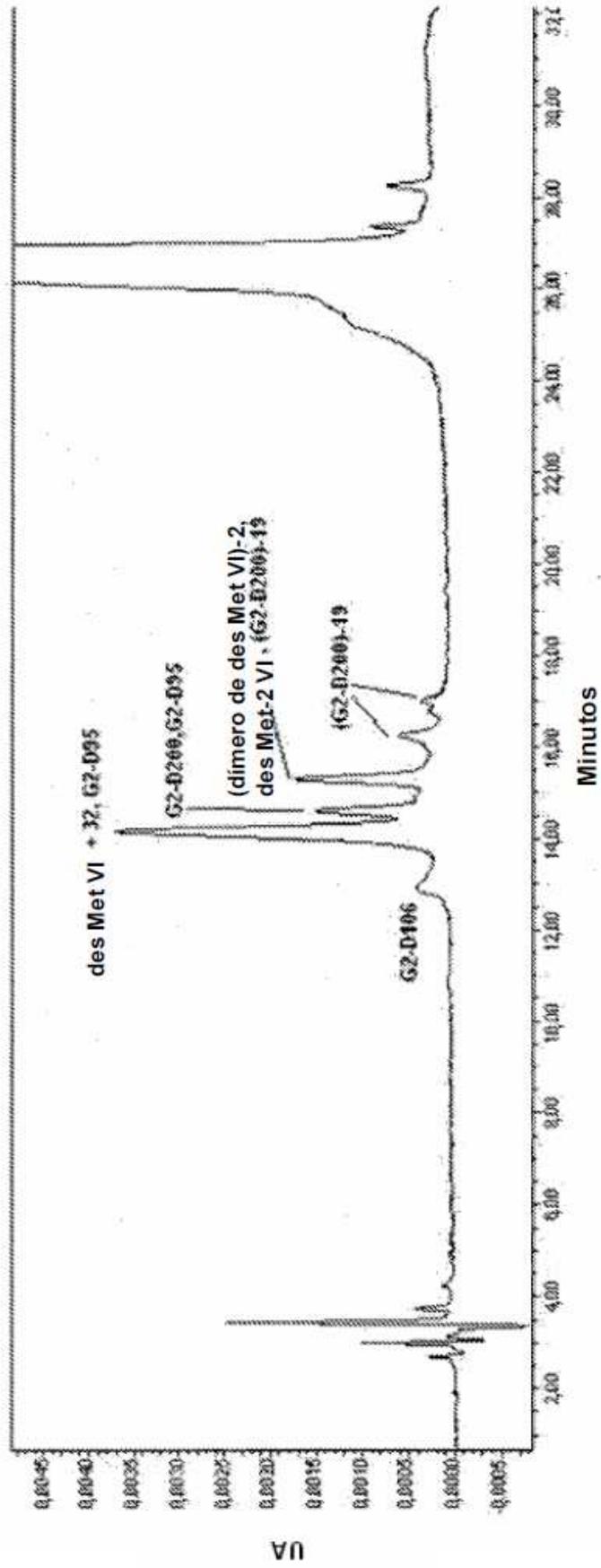


FIGURA 5



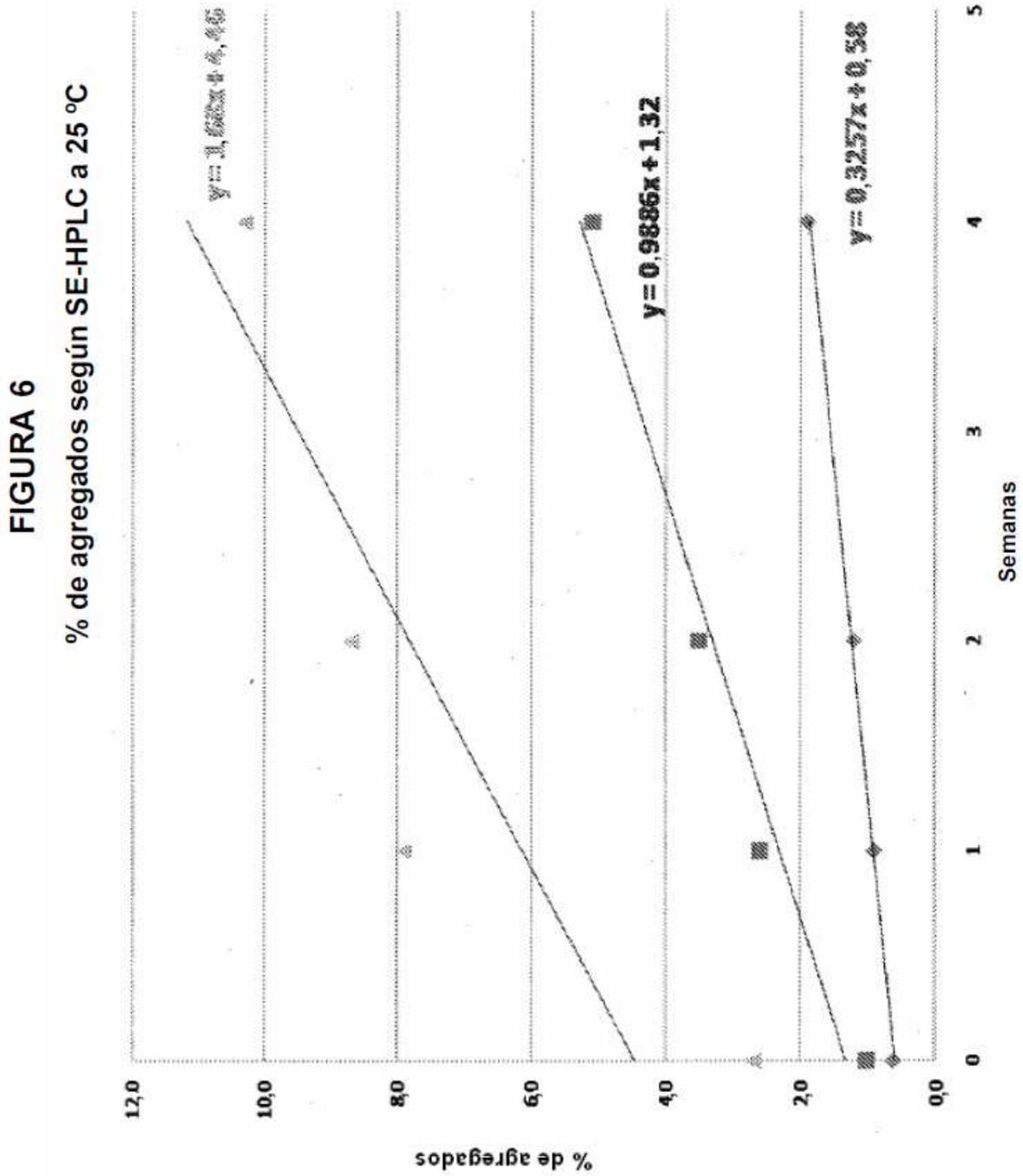


