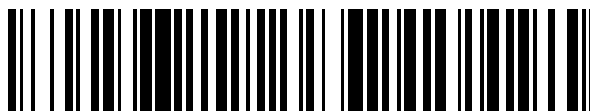


19



OFICINA ESPAÑOLA DE
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 730 693**

51 Int. Cl.:

A61K 49/00	(2006.01) C12N 5/10	(2006.01)
C07K 14/00	(2006.01) A61K 38/16	(2006.01)
C40B 50/00	(2006.01) A61P 25/00	(2006.01)
C40B 40/08	(2006.01) A61K 38/22	(2006.01)
C40B 40/02	(2006.01) A61P 7/00	(2006.01)
C40B 30/04	(2006.01) A61P 27/02	(2006.01)
C07H 21/00	(2006.01) A61P 35/00	(2006.01)
C12N 15/63	(2006.01) A61P 9/00	(2006.01)
C12N 1/21	(2006.01)	
C12N 1/19	(2006.01)	

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **29.04.2011** **E 16175500 (4)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **17.04.2019** **EP 3103478**

54 Título: **Composiciones del dominio de fibronectina estabilizados, métodos y usos**

30 Prioridad:

30.04.2010 US 329980 P

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:
12.11.2019

73 Titular/es:

JANSSEN BIOTECH, INC. (100.0%)
800/850 Ridgeview Drive
Horsham, PA 19044, US

72 Inventor/es:

JACOBS, STEVEN

74 Agente/Representante:

IZQUIERDO BLANCO, María Alicia

ES 2 730 693 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

Composiciones del dominio de fibronectina estabilizados, métodos y usos

5 ANTECEDENTES**Campo de la invención**

10 La presente invención se refiere a armazones proteicos con nuevas propiedades, que incluyen la habilidad de unirse a objetivos celulares. Mas particularmente, la presente invención se dirige a armazones proteicos basado en una secuencia de consenso de una repetición de fibronectina tipo III (FN3).

Discusión del Campo

15 Los anticuerpos monoclonales son el tipo más ampliamente utilizado de proteínas terapéuticas cuando se desea una alta afinidad y especificidad para una molécula objetivo. Sin embargo, las proteínas que no son anticuerpos pero que pueden ser diseñadas para unirse con dichos objetivos son de gran interés en la industria biofarmaceutica. Estas proteínas de "armazones alternativos" pueden tener ventajas sobre los anticuerpos tradicionales debido a su pequeño tamaño, la falta de enlaces de disulfuro, alta estabilidad, y habilidad para ser expresados en huéspedes procariotas. Recientemente se han aplicado nuevos métodos de purificación; estos son fácilmente conjugables con drogas/toxinas, penetran eficientemente en los tejidos y son fácilmente formateados en uniones multispecíficas (Skerra 200 J Mol Recognit 13(4): 167-87; Binz and Pluckthun 2005 Curr Opin Biotechnol 16(4): 459-69).

25 Uno de tales armazones alternativos es el pliegue de inmunoglobulina (Ig). Este pliegue se encuentra en las regiones variables de anticuerpos, así como miles de proteínas que no son anticuerpos. Se ha mostrado que una de tales proteínas Ig, la décima repetición de fibronectina tipo III (FN3) de la fibronectina humana, puede tolerar un gran número de mutaciones en giros expuesto en superficie mientras retiene el conjunto de la estructura pliegue-Ig. Así, se han construido bibliotecas de variantes de amino ácidos sobre los giros y uniones seleccionados con un gran número de diferentes objetivos (Koide et al. 1998 J Mol Biol 284(4): 1141-51; Karatan et al. 2004 Chem Biol 11(6): 835-44). Se ha hallado que tales dominios de FN3 diseñados se aglutinan con los objetivos de alta afinidad, mientras retienen importantes propiedades biofísicas (Parker et al. 2005 Protein Eng Des Sel 18(9): 435-44).

35 Las propiedades físicas deseables de las moléculas de potenciales armazones alternativos incluyen la alta estabilidad térmica y la reversibilidad del pliegue y despliegue térmico. Se han aplicado muchos métodos para aumentar la estabilidad térmica aparente de proteínas y encimas, incluyendo el diseño racional basado en la comparación con secuencias termoestables muy similares, diseño de estabilización de puentes de disulfuro, mutaciones para incrementar la propensión a hélice-alfa, diseño de puentes de sal, alteración de la carga en superficie de la proteína, evolución dirigida, y composición de secuencias consensuadas (Lehmann and Wyss 2001 Curr Opin Biotechnol 12(4): 371-5). La estabilidad en altas temperaturas es una propiedad deseable de tales armazones ya que esto aumenta el rendimiento de las proteínas obtenidas, mejora la solubilidad de la molécula purificada, mejora la actividad de los armazones intracelulares, reduce la inmunogenicidad, y minimiza la necesidad de una cadena fría en la fabricación.

45 La WO 2010/051274 describe un armazón de proteínas basado en una secuencia de consenso de proteínas de fibronectina tipo III (FN3).

RESUMEN DE LA INVENCIO'ON

50 La invención proporciona un polipéptido que comprende una molécula con base de armazón que comprende dominios en giro topológicamente similares a dominios del dominio de la tercera fibronectina, el polipéptido tiene una secuencia de amino ácidos basada en una secuencia consensuada de los dominios del tercer fibronectino poseyendo: (i) la secuencia de amino ácidos del SEQ ID NO: 16, en la cual los residuos específicos de la SEQ ID NO: 16 están sustituidos y mejoran la estabilidad térmica y la estabilidad química de la molécula con base de armazón, en donde la molécula con base de armazón comprende una sustitución E11N, o (ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:144.

60 La invención también proporciona un armazón de proteína aislada basada en un dominio de fibronectina tipo III (FN3), Tencon 16 (SEQ ID NO:16), de acuerdo con la reivindicación 1(i), que tiene una sustitución, E1 1N, y que comprende además: una parte de esqueleto que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:16 en los residuos 1-21, 29-74, y 82-89; una parte de giro B:C entre los residuos 21 y 29 de la SEQ ID NO:16 que tiene por lo menos un 75% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO:21-45; y una parte de giro F:G entre los residuos 74 y 82 de la SEQ ID NO:16 que tiene por lo menos un 75% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO:46-140, en donde el armazón de proteína es capaz de unirse a IgG humana.

65

La invención también proporciona un método para construir una biblioteca de una proteína basada en armazón que se deriva de una secuencia de consenso mejorada de estabilidad de un dominio de FN3 que incorpora codones aleatorizados para producir variantes de polipéptidos, que comprende los pasos de: proporcionar un polinucleótido que codifica un polipéptido en donde la secuencia de consenso mejorada de estabilidad se selecciona del grupo que consiste de la SEQ ID NO:144, e introducir codones aleatorizados en la secuencia de polinucleótidos en las posiciones deseadas; y propagar copias del polinucleótido para formar una biblioteca de polinucleótidos que codifican variantes de la proteína de armazón.

La invención también proporciona la biblioteca de referencias producida por el método de la invención.

La invención también proporciona un método para generar una unión de armazón de proteína para un objetivo específico con una afinidad de unión predefinida, comprendiendo poner en contacto la biblioteca de la invención con el objetivo específico y aislar la unión de armazón de proteína con el objetivo específico con la afinidad predefinida.

La invención proporciona además una molécula de ácido nucleico aislada que codifica el armazón de proteína de la invención. La invención también proporciona un vector de ácido nucleico aislado que comprende la molécula de ácido nucleico de la invención. La invención también proporciona células huésped procariotas o eucariotas que comprenden la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la invención. La invención también proporciona una composición que comprende el armazón de proteína de la invención y al menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable.

La invención también proporciona un dispositivo médico, que comprende el armazón de proteína de la invención, donde dicho dispositivo es adecuado para contactar o administrar dicho armazón de proteína mediante al menos un modo seleccionado entre parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebral, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocárdico, intraóseo, intrapélvico, intrapericardíaco, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarenal, intraretiniano, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolus, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

La invención también proporciona un artículo de fabricación para uso farmacéutico humano o diagnóstico, comprendiendo material empaquetado y un contenedor que comprende una solución o una forma liofilizada del armazón de proteína de la invención.

La invención también proporciona un armazón de proteína aislado en un dominio de fibronectina tipo III (FN3) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:144, que comprende además sustituciones en el B:C (residuos 22-28) o F:G (residuos 75-81) en donde la proteína de armazón se seleccionó uniéndose a una proteína objetivo.

RESUMEN DE LA DESCRIPCION

Aquí se describe un armazón de proteína basado en la repetición de la proteína fibronectina tipo III (FN3), codificada o ácidos nucleicos complementarios, vectores, células huésped, composiciones, combinaciones, formulaciones, dispositivos, y métodos para fabricarlos y utilizarlos. En una realización preferente, el armazón de proteína está compuesto por una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 de Tenascin-C humano (en lo sucesivo "Tenascin"). En otra realización preferente, el armazón de proteína aquí descrito es una secuencia consensuada de 15 dominios FN3 (SEQ ID NO: 1-15) o una variante de la misma. En un aspecto particular de la invención, el armazón de proteína tiene residuos sustitutos que causan que el armazón de la proteína demuestre habilidad para aumentar la resistencia a la desnaturalización térmica y química. Los armazones de proteína de la invención pueden ser diseñados mediante métodos conocidos en la materia, incluyendo la inserción de residuos en región en giro designado en las cuales el armazón, forme un dominio de unión seleccionado de un compañero de unión. El compañero de unión debe ser una molécula soluble o una molécula celularmente anclada, por ejemplo, el dominio extracelular de una proteína receptora.

En una realización, sustituciones específicas de la secuencia basada en consenso de SEQ ID NO:16 (Tencon) seleccionada para la inherente térmica y estabilidad química descrita en la presente mejoran la estabilidad térmica del armazón Tencon a más de 11°C y cambian el punto medio de la desnaturalización inducida GdmCL desde 3.4 M a más de 5 M. En una realización, las sustituciones específicas a SEQ ID NO: 16 (Tencon) son unitarias, como el N46V, E14P y E86I y todos los L17A y N46V y E86I. Polipéptidos basados en Tencon con estabilidad mejorada proporcionan armazones con facilidad de purificación mejorada, formulación, y aumento de la vida propia. Los compañeros de unión diseñados con estabilidad general mejorada pueden ser producidos introduciendo péptidos aleatorizados en los giros del armazón estabilizado.

Los armazones de proteína de la invención pueden ser utilizados como unidades monoméricas o

vinculados para formar estructuras poliméricas con las mismas o diferentes especificaciones del compañero de unión. Las moléculas basadas en el armazón de proteína Tencon deben ser además modificadas para mejorar una o más propiedades *in vivo* relacionadas con la biodistribución, persistencia en el cuerpo, o eficacia terapéutica como la asociación con moléculas con alteración celular, en particular, la captación de células epiteliales, por ejemplo, la región Fc de un anticuerpo, o moléculas diseñadas para aglutinar proteínas de suero como el dominio de unión abdominal. En otras realizaciones, los armazones de proteína de la invención deben ser ligados a una molécula de ácido nucleico que debe codificar el armazón de proteína.

Aquí se describe al menos un método para expresar al menos un polipéptido de armazón de proteína cuya secuencia está relacionada con una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3, en una célula huésped, que comprende el cultivo de una célula huésped como se describe en la presente bajo la condición de que de ellas al menos un armazón de proteína sea expresado en cantidades detectables y/o recuperables.

Aquí se describe al menos una composición que comprende (a) un armazón de proteína basado en una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 y/o la codificación de ácido nucleico descrito en la presente; y (b) un adecuado y/o farmacéuticamente aceptado portador o diluyente.

En la presente se describe un método de generación de bibliotecas de armazones de proteína basados en una repetición de proteínas fibronectina tipo II (FN3), preferiblemente, una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 y, más preferentemente, una secuencia consensuada de múltiples dominios FN3 para Tenascin humano con estabilidad térmica y química mejorada. Las bibliotecas se pueden generar mediante alteración de la composición amino ácido de un giro simple o la alteración simultánea de múltiples giros o posiciones adicionales de la molécula de armazón. Los giros alterados pueden ser alargados o acortados convenientemente. Dichas bibliotecas pueden ser generadas para incluir todo el amino ácido posible en cada posición, o un subconjunto de amino ácidos diseñados. Los miembros de la biblioteca pueden ser utilizados para la detección por pantalla, como la representación *in vitro* (ADN, ARN, representación de ribosomas, etc.), hongos de levadura, bacteriana, y representación fágica.

Los armazones de proteína de la presente invención proporcionan propiedades biofísicas mejoradas, como la estabilidad bajo condiciones de elevada fuerza osmótica y solubilidad en altas concentraciones. Los dominios de las proteínas de armazón no están vinculados al disulfuro, haciendo posible la expresión y archivo en sistemas desprovistos de enzimas requeridos para la formación de enlaces disulfidos, incluyendo sistemas procarióticos, como el *E. coli*, y un sistema de transcripción/traducción *in vitro*, como el sistema de lisado de reticulocitos de conejo.

Como aspecto adicional, la presente invención proporciona un método de generación de una molécula de armazón que aglutina para un objetivo particular mediante la criba de la biblioteca de armazones de la invención con el objetivo de detectar uniones. En otros aspectos relacionados, la que descrito son métodos de representación que deben ser empleados para generar o armazones de proteínas maduras con la actividad deseada, p. ej. Capaces de aglutinar para conseguir proteínas con una cierta afinidad. La afinidad de maduración puede ser realizada mediante iteración de mutagénesis y selección utilizando sistemas, como la representación fágica o la representación *in vitro*. La mutagénesis durante este proceso debe resultar de la mutagénesis dirigida para residuos de armazón específicos, mutagénesis aleatoria debido a PCR propenso a errores, transposición de ADN, y/o combinaciones de estas técnicas.

BREVE DESCRIPCIÓN DE LAS FIGURAS

Figura 1 Análisis SDS-PAGE de Tencon purificado realizado en un gel (Invitrogen) Bis-Tris NuPAGE 4-12% y tenido con azul Coomassie. N representa las condiciones naturales y R las condiciones reducidas.

Figura 2 muestra un análisis de dicroísmo circular de Tencon en PBS.

Figura 3 muestra un análisis de dicroísmo circular del tercer dominio FN3 desde la tenascina y Tencon en PBS donde se alcanzan temperaturas de fusión de 54°C y 78°C respectivamente.

Figura 4 muestra un diseño plásmido fagémico del pTencon-pIX. La expresión está dirigida por un promotor Lac y la secreción a través de una secuencia de señal OmpA.

Figura 5 muestra el NYC-Tencon que se puede visualizar utilizando ELISA demostrando la unión del fago al recubrimiento anti-Myc, recubrimientos CNTO95 y no recubiertos.

Figura 6 es una figura describiendo la estructura en giro de tercer dominio FN3 del Tenascin humano.

Figura 7 muestra la representación mediante ELISA resultado de las selecciones IgG donde se testaron clones individuales para aglutinar biotina IgG o Biotina HSA como control.

Figura 8A-B son gráficos que muestran la desnaturalización inducida de GdmCl para mutaciones simples (A) y mutaciones combinatorias (B) medidas mediante excitación fluorescente de 280nm y una emisión de 360nm.

5 DESCRIPCION DETALLADA DE LA INVENCION

Abreviaturas

ADCC = citotoxicidad celular dependiente de anticuerpos; CDC = citotoxicidad dependiente de complementos; DSC = calorimetría de escáner diferencial; ΔG = Energía Libre de Gibbs; IgG = Inmunoglobulina G; Tm = Temperatura de fusión;

Definiciones y explicación de la terminología

El término “anticuerpo” o “fracción de anticuerpo” se pretende que abarque anticuerpos, fragmentos de digestión, porciones específicas y variantes de los mismos, incluyendo sin limitaciones, compuestos miméticos de anticuerpos o porciones que comprenden anticuerpos que imitan la estructura y/o función de un anticuerpo o fragmento específico o porción del mismo, incluyendo, sin limitaciones, anticuerpos de cadena simple, anticuerpos de dominio simple, mini-cuerpos, y fragmentos de los mismos. Los fragmentos funcionales incluyen fragmentos de unión de antígenos que se unen al antígeno de interés. Por ejemplo, fragmentos de anticuerpos capaces de unirse al antígeno objetivo o a porciones del mismo, incluyendo, pero no limitándose a, Fab (p. ej. Por digestión papaina), Fab' (p. ej. Por digestión pepsina y reducción parcial) y F (ab')₂ (p. ej. Por digestión pepsina), facb (p. ej. Por digestión plasmina), pFc' (p. ej. Por digestión pepsina o plasmina), Fd (p. ej. Por digestión pepsina, reducción parcial y re-agregación), Fv o scFv (p. ej. Por técnicas de biología molecular) fragmentos, están abarcados por el termino anticuerpos. El anticuerpo o fragmento puede ser derivado de cualquier mamífero, como, pero no limitado a, un humano, un ratón, un conejo, una rata, un roedor, un primate, un camélido, una cabra, o cualquier combinación de los mismos e incluye aisladamente humanos, primates, roedores, mamíferos, quiméricos, humanizados y/o anticuerpos de CDR injertado, inmunoglobulinas, productos de disociación y otras porciones específicas y variantes de las mismas.

El término “epítipo” significa una proteína determinante capaz de unirse específicamente a un anticuerpo o dominio de unión diseñado como uno o más giros de una proteína de base de armazón. Los epitopos generalmente consisten en agrupaciones de moléculas superficie químicamente activa como el amino ácido o cadenas de azúcar y generalmente tienen características específicas de estructura en tres dimensiones, así como características de carga específica. Los epitopos conformacionales y no conformacionales se distinguen en la unión del primero, pero no del segundo donde se pierde en presencia de solventes desnaturizante. Los epitopos conformacionales resultan del plegado conformacional de la molécula objetivo la cual se alcanza cuando amino ácidos de porciones diferentes de la secuencia lineal de la molécula objetivo están muy próximas en un espacio tridimensional. Tales epitopos conformacionales son generalmente distribuidos en el lado extracelular de la membrana de plasma.

Los términos “Fc”, “proteína que contiene Fc” o “molécula que contiene Fc” son empleados en la presente para referirse a una proteína mono-mérica, dimérica, heterodimérica que tenga al menos un dominio de inmunoglobulina CH2 y CH3. Los dominios CH2 y CH3 pueden formar al menos una parte de la región dimérica de la proteína/molécula (p. ej. Anticuerpos).

El término “estabilidad” es utilizado en la presente para referirse a la habilidad de mantener un estado de plegado bajo condiciones fisiológicas de manera que retenga al menos una de sus actividades funcionales normales, por ejemplo, unirse a una molécula objetivo como la citoquina o proteína de suero. La medición de la estabilidad de la proteína y la fiabilidad de la proteína pueden verse como el mismo o como diferente aspecto que la integridad de la proteína. Las proteínas son sensibles o “lábiles” por la desnaturalización causada por calor, por ultravioletas o radiación iónica, cambios en la osmolaridad ambiente y el PH si se trata de una solución líquida, fuerza de cizallamiento mecánico impuesta por filtraciones de pequeño tamaño de poro, radiación ultravioleta, radiación iónica, como la radiación gamma, deshidratación química o por calor, o cualquier otra acción o fuerza que puede causar la destrucción de la estructura de proteína. La estabilidad de la molécula puede determinarse por métodos estándar. Por ejemplo, la estabilidad de una molécula puede ser determinada midiendo la temperatura de fusión térmica (“TM”). El TM es la temperatura en ° Celsius (°C) a la cual la mitad de las moléculas se despliegan. Generalmente, cuanto más alta es la TM, más estable es la molécula. Además del calor, el ambiente químico también cambia la habilidad de la proteína para mantener una estructura en tres dimensiones particular.

Del mismo modo, la desnaturalización química se puede medir por diferentes métodos. La desnaturalización química es un agente conocido por interrumpir las interacciones de enlace no covalente de una proteína, incluyendo enlaces de hidrogeno, enlaces electroestáticos, fuerzas Van der Waals, interacciones hidrofóbicas o enlaces disulfidos. Los desnaturizantes químicos incluyen clorhidrato de guanidinio, tiocianato guaninio, urea, acetona, disolventes orgánicos (DMF, benceno, acetonitrilo), sales (bromuro de litio sulfato de amonio, cloruro de litio, bromuro de sodio, cloruro de calcio, cloruro de sodio); agentes reductores (p. ej. Ditiotritol,

beta-mercaptoetanol, dinitrotoibenceno, e hidruros, tales como borohidruro de sodio), detergente iónicos y no iónicos, ácidos (por ejemplo, ácido clorhídrico (HCl), ácido acético (CH₃COOH), ácidos acéticos halogenados), moléculas hidrofóbicas (p. ej. Fosfolípidos) y moléculas desnaturizantes (Jain RK y Hamilton AD, Angew. Chem. 114(4), 2002). La cuantificación del extremo de desnaturización puede depender de la pérdida de propiedades funcionales como la habilidad de aglutinar una molécula objetivo, o de las propiedades fisicoquímicas como la tendencia a la agregación, exposición a residuos de solventes inaccesibles formados, o interrupción o formación de pliegues disulfidos.

En términos de pérdida de estabilidad, p. ej. Se conoce como “desnaturización” de proteínas el proceso donde algunas o todas formaciones tridimensionales que imparten las propiedades funcionales de la proteína se han perdido con la consiguiente pérdida de actividad y/o solubilidad. Las fuerzas interrumpidas durante la desnaturización incluyen pliegues intramoleculares, que incluyen, pero no se limitan a fuerzas electroestáticas, hidrofóbicas, Van der Waals, pliegues de hidrogeno, y disulfuro. La desnaturización de la proteína puede ser causada por fuerzas aplicadas a la proteína o a una solución que comprenda la proteína como por ejemplo una fuerza mecánica (por ejemplo, compresión o cizallamiento), térmica, estrés osmótico, cambios de PH, campos eléctricos o magnéticos, radiación iónica, radiación ultravioleta y deshidratación, y por desnaturizantes químicos.

Un tratamiento o una cantidad de tratamientos “terapéuticamente efectivo” como aquí se emplean, se refiere a una cantidad suficiente para causar una disminución o mejora detectable de la causa del desorden o sus síntomas. La “mejora” se refiere a la disminución del efecto de detrimento del desorden en el paciente que recibe la terapia. El sujeto de la invención, preferiblemente ha de ser humano, e cualquier caso, puede preverse que cualquier animal con necesidad de tratamiento para unas condiciones perjudiciales, desorden o enfermedad puede ser tratado con proteínas de base de armazón diseñadas con tal fin.

Descripción general

En la presente se describe, un recombinante aislado y/o un armazón de proteína sintético basado en la secuencia consensuada de fibronectina tipo III (FN3), proteína repetida, que incluye, sin limitaciones, un armazón derivado de mamífero, así como composiciones y moléculas de ácido nucleico codificado que comprende al menos, un armazón de proteína de un poli-nucleótido codificado basado en la secuencia consensuada FN3. También se describen en la presente, métodos de fabricación y uso, tales como ácidos nucleicos y armazones de proteína, incluyendo como tal una plataforma de descubrimiento, y para el diagnóstico y composición terapéutica, métodos y artilugios.