FIGURA 7
 % de recortes totales según RP-HPLC a 25 °C

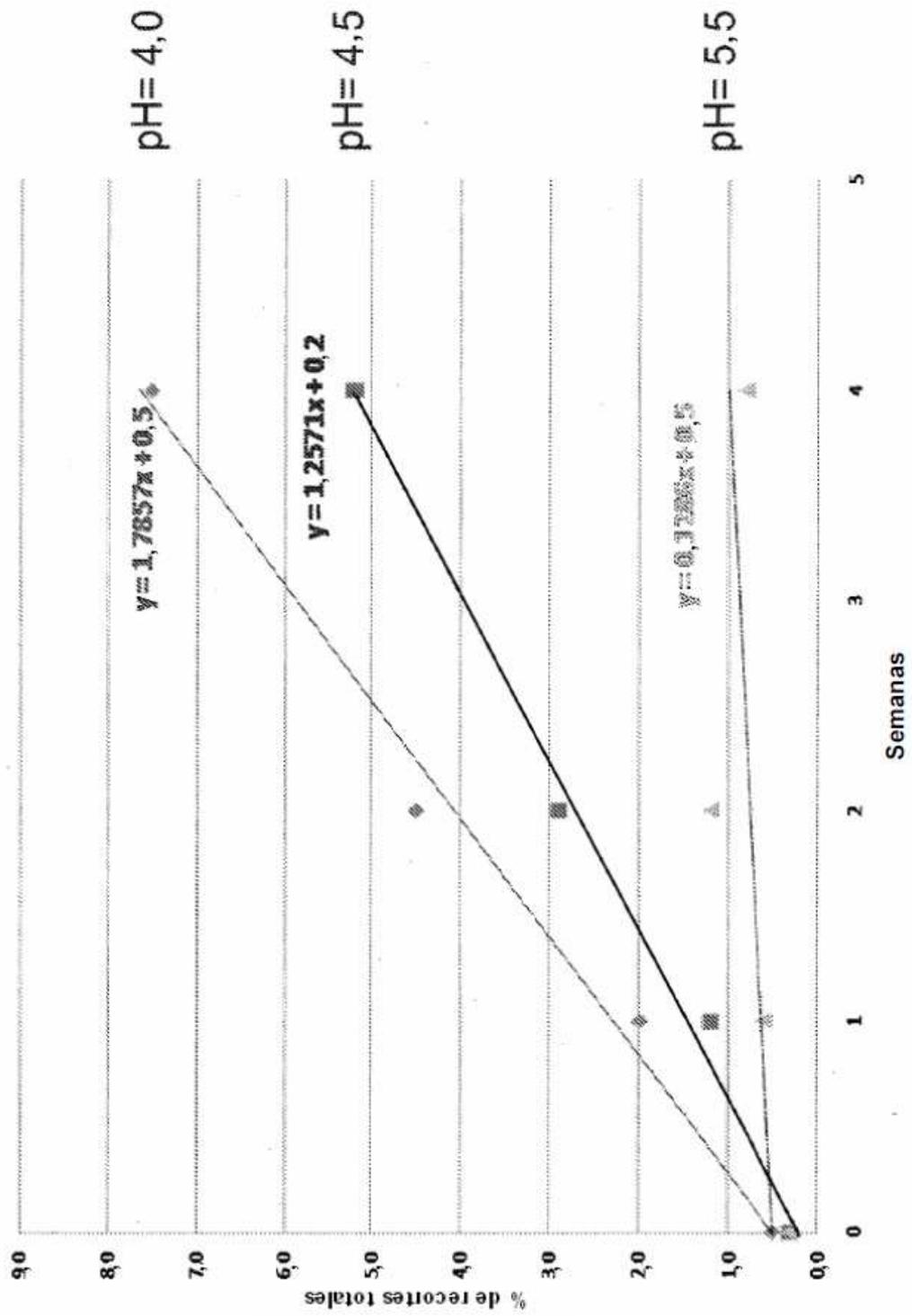


FIGURA 8

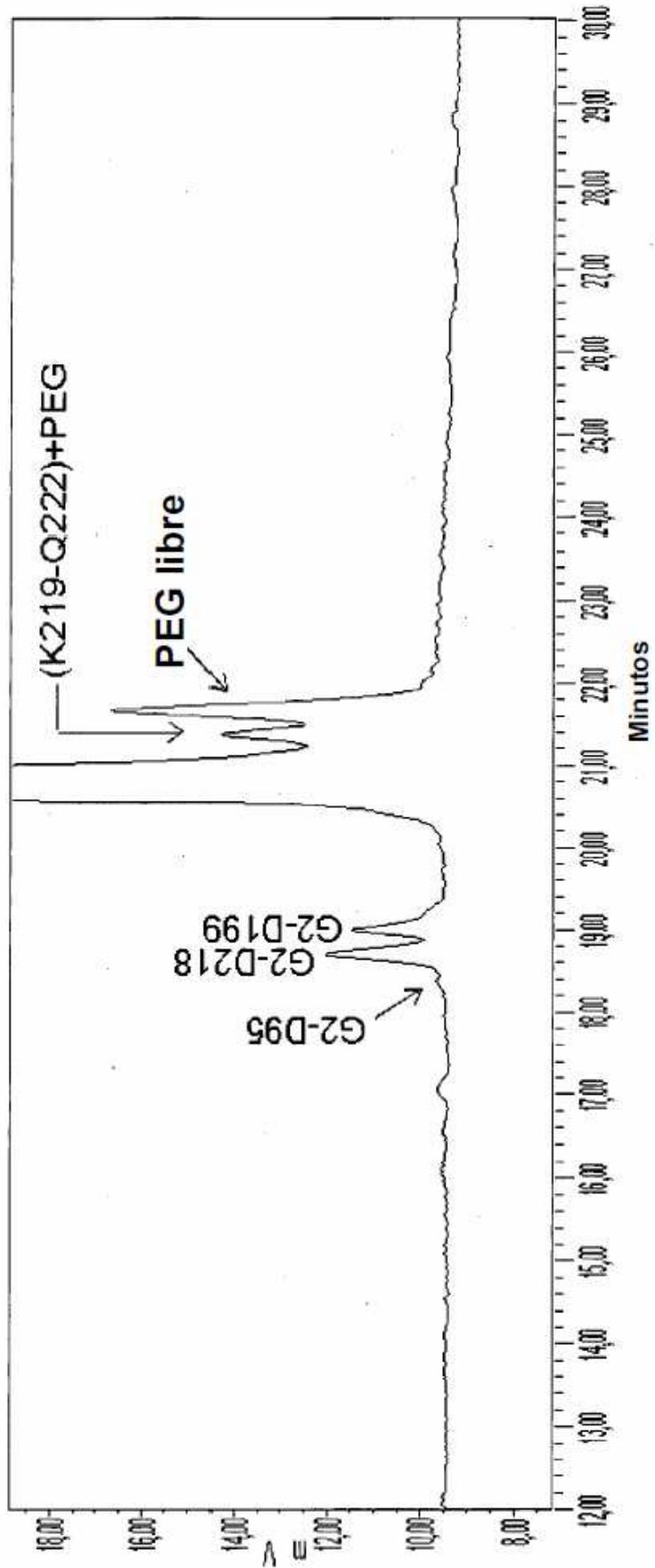