Los armazones de proteína de la presente invención ofrecen ventajas sobre las bioterapias basadas en largas inmunoglobulinas, debido a su pequeño, compacto tamaño. En particular, el tamaño y forma de una molécula biológica puede impactar en su habilidad para ser localmente administrada, oralmente, o cruzar la barrera de sangre-cerebro; habilidad para ser expresado en sistemas de bajo coste tales como el E. coli; habilidad para ser diseñado en moléculas bi- o multi-específicas que se aglutinan con objetivos múltiples o múltiples epitopos del mismo objetivo, adecuación para la conjugación p. ej. Con activos, polímeros, y probetas; habilidad para ser formulados en altas concentraciones; y la habilidad de dichas moléculas para penetrar de manera efectiva en tejidos enfermos y tumores.

Además, los armazones de proteína poseen muchas de las propiedades de los anticuerpos en relación con sus pliegues que imitan la región variable de un anticuerpo. Esta orientación permite que los giros FN3 sean expuestos a similares regiones determinadas de anticuerpos complementarios (CDRs). Estos deberían ser capaces de aglutinarse con objetivos celulares y los giros pueden ser alterados, p. ej. Afinidad madurada, para mejorar ciertas uniones o propiedades relacionadas.

Tres de los seis giros del armazón de proteína de la invención se corresponden topológicamente a los dominios de unión de un anticuerpo posicionado en los giros del dominio variable conocido por ser hiper-variable en origen (giros de dominio hiper-variable (HVL)), en posiciones como las definidas por Kabat como los residuos de las regiones complementariamente determinantes (CDRs), p. ej. Regiones de unión a antígenos, de un anticuerpo, mientras que los tres giros remanentes son expuestos superficialmente de un modo similar al anticuerpo CDRs. Estos giros abarcan o están posicionados en o alrededor de los residuos 13-16, 22-28, 51-54, 60-64, y 75-81 de SEQ ID NO: 16 como se muestra en la Tabla 3 más abajo y en la Figura 6. Preferiblemente, las regiones en giro en o alrededor de los residuos 22-28, 51-54 y 75-81 son alteradas para especificidad de aglutinamiento y afinidad. Uno o más de estas regiones en giro están aleatorizadas con otras regiones en giro y/o otras cadenas que mantienen su secuencia como porciones de la columna vertebral para tener lugar en la biblioteca y uniones potentes pueden ser seleccionados de la biblioteca teniendo gran afinidad con una proteína objetivo particular. Una o más de las regiones en giro pueden interactuar con la proteína objeto similar a la interacción de un anticuerpo CDR con la proteína.

Los armazones de la presente invención deben incorporar otras subunidades, p. ej. Vía interacciones covalentes. Todos o una porción de una región constante de anticuerpos puede ser agregada al armazón para impartir propiedades de anticuerpo, especialmente aquellas propiedades asociadas con la región Fc, p. ej. Actividad

complementaria (ADCC), vida media, etc. Por ejemplo, la función de efector puede proporcionarse y/o controlada, p. ej. Mediante modificación de la unión a C1q y/o unión a FcγR y de este modo cambiando la actividad CDC y/o la actividad ADCC. Las "funciones de efector" son responsables por activación o disminución de la actividad biológica (p. ej. En un sujeto). Los ejemplos de funciones de efector incluyen, pero no están limitados a: unión C1q: complemento dependiente de citotoxicidad (CDC); unión al receptor Fc; citotoxicidad mediante células dependientes de anticuerpos (ADCC); fagocitosis; bajo regulación de los receptores de superficie de célula (p. ej. Receptores de células B; BCR), etc. Tales efectos de efector pueden requerir que la región Fc se combine con un dominio de unión (p. ej. Giros de armazón de proteína) y pueden ser alcanzados empleando varios ensayos (p. ej. Ensayos de unión a Fc, ensayos ADCC, ensayos CDC, etc.).

Porciones adicionales pueden ser añadidos o asociados con los polipéptidos basados en armazón o variantes como el conjugado de toxina, albumina o conectores de albúmina, moléculas de glicol polietileno (PEG) deben ser añadidos a la molécula de armazón para alcanzar las propiedades deseadas. Estas porciones deben ser fusiones alineadas con la secuencia codificada de armazón y deben ser generadas por técnicas estándar, por ejemplo, mediante la expresión de la proteína de fusión desde un vector codificado de fusión recombinante construido utilizando secuencias de codificación nucleótido públicamente asequible. Alternativamente, deben emplearse métodos químicos para añadir las porciones a una proteína de base de armazón producida recombinadamente.

Los armazones de la presente invención pueden ser utilizados como mono específico de forma monomérica o como bi- o multi- específico (para diferentes proteínas objetivo o epítomos en la misma proteína objetivo) de forma multimérica. Los adjuntos entre cada unidad de armazón deben ser covalentes o no-covalentes. Por ejemplo, un armazón de biespecificidad dimérica tiene una subunidad con especificación para una primera proteína objetivo o epítopo y una segunda subunidad con especificidad para una segunda proteína objetivo o epítopo. Las subunidades de armazón pueden unirse en una gran variedad de formaciones que pueden aumentar la valencia y así la avidad de las uniones a antígenos.

Generación y Producción de la Proteína de Armazón

Al menos una proteína de armazón de la siguiente invención puede ser producida opcionalmente por una línea de células, una línea de células mixta, una célula inmortalizada o una población clonada de células inmortalizadas, como se conoce en la materia. Ver, p. ej. Ausubel, et al., ed., Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons, Inc., NY, NY (1987-2001); Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 2nd Edition, Cold Spring Harbor, NY (1989); Harlow and Lane, Antibodies, a Laboratory Manual, Cold spring Harbor, NY (1989); Colligan et al., eds., Current Protocols in Immunology, John Wiley&Sons, Inc., NY (1994-2001); Colligan et al., Current Protocols in Protein Science, John Wiley&Sons, NY, NY, (1997-2001).

Los amino ácidos de una proteína de armazón pueden ser alterados, añadidos y/o eliminados para reducir la inmunogenicidad o reducir, mejorar o modificar la unión, afinidad, tasa de asociación, tasa de disociación, avidéz, especificidad, vida media, estabilidad, solubilidad o cualquier otra característica adecuada, como se conoce en la materia.

Las proteínas bioactivas basadas en armazón pueden ser diseñadas con retención de alta afinidad para los antígenos, así como otras propiedades biológicas favorables. Para alcanzar este objetivo, las proteínas de armazón pueden ser opcionalmente preparadas mediante un proceso de análisis de las secuencias parentales y varios productos conceptualmente diseñados utilizando modelos en tres dimensiones de las secuencias parentales y diseñadas. Los modelos en tres dimensiones son asequibles y familiares para los expertos en la materia. Hay disponibles programas de ordenador que representan y expresan probables estructuras tridimensionales conformacionales de secuencias candidatas seleccionadas y pueden medir la posible inmunogenicidad (p. ej. Programa Immunofilter de Xencor, Inc., de Monrovia, CA). La inspección de estas representaciones permite el análisis del papel más adecuado para los residuos en el funcionamiento de la secuencia candidata, p. ej. El análisis de los residuos que influyen en la habilidad de la proteína de armazón candidata para unirse con su antígeno. De este modo, los residuos pueden ser seleccionados y combinados desde las secuencias de origen y referencia de manera que las características deseadas, como la afinidad para los antígenos objetivos, es alcanzada. Alternativamente, o en adición a esto, pueden utilizarse los procedimientos anteriormente mencionados, o cualquier otro método de diseño adecuado.

Representación

La representación de proteínas de base de armazón diseñadas o bibliotecas que comprenden proteínas de base de armazón con residuos variados o dominios como unión específica para proteínas similares o fragmentos puede ser convenientemente lograda utilizando nucleótidos (representa ionización de ARN o ADN) o bibliotecas de péptidos representados, por ejemplo, representación in vitro. Este método incluye la representación de grandes bibliotecas de péptidos para que miembros individuales tengan las estructuras o funciones deseadas. El péptido representado con o sin secuencias nucleótidos puede ser de entre 3 y 5000 nucleótidos, o más, o amino ácidos en

longitud, frecuentemente desde la longitud de 5-100 amino ácidos, y muy a menudo desde la longitud de 8 a 25 amino ácidos. Además de los métodos directos químicos sintéticos para generar bibliotecas de peptidos, muchos métodos de recombinación de ADN han sido descritos. Uno de los tipos incluye la representación de la secuencia de péptidos en la superficie de un bacteriófago o célula. Cada bacteriófago o célula contiene una secuencia de nucleótido que codifica la secuencia péptida particularmente representada.

Los armazones de proteína de la invención pueden aglutinar proteínas humanas o de cualquier otro mamífero con un amplio rango de afinidades (K_D). en una realización preferente, al menos un armazón de proteína de la presente invención puede opcionalmente unirse con una proteína objetivo de gran afinidad, por ejemplo, con un K_D igual o inferior a $10^{-7}M$, como por ejemplo pero no limitado a, 0.1-9.9 (o cualquier otro rango de valor en el mismo) $\times 10^{-8}$, 10^{-9} , 10^{-10} , 10^{-11} , 10^{-12} , 10^{-13} , 10^{-14} , 10^{-15} o cualquier rango o valor dentro de los mismos, como se determina mediante resonancia de plasmones superficiales o método Kinexa, practicado por expertos en la materia.

La afinidad o avidez de un armazón de proteína para un antígeno puede determinarse de manera experimental utilizando cualquier método apropiado. (Ver, por ejemplo, Berzofsky et al., "Antibody-Antigen Interactions", In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press: New York, NY (1984); Kubly, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company: New York, NY (1992); y los metodos descritos en los mismos). La afinidad medida de una interacción particular de armazón de proteína-antígeno puede variar si se toman las medidas bajo diferentes condiciones (p. ej. Osmolaridad, pH). Así, las medidas de afinidad y otros parámetros de aglutinamiento con antígenos (p. ej. K_D , K_{on} , K_{off}) deben ser, preferentemente, realizadas con soluciones estandarizadas de armazones de proteína y antígenos, y una solución amortiguadora estándar, tal como la que se describe aquí.

Se pueden llevar a cabo ensayos competitivos con el armazón de proteína de la presente invención para determinar proteínas, anticuerpos, y otros antagonistas capaces de unirse a una proteína objetivo con el armazón de proteína de la presente invención y/o compartir la región epitopa. Estos ensayos tal y como se conocía hasta ahora por los expertos en la materia evalúan la competición entre antagonistas o ligantes para un número limitado de puntos de unión en una proteína. La proteína y/o anticuerpo es inmovilizado, aislado, o capturado antes o después de la complejación y la muestra unida a la proteína objetivo es separado de la muestra no-enlazada, por ejemplo, mediante decantación (donde la proteína/anticuerpo ha sido pre-solubilizada) o mediante centrifugado (donde la proteína/anticuerpo ha sido precipitada tras la reacción competitiva). También, la unión competitiva debe ser determinado por si la funciones alterada por la unión o la falta de unión del armazón de proteína a la proteína objetivo, p. ej. Si la molécula de armazón de la proteína inhibe o potencia la actividad enzimática de, por ejemplo, un marcador. ELISA y otros ensayos funcionales deben ser empleados, tal y como se conoce en la materia.

Moléculas de Ácido Nucleico

Las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que codifican armazones de proteína pueden presentarse en forma de ARN, tales como mARN, hnARN, tARN o cualquier otra forma, o en forma de ADN, incluyendo, pero limitado a, cADN y ADN genómico obtenido mediante clonación o producido sintéticamente, o por combinaciones de la misma. El ADN puede ser de cadena triple, cadena doble o simple, o cualquier combinación de la misma. Cualquier porción de al menos una cadena del ADN o ARN puede ser la cadena codificadora, también conocida como cadena con sentido, o puede ser la cadena no-codificadora, también conocida como cadena sin-sentido.

Las moléculas aisladas de ácido nucleico de la presente invención pueden incluir moléculas de ácido nucleico comprendiendo un marco de lectura abierta (ORF), opcionalmente, con uno o más intrones, p. ej. Pero no limitado a, al menos una porción específica de al menos un armazón de proteína; las moléculas de ácido nucleico que comprenden la secuencia codificadora para un armazón de proteína o región en giro que aglutinan la proteína objetivo; y moléculas de ácido nucleico que comprende una secuencia nucleótido sustancialmente diferente de las anteriormente descritas pero las cuales, debido a la degeneración del código genético, aun codifican el armazón de proteína como se describe en la presente y/o como se conoce en la materia. Por supuesto, el código genético es conocido en la materia. De este modo, consiste en algo rutinario par aun experto en la materia generar, dichas variantes de ácido nucleico degenerado que codifica armazones de proteína específicos para la presente invención. Ver, p. ej. Ausubel et al., supra, y las variantes de ácido nucleico que se incluyen en la presente invención.

Tal y como se indica en la presente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención las cuales comprenden ácido nucleico que codifica un armazón de proteína pueden incluir, pero no están limitadas a, aquellos que codifican la secuencia de ácido nucleico de un fragmento de armazón de proteína, por si mismos; la secuencia codificadora para el armazón de proteína completo o una porción de la misma; la secuencia codificadora para un armazón de proteína, fragmento o porción, así como las secuencias adicionales, tales como la secuencia codificadora de al menos un señal líder o péptido de fusión, con o sin las citadas secuencias codificadoras adicionales, tales como al menos un intron, junto con secuencias no-codificadoras adicionales, incluyendo pero no limitadas a, secuencias no-codificadoras 3' y 5', tales como las transcritas, secuencias no-traducidas que juegan un papel en la transcripción, procesamiento de mARN, incluyendo empalmes y señales de polianelidacion (por ejemplo,

unión a ribosomas y estabilizadores de mRNA); una secuencia codificadora adicional que codifica para adicionales amino ácidos, tales como los que proporcionan funcionalidades adicionales. De este modo, la secuencia que codifica un almacén de proteína puede estar fusionada en una secuencia marcadora, como la secuencia codificadora de un péptido que facilita la purificación de los almacenes de proteína fusionados que comprende un fragmento o porción del almacén de proteína.

Moléculas de Ácido Nucleico

La invención también proporciona ácidos nucleicos que codifican las composiciones de la invención como polinucleótidos aislados o como porciones de vectores de expresión que incluyen vectores compatibles con procarióticos, eucarióticos o expresiones de fago filamentosos, secreciones y/o representación de la composición o mutaciones dirigidas de la misma.

Los ácidos nucleicos aislados de la presente invención pueden ser realizados empleando (a) métodos recombinantes, (b) técnicas sintéticas, (c) técnicas de purificación, y/o combinaciones de las mismas, como es bien sabido en la materia.

Los polinucleótidos útiles en la práctica de la presente invención codificarán a porción funcional del almacén de proteína descrito en la presente. Los polinucleótidos de la invención aceptan secuencias de ácido nucleico que pueden ser empleadas para hibridación selectiva de un polinucleótido que codifique un almacén de proteína de la presente invención. Se describen en la presente ácidos nucleicos aislados que se hibridizan bajo unas condiciones de hibridación selectivas en los polinucleótidos descritos en la misma. Así, los polinucleótidos de esta realización pueden ser utilizados para aislar, detectar, y/o cuantificar ácidos nucleicos que comprenden dichos polinucleótidos. Por ejemplo, los polinucleótidos de la presente invención pueden ser empleados para identificar, aislar, o ampliar clones parciales o de longitud completa de la biblioteca. En algunas realizaciones, los polinucleótidos son genomas o secuencias aisladas de cADN, o complementarias de otro modo que, un cADN de un humano o ácido nucleico de mamífero de la biblioteca.

Los ácidos nucleótidos pueden comprender según conveniencia secuencias en adición al polinucleótido de la presente invención. Por ejemplo, una zona de multi-clonación que comprenda una o más restricciones de endonucleasa puede ser insertada en el ácido nucleico para ayudar en el aislamiento del polinucleótido. También, secuencias traducibles pueden ser insertadas para ayudar en el aislamiento del polinucleótido traducido de la presente invención. Por ejemplo, una secuencia marcadora de hexa-histidina proporciona un medio adecuado para purificar las proteínas de la presente invención. El ácido nucleico de la presente invención, excluyendo la secuencia codificadora, es opcionalmente un vector, adaptador, o enlazador para la clonación y/o expresión del polinucleótido de la presente invención.

Secuencias adicionales pueden ser añadidas a tales clonaciones y/o secuencias de expresión para optimizar su función en la clonación y/o expresión, para ayudar en el aislamiento del polinucleótido, o para mejorar la introducción del polinucleótido dentro de la célula. El uso de vectores de clonación, vectores de expresión, adaptadores, y enlazadores es bien conocido en el arte.

Tal y como se indica en la presente, las moléculas de ácido nucleico de la presente invención que comprenden ácido nucleico que codifica un almacén de proteína incluyen, pero no están limitadas a, aquellos que codifican secuencias de amino ácidos de un fragmento de almacén de proteína, por si mismos; la secuencia codificadora para el almacén de proteína completo o una porción del mismo; la secuencia codificadora para un almacén de proteína, fragmento o porción, así como secuencias adicionales, como la secuencia codificadora de al menos un líder de señal o péptido de fusión, con o sin las citadas secuencias codificadoras adicionales, tales como al menos un intron, junto con adicionales, secuencias no-codificadoras, incluyendo pero no limitadas a, secuencias no-codificadoras 3' y 5', tales como las transcritas, no-traducidas secuencias que juegan un papel en la transcripción, procesamiento del mRNA, incluyendo empalmes y señales de poliadenilación (por ejemplo, unión a ribosomas y estabilizadores de mRNA); una secuencia codificadora adicional que codifica amino ácidos adicionales, tales como los que le proporcionan funcionalidades adicionales. De este modo, la secuencia que codifica un almacén de proteína puede estar fusionada en una secuencia marcadora, como la secuencia que codifica un péptido que facilita la purificación del almacén de proteína fusionado que comprende un fragmento o porción de almacén de proteína.

Para la expresión bacteriana que incluye un fago de bacteria infectada, la señal de secreción preferida es la señal de secreción pelB o ompA, pero otros dominios poli péptidos de señal de secreción pueden ser empleados tal y como se describe en U.S. Pat. No. 5.658.727. En la representación de fagos, una secuencia de ADN traducible más abajo codifica una proteína recubierta de fago filamentosos, por ejemplo, proteína pIII o pIX. Las fago-proteínas preferentes se obtienen de fago filamentosos M13, fl, fd y fago filamentosos equivalentes. Así, la secuencia de ADN traducible más abajo codifica una secuencia de residuos de amino ácidos que se corresponde y es preferentemente idéntica, al gen fago filamentosos II o al gen IX de recubrimiento polipéptido. Las secuencias de tales recubrimientos de proteína son conocidas y accesibles en bases de datos públicas como la NCBI.

Una biblioteca de cADN o genómica puede ser explorada utilizando una sonda basada en la secuencia de polinucleótido de la presente invención, tal como se describe aquí. Las sondas pueden ser utilizadas para hibridarse con secuencias de ADN o cADN genómico para aislar genes homólogos en los mismos o diferentes organismos. Aquellos expertos en la materia apreciarán que se pueden usar varios grados de rigurosidad de hibridación en el ensayo; y también puede ser rigurosa la hibridación o el medio de lavado. Según las condiciones de hibridación se vuelven las rigurosas, debe haber un mayor grado de complementariedad entre la sonda y el objetivo para que se dé la doble formación. El grado de rigurosidad puede ser controlado por uno o más entre la temperatura, fuerza iónica, pH y la presencia de un solvente desnaturizante, como la formamida. Por ejemplo, la rigurosidad de hibridación varía a conveniencia cambiando la polaridad de la solución reactiva a través de, por ejemplo, la manipulación de la concentración de formamida dentro de un rango de 0% a 50%. El grado de complementariedad (identidad de secuencia) requerido para detectar la unión variará en función de la rigurosidad de la hibridación media y/o el lavado medio. El grado de complementariedad será de manera óptima del 100%, o 70-100%, o cualquier rango o valor entre los mismos. De cualquier modo, debe comprenderse que las pequeñas variaciones en las secuencias de sondas y cebadores pueden ser compensadas reduciendo la rigurosidad de la hibridación y/o el lavado medio.

En uno de los aspectos de la invención, los polinucleótidos son construidos utilizando técnicas para la incorporación de codones aleatorizados con objeto de dar color al polipéptido resultante en uno o más de los residuos específicos o para añadir residuos en posiciones específicas dentro de la secuencia. Pueden emplearse varias estrategias para crear bibliotecas de secuencias de polipéptidos alterados incluyendo métodos aleatorios, semi-rationales y racionales. Los métodos racionales y semi-rationales tienen la ventaja sobre las estrategias aleatorias, de que se posee más control sobre las consecuencias de los cambios introducidos en la secuencia codificadora. Además, si nos fijamos en las variaciones en ciertas regiones del gen, puede explorarse un universo de variantes de posibles amino ácidos en las posiciones elegidas.

Una construcción construida sobre el común NNK o el esquema diversificado NNS introduce la posibilidad de 32 diferentes codones en cada posición de los 20 amino ácidos. Esta biblioteca teóricamente recoge 32^n para cada número n de residuos. En términos prácticos, siendo así, la representación de fagones está limitada a bibliotecas de muestras de 10^9 a 10^{10} variantes lo que implica que solo 6-7 residuos pueden ser alcanzados para el abigarramiento si ha de lograrse por la biblioteca la cobertura de la secuencia completa. Así, los métodos semi-rationales o "enfocados" para generar bibliotecas de variantes de armazones mediante identificación de las posiciones clave para ser abigarrados y poder elegir el régimen de diversificación adecuado puede ser aplicado. Un "juego de codones" se refiere al juego de diferentes secuencias de nucleótidos triples empleados para codificar las variaciones de amino ácidos deseadas. La forma estándar de designación de codones es la del código IUB, el cual es conocido en la materia y se describe en la presente. Un "juego de codones no-aleatorio" se refiere a un juego de codones que codifica los amino ácidos seleccionados. La síntesis de oligonucleótidos con "degeneración" de nucleótidos seleccionados en ciertas posiciones es bien conocida por los expertos en la materia, por ejemplo, la aproximación TRIM (Knappek et al., J. Mol. Biol. (1999), 296: 57-86); Garrard&Henner, Gene (1993), 128:103). Dichos juegos de nucleótidos que poseen ciertos juegos de codones pueden ser sintetizados utilizando nucleótidos comercialmente asequibles o reactivos de nucleosidos y aparatos.

Un juego de codones es un juego de diferentes secuencias de nucleótidos triples utilizados para codificar las variaciones de amino ácidos deseados. Los juegos e codones pueden ser representados empleando símbolos para designar nucleótidos particulares o mezclas equimolares de nucleótidos como se muestra más abajo de acuerdo con el código IUB.

Códigos IUB

G Guanine

A Adenine

T Thymine

C Cytosine

R (A or G)

Y (C or T)

M (A or C)

K (G or T)

S (C or G)

W (A or T)

H (A or C or T)

B (C or G or T)

V (A or C or G)

D (A or G or T)

N (A or C or G or T)

Por ejemplo, en el juego de codones DVK, D puede ser nucleótidos A o G o T; V puede ser A o G o C; y K puede ser G o T. este juego de codones puede presentar 18 codones diferentes y puede codificar amino ácidos Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly y Cys.