FIGURA 9

% de agregados según SE-HPLC a 25 °C

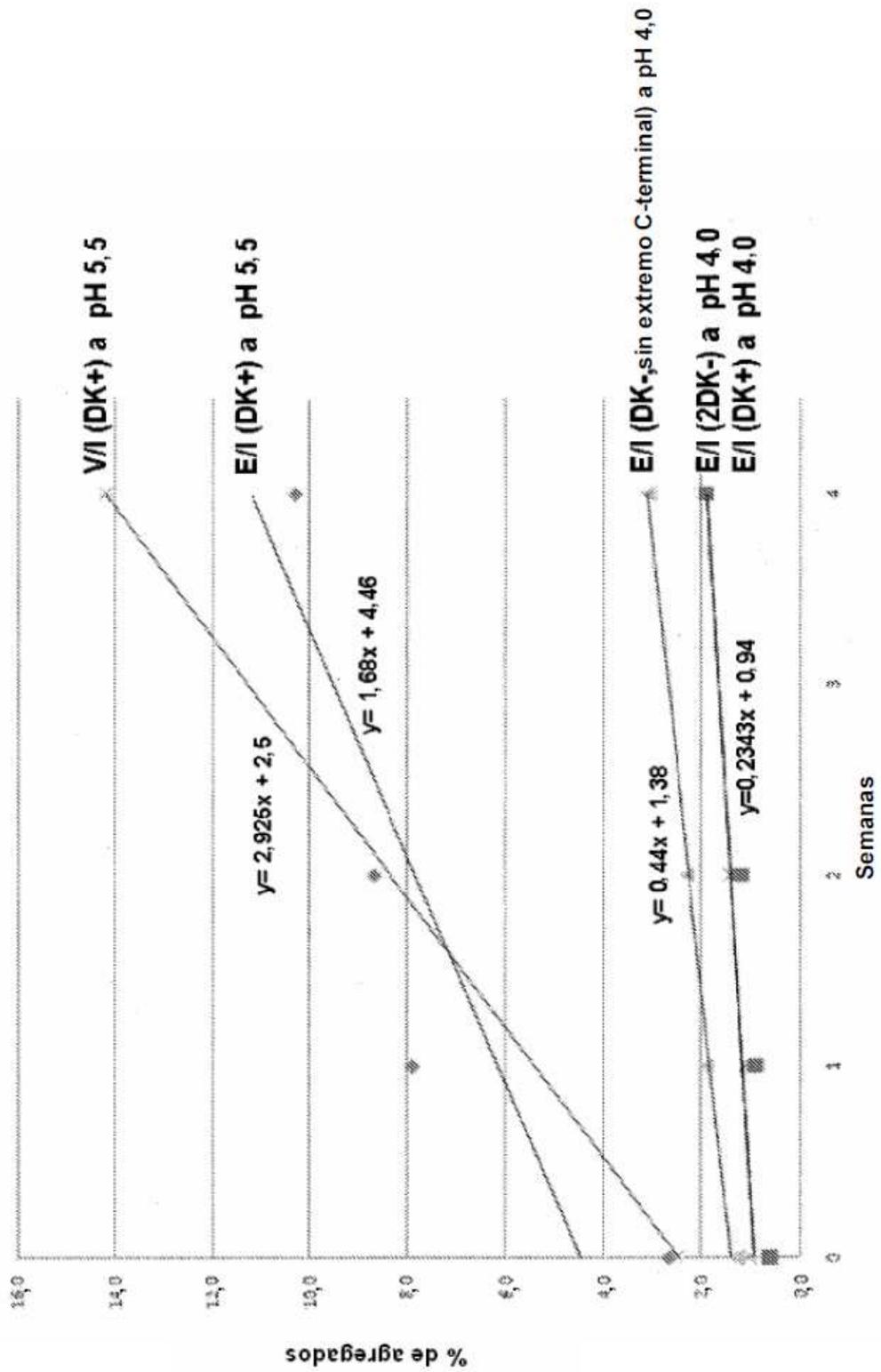