Pueden crearse bibliotecas especializadas (p. ej. No-aleatorizadas) empleando codones NNK y centrándose en el abigarramiento de residuos seleccionados o, alternativamente, variantes con sustituciones no-aleatorizadas pueden ser creadas utilizando, por ejemplo, codones DVK, los cuales codifican 11 amino ácidos (ACDEGKNRSYW) y un codón de parada. Alternativamente, se puede emplear la muta génesis de Kunkel para abigarrar los deseados residuos o regiones del polipéptido (Kunkel et al. Methods Enzymol. 154:367-382, 1987).

Técnicas de clonado estándar son empleadas para clonar las bibliotecas en un vector para su expresión. La biblioteca debe ser expresada utilizando un sistema conocido, por ejemplo, expresando la biblioteca como una fusión de proteínas. Las proteínas fusionadas pueden ser representadas en la superficie de cualquier fago adecuado. Son bien conocidos los métodos para representar polipéptido fusionados que comprenden fragmentos de anticuerpos en la superficie de un bacteriófago (US 6.969.108 para Griffith; US.6.172.197 para McCafferty; US 5.223.409 para Ladner; US 6.582.915 para Griffiths; US6472147 para Janda). Las bibliotecas para el nuevo aislante polipéptido pueden ser representadas en pIX (WO2009085462A1). Las bibliotecas también pueden ser traducidas in vitro, por ejemplo, utilizando una representación de ribosomas (Hanes y Pluckthun, Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 94:4937, 1997), representación mRNA (Roberts y Szostak, Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 94:12297, 1997), representación-CIS (Odegrip et al., Proc. Natl. Acad. Scie. USA, 101:2806, 2004) u otros sistemas libres de células (US 5.643.768 para Kawasaki).

Bibliotecas con regiones diversificadas pueden ser generadas utilizando vectores que comprenden polinucleótido que codifican la secuencia Tencon (SEQ ID NO: 16) o una mutación predeterminadas de la misma. El constructo modelo debe tener un promotor y unas secuencias de señal para la cadena de polipéptido. Para crear bibliotecas de armazones, se emplean reacciones de muta génesis que utilizan oligonucleótidos que codifican las regiones en giro (A:B, B:C, C:D, D:E, E:F, y F:G) del armazón. Para asegurar la incorporación de todas las posiciones elegidas del esquema aleatorizado, puede incorporarse un codón de parada (como el TAA) en cada región deseada para destinarlo a ser diversificado. Solo podrán darse clones donde los codones de parada hayan sido reemplazados.

Polipéptidos de Armazón Modificado

Los armazones y fragmentos de proteína modificada de la invención pueden comprender uno o más restos que son covalentemente enlazados, directa o indirectamente, a otra proteína.

En el caso de la adición de residuos péptidos, o la creación de una proteína de fusión en línea, la adición de tales residuos debe realizarse a través de técnicas recombinantes desde una secuencia de polinucleótido como se describe en la presente. En el caso de un péptido anexo, adjunto o conjugado, proteína, químico orgánico, químico inorgánico o átomo, o cualquier combinación de los mismos, los restos adicionales que son enlazados a la proteína de la invención es generalmente vía otro que no sea el enlace péptido. Los armazones de proteína modificados de la invención pueden ser producidos mediante la reacción de una armazón de proteína o fragmento con un agente modificador. Por ejemplo, los restos orgánicos pueden ser enlazados al armazón de proteína es un modo no específico empleando un agente modificador de amino reactivos, por ejemplo, éster NHS de PEG. Los armazones de proteína modificados y fragmentos que comprenden el resto orgánico que es enlazado con partes específicas del armazón de proteína de la presente invención pueden ser preparados utilizando métodos adecuados, como la proteólisis reversa (Fisch et al., Bioconjugate Chem., 3:147-153 (1992); Werlen et al., Bioconjugate Chem., 5:411-417 (1994); Kumaran et al, Protein Sci. 6(10):2233-2241 (1997); Itoh et al., Bioorg. Chem., 24(1): 59-68 (1996); Capellas et al., Biotechnol. Bioeng., 56(4):456-463 (1997)), y lo métodos descritos en Hermanson, G.T., Bioconjugate Techniques, Academic Press: San Diego, CA (1996).

Cuando un polímero o una cadena es enlazada a la proteína de armazón, el polímero o cadena puede ser

independientemente un grupo de polímero hidrófilos, un grupo de ácidos grasos o un grupo de ácidos éster grasos. Como se emplea en la presente, el término “ácido graso” engloba ácidos mono-carboxílicos y ácidos di-carboxílicos. Un “grupo hidrófilo polimérico”, como se emplea el termino en la presente, se refiere a un polímero orgánico que es más soluble en agua que en octano. Por ejemplo, la polilisina es más soluble en agua que en octano. Así un armazón de proteína modificado por el enlace covalente de la polilisina es recogido en la invención. Polímeros hidrófilos adecuados para modificar los armazones de proteína de la invención pueden ser lineales o ramificados e incluir, por ejemplo, glicoles polialquenos (p. ej. PEG, glicol monometoxi-polietileno (mPEG), PPG y similares), carbohidratos (p. ej. Dextrano, celulosa, oligosacáridos, polisacáridos y similares), polímeros de hidrófilo amino ácidos (p. ej. Polilisina, poliarginina, poliaspartato y similares), óxidos poli alcanos (p. ej. Polietileno óxido, polipropileno óxido y similares) y polivinilo pirolidona. Preferentemente, el polímero hidrófilo que modifica el armazón de proteína de la invención tiene un peso molecular de entre 800 y 150.000 Dalton como una entidad molecular separada. Por ejemplo, pueden utilizarse PEG₅₀₀₀ y PEG₂₀₀₀₀, donde el subíndice es el peso medio molecular del polímero en Dalton. El grupo hidrófilo polimérico puede ser sustituido por grupos de ácidos grasos o ácidos éster graso, con entre uno y seis alquiles. Los polímeros hidrófilos que son sustituidos por ácidos grasos o grupos éster de ácidos grasos pueden ser preparados mediante el uso de métodos adecuados. Por ejemplo, un polímero que comprende un grupo de aminos puede ser acoplado a un carboxilato del ácido graso o éster de ácido graso, y un carboxilato activado (p. ej. Activado con N, N-carbonilo diimidazol) en un ácido graso o éster de ácido graso puede ser acoplado a un grupo hidroxilo en un polímero.

Los ácidos grasos y ésteres de ácidos grasos adecuados para modificar armazones de proteína de la invención pueden ser saturados o pueden contener una o más unidades de saturación. Los ácidos grasos adecuados adecuados para modificar armazones de proteína de la invención incluyen, por ejemplo, n-dodecanoato (C₁₂, laurato), n-tetradecanoato (C₁₄, miristato), n-octadecanoato (C₁₈, estearato), n-eicosanoato (C₂₀, araquinato), n-docosanoato (C₂₂, behenato), n-triacontanoato (C₃₀), n-tetracontanoato (C₄₀), cis-Δ⁹-octadecanoato (C₁₈, oleato), todos los cis-Δ⁵, 8, 11, 14-eicosatetraenoato (C₂₀, arachidonato) ácido octanedioico, ácido tetradecanedioico, ácido docosanedioico y similares. Los ésteres de ácidos grasos adecuados incluyen mono ésteres de ácidos di carboxílicos que comprenden un grupo de bajos alquiles lineales o ramificados. El grupo de alquiles más bajo puede comprender desde uno hasta doce, preferiblemente, de uno a seis, átomos de carbono.

Las proteínas que contienen Fc pueden ser comparadas por funcionalidad con muchos ensayos in vitro conocidos. En particular, por afinidad con miembros de la familia FcγRI, FcγRII y FcγRIII del FcγR de interés. Estas medidas pueden llevarse a cabo utilizando formas de recombinante soluble de los receptores o formas asociadas a células de los receptores. Además, afinidad al FcRn, el receptor responsable para la circulación prolongada de vida media del IgGs, puede ser medida, por ejemplo, mediante BIAcore utilizando recombinante soluble FcRn. Ensayos funcionales basados en células, tales como el ensayo ADCC y los ensayos CDC, revelan las consecuencias funcionales de una variante particular de las estructuras. En una realización, el ensayo ADCC es configurado para tener células NK como células efectoras primarias, de este modo reflejando los efectos funcionales del receptor FcγRIIIA. Ensayos de fagocitosis deben ser utilizados para comparar las funciones de inmune efectores de diferentes variantes, como ensayos que miden la respuesta celular, tales como el su peróxido o la liberación de mediadores inflamatorios. Modelos in vivo también pueden emplearse, como, por ejemplo, en el caso de utilizar variantes de anticuerpos anti-CD3 para medir la activación de células T en ratones, una actividad dependiente de dominios Fc atrayendo ligantes específicos, como los receptores Fcγ.

Selección de Células Huésped o Diseño de Células Huésped

Tal y como se describe en la presente, la célula huésped elegida para la expresión de la proteína de base de armazón es una gran contribuyente en la composición final, incluyendo, sin limitación, la variación en la composición de los restos oligosacáridos que decoran la proteína, si se desea, por ejemplo, en el dominio de inmunoglobulina CH2 cuando se presenta. Así, un aspecto de la descripción abarca la selección de la célula huésped adecuada para el uso y/o mejora de la célula producida expresando la deseada proteína terapéutica.

Además, la célula huésped debe ser de origen mamífero seleccionado o seleccionada entre COS-1, COS-7, HEK293, BHK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP2/0, 293, HeLa, mieloma, linfoma, almidón, o células de insectos o plantas, o cualquier derivado, inmortalizado o célula transformada de las mismas.

Alternativamente, la célula huésped puede ser seleccionada de especies u organismos incapaces de polipéptidos glicosilados, p.ej. una célula u organismo procarióticos, como uno natural o diseñado: *E. coli spp.*, *Klebsiella spp.*, o *Pseudomonas spp.*

Seleccionando Dominios de Unión

Los polipéptidos o proteínas de fusión o componentes o dominios de los mismos también se pueden obtener seleccionándolos de bibliotecas de dichos dominios o componentes, p. ej. Una biblioteca de fagos. Una biblioteca de fagos puede crearse insertando una biblioteca de oligonucleótidos aleatorios o una biblioteca de polinucleótidos que contengan secuencias de interés, tales como dominios de anticuerpos de células-B de un animal

o humano inmunizado (Smith, G.P. 1985. Science 228: 1315-1317). Las bibliotecas de fago anticuerpos contienen pares de regiones de cadenas variables pesadas (H) y ligeras (L) en un fago permitiendo la expresión de fragmentos de cadena simple Fv o fragmentos Fab (Hoogenboom et al. 2000, Immunol. Today 21(8) 371-8). La diversidad de unas bibliotecas fagémidas puede ser manipulada para incrementar y/o alterar las especificaciones de los polipéptidos de la biblioteca para producir y subsecuentemente identificar propiedades moleculares adicionales, deseadas, y los polinucleótidos que las codifican.

Otras bibliotecas de componentes de unión a objetivos que deben incluir además de regiones variables de anticuerpos son las representaciones de ribosomas, representación CIS, representación de almidón, representaciones bacterianas y representaciones en células mamíferas. La representación de ribosomas es un método de traducción el mRNA en proteínas afines a la misma mientras mantiene la proteína adosada al ARN. El ácido nucleico que codifica la secuencia es recuperado por RT-PCR (Mattheakis, L.C. et al. 1994. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 9022). La representación CIS es una alternativa del método in vitro en el cual la biblioteca se construye como una fusión de proteínas con RepA. Durante la traducción in vitro, las uniones RepA in cis al ADN del que fue creado, proporcionando un enlace directo entre el genotipo y el fenotipo (Odegrip et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 101:2806, 2004). La representación de almidón se basa en la construcción del receptor de adhesión de proteínas fusionadas de almidón alfa-aglutinina de membrana asociada, aga1 y aga2, una parte del tipo de sistema de apareamiento (Broder et al. 1997. Nature Biotechnology, 15:553-7). La representación bacteriana se basa en la fusión del objetivo con proteínas bacterianas exportadas que asocian la membrana de la célula o pared de la célula (Chen and Georgiou 2002. Biotechnol Bioeng, 79:496-503). Similarmente, los sistemas de representación de mamíferos están basados en la creación de una proteína de fusión entre los polipéptidos que contiene secuencias aleatorizadas y una membrana de anclaje a la proteína oculta.

Usos de las Moléculas de Base de Armazón

La composición de las moléculas de base de armazón descritas en la presente y generadas mediante cualquiera de los métodos anteriormente descritos debe ser empleada para diagnosticar, monitorizar, modular, tratar, aliviar, ayudar a prevenir la incidencia de, o reducir los síntomas de la enfermedad humana o patologías específicas de las células, tejidos, órganos, fluidos, o generalmente, un huésped. Una molécula de base de armazón diseñada para un propósito específico puede ser utilizada para tratar una inmune-deficiencia, una enfermedad metabólica, un desorden cardiovascular; una enfermedad maligna; un desorden o enfermedad neurológico; una infección, como la bacteriana, infección viral o parasitaria; o cualquier otra relacionada con las condiciones especificadas, incluyendo la inflamación, el dolor, la necrosis de tejidos o la fibrosis.

Tal método puede comprender la administración de una cantidad efectiva de la composición o composición farmacéutica que comprenda al menos una proteína de armazón para una célula, tejido, órgano, animal o paciente que necesite tal modulación, tratamiento, alivio, prevención, o reducción de los síntomas, efectos o mecanismos. La cantidad efectiva puede comprender una cantidad de entre 0.001 a 500 mg/hg para sencillas (p. ej. Bolos), administración múltiple o continua, o para lograr una concentración de suero 0.01-500 ug/ml de concentración de suero para sencillas, múltiples o continuas administraciones, o cualquier rango efectivo o valor de los mismos, como se ha realizado y determinado utilizando métodos conocidos, como se describe en la presente o en artes relevantes.

Composiciones que Comprenden Proteínas de base de Armazón

El proteínas de armazón de unión objetivo que son modificadas o no-modificadas, monovalentes, bi- o multivalentes, y mono-, bi- o multi-objetivos, pueden ser aisladas utilizando procesos de separación conocidos en la materia para la captura, inmovilización, partición, o sedimentación y purificado hasta el punto necesario para su aplicación comercial.

Para el uso terapéutico, las proteínas de base de armazón deben ser formuladas de un modo adecuado de administración incluyendo pero no limitándose a parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intra-articular, intra-bronquial, intra-abdominal, intra-capsular, intra-cartilaginosa, intra-cavitaria, intracelular, intra-cerebral, intra-cerebroventricular, intra-cólica, intra-cervical, intra-gástrica, intra-hepática, intra-miocrárdico, intra-ósea, intra-pélvica, intra-pericárdica, intra-peritoneal, intra-pleural, intra-prostática, intra-pulmonar, intra-rectal- intra-renal, intra-retiniana, intra-espinal, intra-sinovial, intra-torácica, intra-uterina, medios intra-vesicales, intra-lesionales, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intra-nasal o transdérmica. Al menos un armazón de proteína de la composición puede ser preparado para el uso en forma de pastillas o capsulas; polvos, gotas nasales o aerosoles; gel, ungüento, loción, suspensión o incorporado en un vendaje o "parche" terapéutico como se conoce en el arte. La invención proporciona para formulaciones estables de proteínas de base de armazón, lo que preferentemente es una solución salina tamponada con fosfato o una solución acuosa de sal mixta, así como soluciones y formulaciones conservadas, así como formulaciones en conserva multi-uso adecuadas para el uso farmacéutico o veterinario, comprendiendo al menos una proteína de base de armazón en una formulación farmacológicamente aceptable. Los vehículos adecuados y su formulación, inclusiva de otras proteínas humanas, p. ej. Albumina de suero humano, se describen, por ejemplo, en Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 21st Edition, Troy, D. B. ed., Lipincott Williams and Wilkins, Philadelphia, PA 2006, Part 5, Pharmaceutical Manufacturing pp 691-1092, ver especialmente pp. 958-

989.

La composición debe utilizarse con, o incorporar una formulación simple en la misma, otros activos conocidos beneficiosos para el tratamiento del desorden, condición, o enfermedad indicada o puede ser testado preparando combinaciones de proteínas de base de armazón con nuevas composiciones y activos.

Mientras la invención ha sido descrita en términos generales, las realizaciones de la invención serán descritas más a fondo en los siguientes ejemplos que no deben ser interpretadas como limitaciones a las reivindicaciones.

EJEMPLO 1. CONSTRUCCIÓN DE VARIANTES DE LA GLICOSALICIÓN Fc

Diseño Tencon

El tercer dominio FN3 para la Tenascina humana (SEQ ID NO: 3) puede ser utilizada como armazón alternativo capaz de ser diseñada para aglutinarse a moléculas objetivo específicas vía giros de superficie expuesta estructuralmente análogas a regiones determinantes de la complementariedad de anticuerpos (CDR). La temperatura de fusión de este dominio es de 54°C en PBS en su forma natural. Con objeto de producir una molécula de armazón con una estructura similar y mejorar las propiedades físicas, tal como la estabilidad térmica mejorada, se diseñó una secuencia consensuada basándose en el alineamiento de los dominios 15 FN3 de Tenascina humana (SEQ ID NO: 1-15).

El análisis del alineamiento de la secuencia múltiple en la Tabla 1 muestra que estos 15 dominios tienen identidades de secuencia respectivas que van del 13 al 80%, con una identidad de secuencia media entre pares del 29%. Una secuencia consensuada (SEQ ID NO: 16) fue diseñada mediante la incorporación el amino ácido más conservada (frecuente) en cada posición desde la alineación mostrada en la Tabla 1. En los alineamientos de pares, la secuencia consensuada de la presente invención (SEQ ID NO: 16), denominada Tencon, es idéntica a los dominios FN3 de Tenascina al 34-59% de las posiciones con una secuencia media de identidad del 43%.

Expresión y purificación de la proteína

La secuencia de amino ácidos de Tencon (SEQ ID NO: 16) fue traducida otra vez, resultando en la secuencia de ADN mostrada en SEQ ID NO: 17. Esta secuencia fue ensamblada por solapamiento del PCR, subclonados subclonado en un vector pET15 modificado, transformado en BL21Star(DE3) E. coli (Invitrogen) y cultivadas en placas de agar LB que contienen 75 µg/ml de carbenicilina. Se seleccionó una colonia simple y se cultivó durante la noche a 37°C en 50 ml de TB con un 2% de glucosa y 100 µg/ml de carbenicilina. Este cultivo se empleó para sembrar 500 ml de media auto inducida (Overnight Express Instant TB media, Novagen) en un matraz de 2.5 L Ultra Yield. El cultivo y la expresión se realizó utilizando un programa dual (3 horas a 37°C, 300 rpm, seguido de 16 horas a 30°C, 250 rpm) en una incubadora vibratoria ATR Multitron.

El cultivo fue recolectado y centrifugado a 7000 rpm durante 15 minutos en un rotor JL8.1 para sedimentar las células. Las células fueron re suspendidas en 30 ml de disolución tampón que contiene 20mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol, 20 mM imidazol, 0.37 mg/ml lisocima, inhibidor IX Complete Protease (EDTA-libre; Roche) y Benzonas (Sigma-Aldrich, 0.25 µl/ml final) y lisada con Misonix XL2020 sonicador por 5 minutos en hielo en modo pulso (5 minutos encendido, 30 segundos apagado). El material insoluble fue retirado mediante centrifugado a 17.000 rpm durante 30 minutos en un rotor JA-17.

La proteína Tencon fue purificada del lisado soluble por proceso cromatográfico de dos etapas. Primero, la proteína fue capturada mediante cromatografía de inmovilización por afinidad metal, añadiendo perlas de 2 ml Ni-NTA agarosa (Qiagen) al lisado y colocándolo en una plataforma oscilante durante una hora a 4°C. Después la, resina se empaquetó en una columna Poly-Prep (bio-Rad) y se lavó con 20 mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol y 20 mM imidazol para retirar el material no ligado. Las proteínas se eluyeron de la resina con 20mM de fosfato de sodio, pH 7.5, 500 mM NaCl, 10% glicerol y 500 mM imidazol. Las fracciones fueron analizadas por SDS-PAGE, ambos mediante tinte Coomassie y Western utilizando HRP-conjugado anti-His anticuerpos (Immunology Consultants Laboratory). Las fracciones deseadas fueron agrupadas y dializadas en PBS pH 7.4. como segundo paso del proceso de purificación la proteína se cargó en una columna de Superdex-75 HiLoad 16/60 (GE Healthcare) equilibrado en PBS. Las fracciones fueron analizadas mediante SDS-PAGE, y las fracciones contenedoras de Tencon fueron agrupadas y concentradas utilizando un concentrado Centriprep UltraCel YM-3 (Amicon).

La concentración de proteínas se determinó utilizando un plato lector BioTek para medir la absorbencia de la muestra a 280 nm. La preparación final se analizó por tinte Coomassie (Figura 1), tinte Western con anti-His anticuerpo, y mediante HPLC-SEC utilizando una columna G3000SW-XL (TOSOH Biosciences) equilibrado en PBS. El análisis SDS-PAGE muestra que el Tencon migra entre 6 y 14 kDa, de acuerdo con la masa esperada de 10.7 kDa para la proteína monomérica. Se obtuvo un cultivo de almidón de >50 mg de proteína Tencon pura por litro.

Caracterización Biofísica

La estructura y estabilidad del Tencon fue caracterizada por espectroscopia de dicroísmo celular y colorimetría de escáner diferencial respectivamente. Las medidas de CD fueron realizadas en un espectrómetro AVIV a 20°C en PBS en una concentración de 0.2 mg/ml. El espectro de la Figura 8 muestra un mínimo de 218 nm, sugestivo de estructura de lámina beta para una proteína que pertenece a la familia del FN3. Los datos DSC se obtuvieron calentando soluciones de 0.5 mg/ml de la tercera del dominio FN3 de Tenascin o Tencon en PBS entre 35°C y 95°C a un ratio de 1°C/minuto en un calorímetro N-DSCII (Termodinámica Aplicada). Primero, la curva del tinte de tampón fue sustraído para producir los perfiles mostrados en la Figura 3. De estos datos, se calculó las temperaturas de fusión de 54°C y 78°C para la tercera del dominio FN3 y Tencon, respectivamente, utilizando el software CpCalc (Termodinámica Aplicada). El plegado y desplegado de ambos dominios es reversible a estas temperaturas.

Análisis de Inmunogenicidad

Un programa informático que modela las secuencias de amino ácidos para humanos fue empleado para comparar la inmunogenicidad prevista de secuencias de amino ácidos que representan el tercer dominio FN3 de Tenascin, Tencon, humano y diversos anticuerpos terapéuticos (mostrado en la Tabla 2). El Chrimetic mAbs y mAb humano (adalimumab) analizado con el programa fueron seguidos por aplicación del umbral de tolerancia (retira 9-mer péptidos con identidad 100% a una secuencia codificada gemline). El umbral de tolerancia no se aplicó al Tenascin o Tencon. El umbral de tolerancia asume amplia tolerancia de células T a las secuencias de gemline codificado mAb y se enfoca los análisis en nuevas secuencias primarias de CDRs y dominios flanqueados.