FIGURA 10

% de recortes totales según RP-HPLC a 25 °C

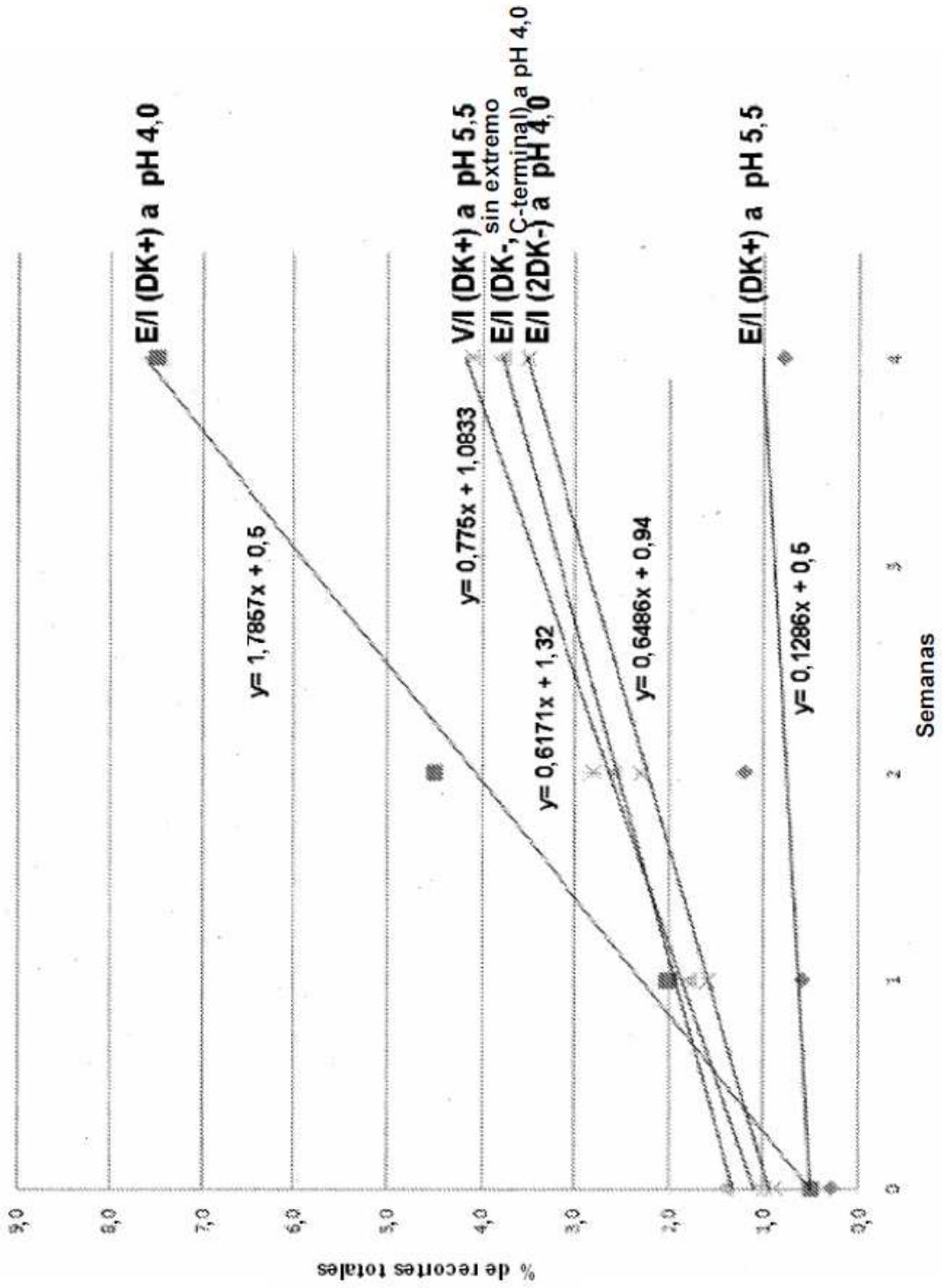


FIGURA 11

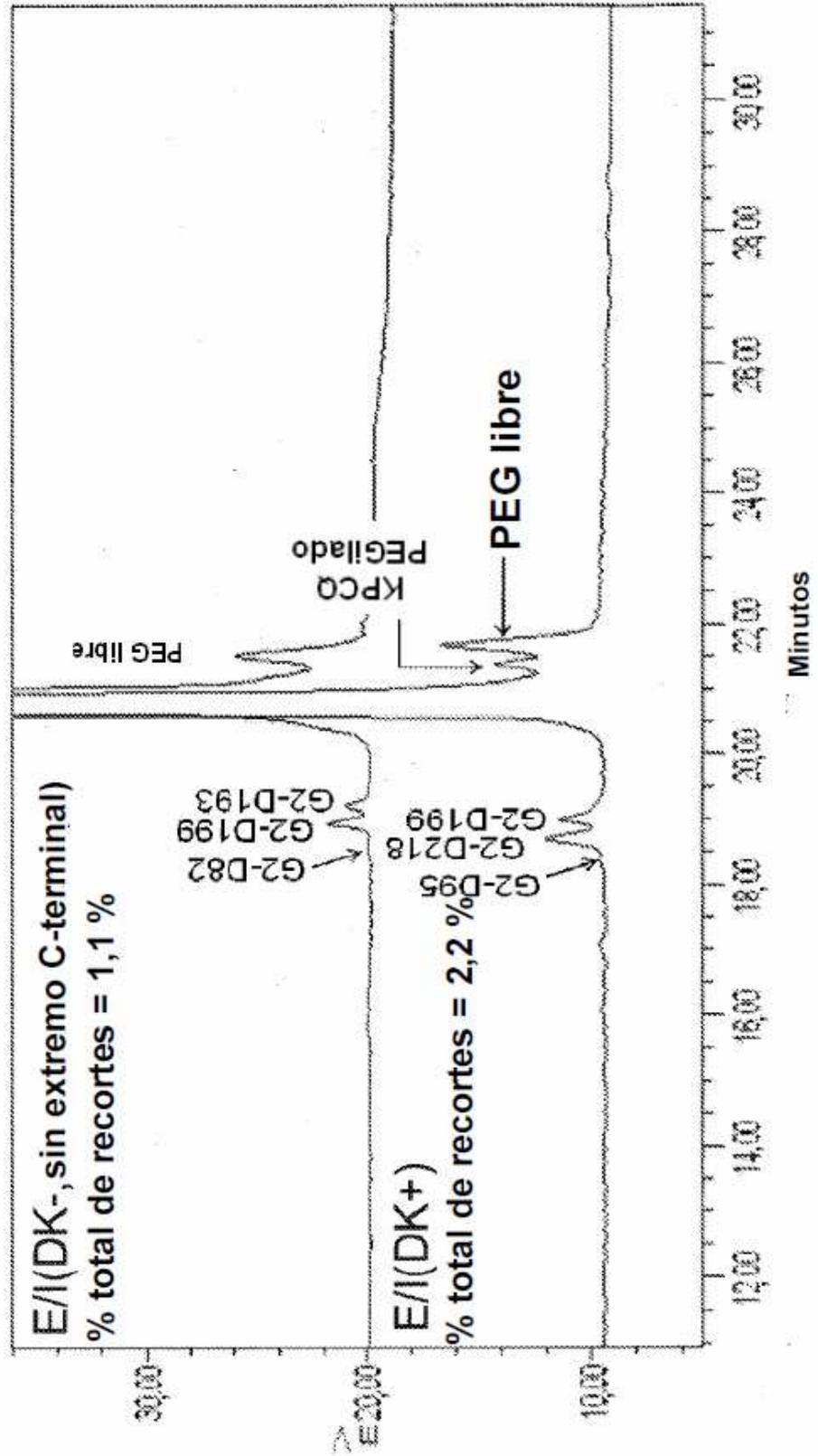


FIGURA 12