Estos análisis predicen un bajo riesgo inmunogénico para el Tenascin y Tencon y basados o similares a péptidos 9-mer, derivados de la secuencia analizada que aglutinará uno o más moléculas HLA. Las calificaciones son engordadas con respecto a la prevalencia de cada alelo HLA. Las calificaciones de los modelos para cada secuencia para proporcional un número sencillo que describe el PIR general de cada secuencia (suma de calificaciones). Los resultados del análisis se resumen en la Tabla 2. El Tenascin tiene la puntuación más baja (11.9). Tencon, como Tenascin, puntuó uniones primarias y riesgo agrótopos inmunogénicos previstos bajos (puntuación=13.2). Las secuencias de Tenascin y Tencon puntuaron favorablemente comparado con anticuerpos terapéuticos.

Representación de Tencon en fago M 13 por fusión pIX

El gen codificador de la secuencia de amino ácidos de Tencon fue sub-clonada en el vector pPep9 de la expresión fagémida por PCD y restricción de la clonación de digestión, resultando el vector pTencon-pIX. Este sistema expresa en términos N el Myc-tagged Tencon como la fusión del término C en el término N de la proteína M13 (Figura 4). El promotor Lac permite para niveles más bajos de expresión sin IPTG y expresión aumentada tras la adición de IPTG. La señal de secuencia OmpA se anexó al término N del Tencon para promover eficientemente la translocación al periplasma. Un enlace corto TSG-GGGS (SEQ ID NO: 141) fue construido entre Tencon y pIX para prevenir interacciones estéricas entre estas proteínas.

Para confirmación de la representación en la superficie de la partícula de fago M13, se transformó el pTencon-IX en XL1-Blue E. coli y se utilizó una colonia sencilla para inocularlo a 5 ml de cultivo LB suplementado con ampicilina. Este cultivo se hizo crecer a 37°C hasta alcanzar la fase mid-log en cuyo punto en que se añadió un fago ayudante 6¹⁰pfu de VCSM 13 y el cultivo incubado a 37°C durante 10 minutos sin agitación seguido de 50 minutos con agitación. El cultivo de fago ayudante rescatado fue diluido en 50 ml de media 2YT suplementado con ampicilina y kanamicina y se hizo crecer a 37°C con agitación hasta que el O.D.₆₀₀ alcanzó los 0.7 en cuyo momento se añadió el IOTG a la concentración final de 1 mM y la temperatura se redujo a 30°C. después de 16 horas, el cultivo fue centrifugado a 4000X g durante 20 minutos y el flotante recogido y almacenado a 4°C para su análisis.

El aglutinamiento de las partículas fago a un anticuerpo anti-Myc (Invitrogen) fue utilizado para confirmar la representación de la construcción Myc-Tencon en la superficie del fago M13. Se cubrió un plato Maxisorp durante la noche con una concentración de 2.5 ug/ml con anti-Myc o un anti- α v anticuerpo (control negativo) y bloqueado con SuperBlock T20 (Pierce). La dilución en serie de doble pliegue del flotante del cultivo fagémido descrito anteriormente fue realizado en PBS y añadido a los huecos del plato cubierto. Tras una hora, se lavó el plato con TBST y se añadió un anticuerpo anti-M13 HRP a cada hueco y lavado con TBST seguido de una hora de incubadora. El sustrato Roche BD ELISA POD fue añadido y detectada la luminiscencia en un plato de lectura (Tecan). La Figura 5 muestra que las partículas de fago Myc-Tencon aglutina el anti-myc, pero no los huecos cubiertos con el anticuerpo anti- α v o los huecos de control no cubiertos del plato de un modo dependiente de la concentración, confirmando la representación específica del Myc-Tencon en la partícula fago M13.

Un vector fagémido adicional puede ser construido para representar el Tencon y los miembros de la biblioteca (ver ejemplo 2) en el fago M13 como fusión para cubrir la proteína pIII. Para este sistema, el gen para el

pIX es reemplazado por el gen codificador una versión truncada de pIII (Bass et al. 1990). Cambios adicionales como se compara en el sistema mostrado en la Figura 4 incluyen el reemplazo de la secuencia de señal OmpA con la secuencia de señal DsbA, como secreción utilizando esta secuencia se ha mostrado ser beneficioso para la representación alternativa estable de las moléculas de armazón (Steiner et al. 2006).

EJEMPLO 2: Generación de Bibliotecas Tencon

Pueden elaborarse bibliotecas de variantes Tencon por diferentes métodos, dependiendo de la complejidad deseada y la ubicación relativa de las mutaciones en la molécula. Los métodos de sintetización del ADN son preferibles para crear mutaciones esparcidas alrededor del gen Tencon. También se puede utilizar la restricción de la clonación de enzimas para recombinar los fragmentos de ADN que contienen mutaciones en diferentes regiones del gen. Saturando la mutagénesis en una pequeña región definida, como un giro simple de Tencon, se puede introducir empleando un oligo-nucleótido degenerado y una mutagénesis dirigida de oligonucleótido (Kunkel et al. 1987).

Se construyó la biblioteca Tencon, biblioteca FG7, diseñada para reemplazar el giro FG con 7 amino ácidos aleatorios utilizando mutagénesis dirigida de oligonucleótidos. Se sintetizó un oligonucleótido (TconFG7-For-5'pho) para tener una secuencia degenerada de 21 pares base (bp) de NNS en las posiciones codificadoras el giro FG y dos secuencias de nucleótidos oscilantes 20-27 bp de complementariedad con la secuencia codificadora de Tencon. En este diseño, los veinte amino ácidos capaces de ser representados en el giro FG. La diversidad de nivel nucleótido calculada es de 1.3×10^9 .

TconFG7-For5'pho: (SEQ ID NO: 18)

```
GAATACACCGTTTCTATCTACGGTGTTNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNSCCGCT
GTCTGCGGAATTCAC
```

El formato para la mutagénesis dirigida de oligonucleótidos, pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-Piii, se construyó por reemplazo de la secuencia codificadora del giro Tencon F:G con una secuencia de tallo de giro que contiene un lado de restricción AscI. Este sistema permite la eliminación del ADN modelo de fondo tras la mutagénesis mediante digestión del ADN resultante con AscI antes de la transformación. Para purificar un formato de ADN de cadena simple para la mutagénesis, se cogió una colonia sencilla de E. coli CJ236 que hospeda pDsbA-Tencon-Asc-loop-Myc-pIII, en 5 ml de 2YT medio cultivadas con carbenicilina (50 ug/ml de concentración final) y Chloramphenicol 10 ug/ml). Después de 6 horas, se añadió el fago ayudante VCSM13 a la concentración final de 10^{10} pfu/ml e incubado sin agitación durante 10 minutos antes de ser transferido a 150 ml de 2YT con carbenicilina (10 ug/ml) y uridina (0.25 ug/ml) e incubado a 37°C con agitación a 200 rpm durante la noche. Las células fueron sedimentadas mediante centrifugado y los flotantes recogidos y el fago sedimentado con PEG NaCl. La cadena simple de ADN fue purificada del sedimento utilizando el kit QIAprep Spin M13 (Qiagen) de acuerdo con las instrucciones de fabricación.

Para hibridar el oligonucleótido degenerado con el formato, se combinaron 5 ug de ADN tipo fueron combinados con coligo TconFG7-For-5-pho a una ratio molar de 10:1 en Tris-HCl (50 mM, PH 7.5) y MgCl₂ (10 mM) e incubado a 90°C durante 2 minutos, 60°C tres minutos y 20°C durante 5 minutos. Tras la reacción de hibridación, se añadieron ATP (10 mM), dNTPs (25 mM cada), DTT (100 mM), gigante T4 (7 unidades) y T7 ADN polimerasa (10 unidades) a la mezcla reactiva e incubado a 14°C durante 6 horas seguido de 20°C durante 12 horas. Se purificó el ADN resultante utilizando el kit de purificación PCR (Qiagen) y recuperado en 100 uL de agua. Se digestionó la biblioteca de ADN con 10 unidades de AscI durante 4 horas y después se purificó de nuevo con el kit de purificación Qiagen PCR. La biblioteca final de ADN fue recuperada en 50 uL de agua. El producto de ADN de doble cadena resultante fue después transformado en E. coli MC1061F mediante electroporación.

Se recogieron los transformantes en 20 mL de medio SOC y se permitió la recuperación en una hora a 37°C. al final de la recuperación, la parte alícuota fue diluida en serie y emplatada en platos de Carbenicilina (100 ug/ml) que contienen un 1% de glucosa para alcanzar el número total de transformantes. El cultivo remanente de SOC fue después empleado para inocular un medio de un Litro de 2xYT con Carbinicilina y un 1% de glucosa hasta que el OD₆₀₀ alcanza 0.6. Se inocularon 100 mL de este cultivo con 10^{10} /mL de fago ayudante M13 e incubado a 37°C antes del centrifugado. El sedimento de célula resultante fue resuspendido en 500 mL de medio fresco 2xYT contenedor de Carbenicilin (100 ug/mL) y Kanamicin (35 ug/mL) y cultivado a 30°C durante la noche antes del centrifugado. Las partículas fago se precipitaron por adición de PEG/NaCl y almacenados a -80°C.

Una segunda biblioteca, BC6/FG7, fue designado para introducir diversidad en los giros B:C y F:G de Tencon simultáneamente. Con tal objeto, dos oligonucleótidos, Tc-BC6-For-5'phos y POP149 fueron sintetizados. El oligo delantero fue fosforilado y contenía 18 bases de codones NNS en cada posición codificando giros B:C, mientras que el oligo contrario fue biotinilado en el 5' final y contenía 21 bases de codones NNS en cada posición codificando el giro F:G. Ambos oligonucleótidos son flanqueados por dos secuencias de nucleótidos 18 bp idénticos en cada región y seguido de que la región fuera mutagenizada (ver más abajo para detalles).

Tc-BC6-For-5'phos: (SEQ ID NO:19)

gactctctgcgtctgtcttggNNSNNSNNSNNSNNSNNSSTTCGACTCTTTCCTGATCCAGTA
CC

POP 2149: (SEQ ID NO: 20)

GTGAATTCCGCAGACAGCGGSNNSNNSNNSNNSNNSNNSNNAACACCGTAGATA
GAAACGGTG

Para construir la biblioteca, se realizaron dieciséis reacciones de 100 uL PCR utilizando los oligos Tc-CB6-For5'phos y POP2149 para amplificar el modelo ADN Tencon, introduciendo codones NNS en giros B:C y F:G simultáneamente en el proceso. El producto de PCR de doble cadena se mezcló con perlas de estreptavidina magnética (Dylan) en solución amortiguadora B&W (10 mM Tris-HCl, pH7.5, 1m M EDTA, 2M NaCl, 0.1% Tween-20) e incubó durante 20 minutos, y rebajó magnéticamente y lavó dos veces con solución amortiguadora B&W. La cadena frontal se eluyó de las perlas con 300 uL de 150 mM NaOH. Este “mega-cebador”, una mezcla de cebadores largos con más de 8×10^{16} en diversidad teórica, fue utilizado para hibridarse con un modelo de biblioteca de cadenas simples. La construcción de la biblioteca se llevó a cabo tal y como se ha descrito anteriormente para la biblioteca EGZ.