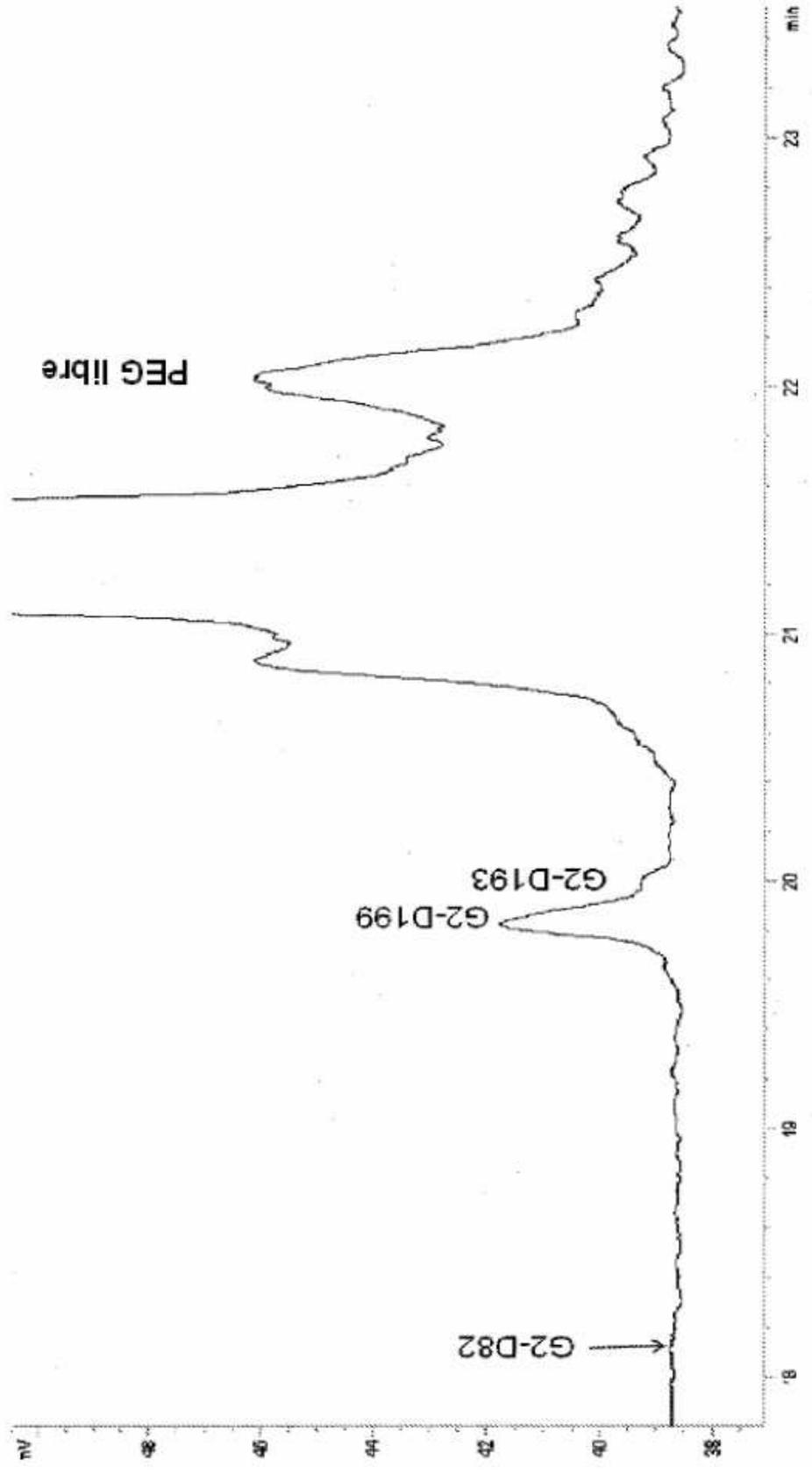


FIGURA 13

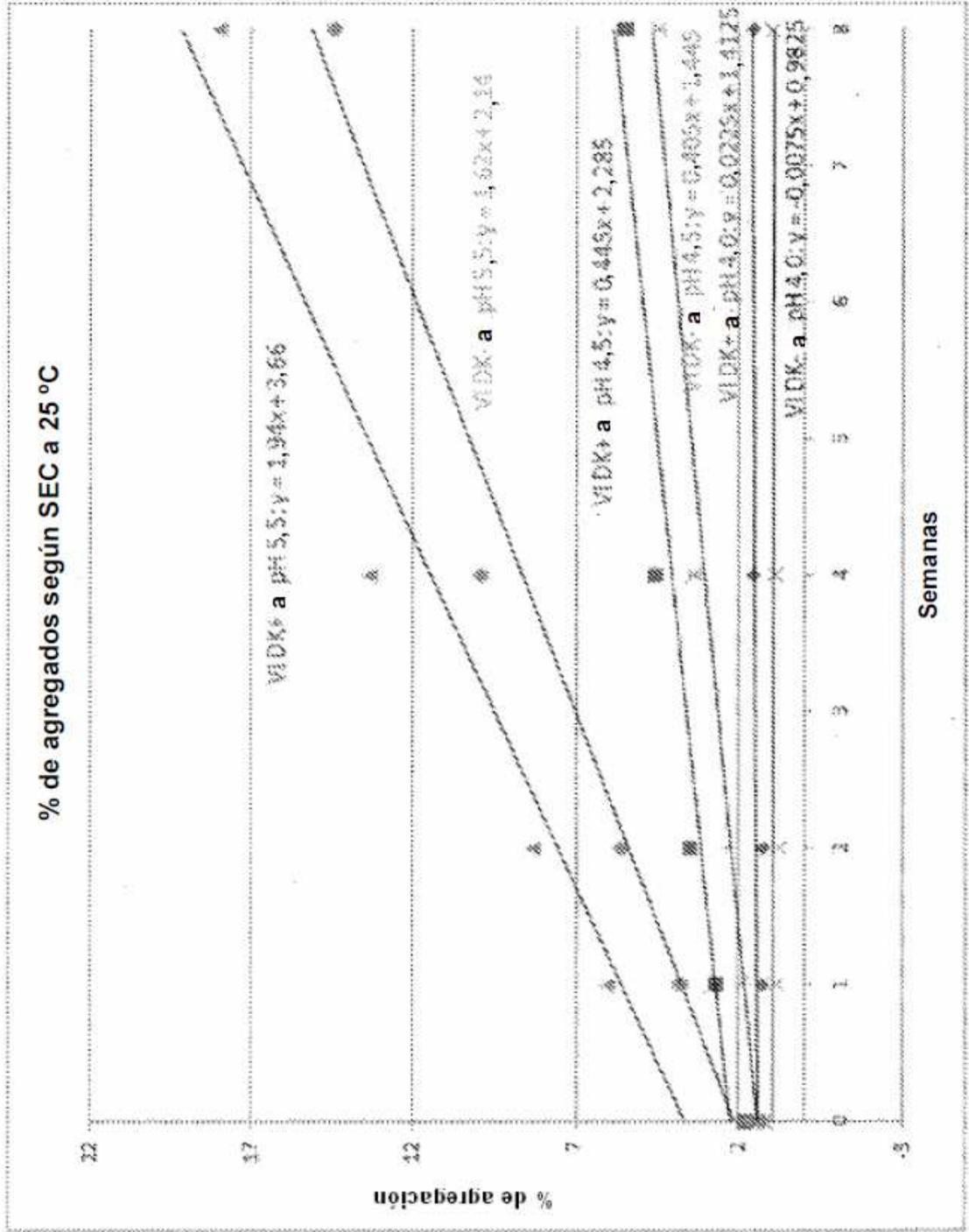


FIGURA 14

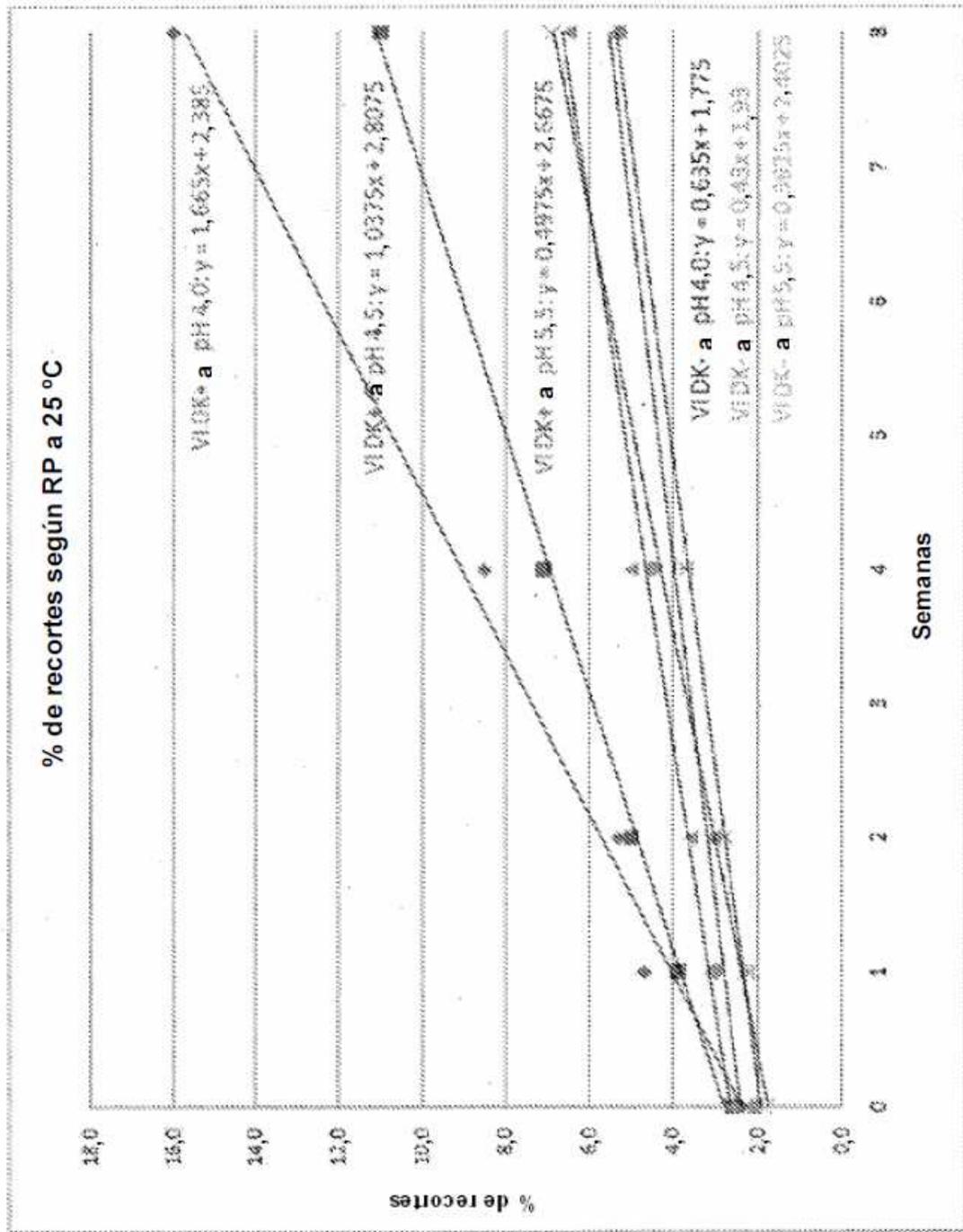


FIGURA 15