EJEMPLO 3: Selección de uniones lg

Con objeto de realizar la selección de los miembros de la biblioteca Tencon que aglutinen IgG, se biotiniló el recombinante IgG (subtipo humano IgG1) utilizando sulfo-NHS-LC-Biotin (pierce) dializándolo antes en PBS. Para las selecciones, se bloquearon 200 μ L de bibliotecas FG7 representes de fago o BC6/FG7 con 200 μ L de bloqueador químico antes de la adición de igG biotinilado a concentraciones de 500 mM (ronda 1) o 100 mM (rondas 2 y 3). Se recuperaron los fago enlaces mediante perlas magnéticas de Neutravidina (Seradyn) en la ronda 1 o perlas magnéticas de estreptavidina (Promega) en las rondas 2 y 3. Los fagos no enlazados fueron lavados de las perlas empleando 5-10 lavados con 1 mL de Tris suero de solución amortiguadora con TBST seguido de 21 mL lavados con suero de solución amortiguadora (TBS). Los fago enlaces se eluyeron de las perlas mediante la adición de E. coli MC1061F⁺ de fase media-larga. Se emplataron las células infectadas en platos agar LB suplementados con carbenicilina y glucosa. Al día siguiente, se rasparon las células del plato y cultivaron con fase media-larga antes del recuento con fago ayudantes VCSM13 y cultivados durante la noche. Las partículas fago se aislaron por precipitación PEG/NaCl y emplearon para las selecciones de las siguientes rondas.

Después de tres rondas de lavado para retirar el IgG, se sub-clonó el producto a vector pET27 modificado para incluir un área de clonación independiente a la ligasa por amplificación del gen Tencon por PCR. Este producto PCR fue hibridizado con el vector y transformado en células BL21-GOLD(DE3) (Stratagene). Se colocaron colonias individuales en cultivos de 1 mL en platos Wells de profundidad 96 (Corning) y cultivados hasta la saturación durante la noche a 37°C. Al día siguiente, 50 microL del cultivo de la noche fueron empleados para inocular un cultivo fresco de 1 mL. Los cultivos crecieron a 37°C durante 2 horas antes de añadir el IPTG a 1 mM y reduciendo la temperatura a 30°C. Se recolectaron las células mediante centrifugado de 16 horas tras la inducción y lisadas con 100 microL de BugBuster (Novagen). Se clarificaron los lisados mediante centrifugación y empleados para testar por aglutinación con IgG con ELISA:

Se recubrieron platos Maxisorp (Nunc) con 0.1 µg de anticuerpo anti-HIS (Qiagen) durante la noche, lavaron con TBST, y bloquearon con Starting Block T20 (Thermo Scientific). Se añadieron los lisados clarificados diluidos en 1:4 de Starting Block a los platos para aglutinarse durante una hora antes del lavado con TBST. Se añadió IgG biotinilado o HSA biotinilado a una concentración de 1 µg/ml y lavó con TBST tras una hora de incubación. Se llevó a cabo la detección de enlaces IgG o HSA por adición de Estraptavidina-HRP (Jackson ImmunoResearch) y se detectó con sustrato luminiscente químico POD. Los resultados de ELISA se muestran en la Figura 7. Se secuenciaron constructos que enlazan IgG biotinilado 10 pliegues más que HSA biotinilado, tal y como se juzga por la señal ELISA. Después de terminar muchos experimentos de selección, se obtuvieron 60 secuencias únicas de uniones de la biblioteca FG7 y 10 secuencias únicas de la biblioteca BC6FG7; la Tabla 4 muestra secuencias representativas de uniones IgG en los cuales los giros B:C y/o F:G son mostrados de modo que son diferentes de aquellos del SEQ ID NO: 16. También se muestran en la Tabla 4 numerosas mutaciones en otras regiones del armazón.

La proteína Tencon aquí designada, expresada y purificada tiene una estabilidad térmica mejorada 26°C con respecto a la tercera del dominio FN3 de Tenascin humano, que ha sido utilizada como alternativa a la molécula de armazón. Basándose en este incremento de estabilidad, esta molécula de armazón es probable que sea más

sensible a la sustitución de amino ácidos y más fácil de fabricar. Las mutaciones que reducen la estabilidad de la proteína es probable que sean mejora toleradas en el contexto de un armazón más estable y así un armazón con estabilidad mejorada es probable que produzca uniones más funcionales y bien plegados de una biblioteca de variedades de armazón.

Tabla 1

```

(1) 1      10      20      30      40      50      60      70      80      90      100
1 (1) ---SPPKDLVVTEVTEETVNLAWDN-EMRVTEYLVVYTPH--EGGLEMQFRVPGDQTSTIIQLEPGVEYFIRVFAILENKKSI PV SARVAT-----
2 (1) TYLPAPEGLKFKSIKETSVEVEWDPDLIAFETWEIIFRNMN-KEDEGEITKSLRRPETS YRQTGLAPGQEY EISLHIVKNNTRGPGLKRVTTTRLD----
3 (1) ---DAPSQIEVKDVTDTTALITWFKPLAEIDGIELTYGIKD--VPGDRTTIDLTEDENQYSIGNLKPDTEYEVSLISRRGDMSSNPAKETFTT-----
4 (1) TGLDAPRNLRVSQTDNSITLEWRNGKAAIDSYRIKYAPISGGDHAEVDVPKSSQATTKTTLTGLRPGTEYIGVSAVKEDKESNPATINAATELDTPKD
5 (1) ---DTPKDLQVSETAETSLTLLWKTPLAKFDYRLNYSLPT---GQWVGVLPRNTTSYVLRGLEPGQEYNVLLTAEKGRHKS KPAKSKPARVK-----
6 (1) -QAPELENLTVTEVGDGLRLNWTAAADQAYEHFIIQVQEAN--KVEAARNLTVPGSLRAVDIPGLKAATPYTVSIYGVIIQGYRTPVLSAEASTGE-----
7 (1) -ETPNLGEVVVAEVDGALKLNWTAPEGAYEYFFIQVQEAD--TVEAAQNLTVPGLRSTDLPLGLKAATHYITIRGVTDQFSTTPLSVEVLTE-----
8 (1) -EVPDMGNLTVTEVSWDALRLNWTTPDGT YDQFTIQVQEAD--QVEEAHNLTVPGSLRSMEIPGLRAGTPYTVTLHGEVRGHSTRPLAVEVTE-----
9 (1) -DLPQLGDLAVSEVGDGLRLNWTAAADNAYEHFIIQVQEVN--KVEAAQNLTLPGLRAVDIPGLEAATPYRVSIYGVIRGYRTPVLSAEASTAKEPE--
10 (1) -KEPEIGNLNVSDITPESFNLSWMATDGI FETFTIEIIDS N--RLLETVEYNISGAERTAHISGLPPSTDFIVYLSGLAPSIRTKTISATATTE-----
11 (1) -ALPLENLTISDINPYGFTVSWMASENAFDSFLVTVDGSG--KLLDPQEFTLSGTQRKLELRGLITGIGYEVMSVSGFTQGHQTKPLRAEIVTE-----
12 (1) -AEPEVDNLLVSDATPDGFRLSWTADEGVDFDNFLKIRDTK--KQSEPLEITLLAPERTRDGLREATEYEIELYGISKGRRSQTVSAIATTAM-----
13 (1) ---GSPKEVIFSDITENSATVSWRAPTAQVESFRITYVPITG---GTPSMVTVDGKTQTRLVKLI PGVEYLVSI IAMKGFESEPVSGSFTTAL-----
14 (1) ---DGPSGLVTANITDSEALARWQPAIATVDSYVISYTG EK---VPEITRTVSGNTVEYALTDLEPATEYTLRIFAEKGPKQSSSTITAKFTTDL-----
15 (1) ---DSPRDLTATEVQSETALLTWPRRASVTGYLLVYESVD---GTVKEVIVGPDTTSYSLADLSPSTHYTAKIQALNGPLRSNMIQTIFTTIGL----

```

Tabla 2

Secuencia		Descripción	1st Suma de puntuación	2nd Suma de puntuación	Score suma (cadena)	Score sum (molécula)
Tenascina		Alt. Scaff.	6.01	5.85	11.86	11.86
Tencon		Alt. Scaff.	5.83	7.37	13.20	13.20
adalimumab	Vh	Humanizado mAb	9.45	8.06	17.50	45.42
	VI		15.29	12.63	27.92	
cetuximab	Vh	Quimérico mAb	17.63	16.89	34.52	64.44
	VI		14.45	14.47	29.92	
Rituximab	Vh	Quimérico mAb	16.57	14.38	30.96	61.65
	VI		16.63	14.06	30.69	
basiliximab	Vh	Quimérico mAb	16.48	13.40	29.89	59.98
	VI		16.05	13.05	29.09	

Tabla 3. Giros

Giro	Residuos de SEC ID NO:16	Secuencia de aminoacido
A-B	13-16	TEDS
B-C	22-28	TAPDAAF
C-D	38-43	SEKVG E
D-E	51-54	GSER
E-F	60-64	GLKPG
F-G	75-81	KGGHRSN

Tabla 4. Unión de armazones a IgG

Clon No.	B:C Giro Residuos 22-28(Sec ID N°)	F:G Giro Residuos 75-81 (Sec ID N°)	Mutaciones Scaffold
1	SYGFNN (21)	QIGPIIP (46)	
2	TYEGES (22)	QIGPIIP (46)	
3	TYESES (23)	QIGPIIP (46)	
4	TNWMDS (24)	SIRTIDS (47)	
5	KSVFIM (25)	PKFHSPL (48)	
6	YSSYAT (26)	WKTTIWF (49)	
7	RFHPFP (27)	RKNWKTR (50)	
8	MMCMPL (28)	RLFRIYQ (51)	
9	YCRVRD (29)	WLSRSYD (52)	
10	SYGFNN (21)	WLSRSYD (52)	
11	MDCFMG (30)	WLSRSCD (53)	
12	TYRFNS (31)	WMGPYCD (54)	
13	ASRRSL (32)	RRRRYSF (55)	
14	TIESES (33)	HIVPMVP (56)	
15	TL*MQS (34)	QIEPIIR (57)	
16	IYDSES (35)	PSAANNP (58)	
17		VRLRYVQ (59)	
18		QVGPLIP (60)	
19		RIGPILP (61)	
20		QIGPLLP (62)	
21		RIGPLLP (63)	
22		QVGPLLP (64)	
23		RIGPMLP (65)	

ES 2 730 693 T3

Continuación

Clon No.	B:C Giro Residuos 22-28(Sec ID N°)	F:G Giro Residuos 75-81 (Sec ID N°)	Mutaciones Scaffold
24		QIGPVLP (66)	
25		RIGPVLP (67)	
26		QIGPMMP (68)	
27		QVGPLVP (69)	
28		QIGPMLP (70)	R18P
29		QVGPILP (71)	
30		QVGPLL (64)	
31		QVGPMPLP (72)	
32		QIGPIVP (73)	133V
33		MIGPLL (74)	
34		QIGPLFP (75)	
35		QIGPVLP (66)	T59A
36		QIGPMVP (76)	
37		QIGPIVP (77)	
38		RIEPILP (78)	V74G
39		VAGSVWP (79)	
40		REGATLY (80)	
41		KQIPPIL (81)	S38G
42		LSLSSVL (82)	
43		HMLLPLP (83)	V74A
44		MIGPLIP (84)	
45		TIGPHIP (85)	
46		EIGPCLP (86)	
47		EIGPVLP (87)	
48		KIGPCLP (88)	Y35H
49		MIGPVLP (89)	
50		QIGPILP (90)	S52P
51		QIGPILP (90)	Q36R
52		QIGPILP (90)	
53		EVGPILP (91)	
54		QVGPLL (92)	A23T
55		QIGPVMP (93)	
56		QIGPCVP (94)	
57		QIGPLVP (95)	
58		RGLVMPM (96)	V74A
59		MIGPILP (97)	

ES 2 730 693 T3

Continuación

5	Clon No..	B:C Giro Residuos 22-28(Sec ID N°)	F:G Giro Residuos 75-81 (Sec ID N°)	Mutaciones Scaffold
	60		QIGPILP (90)	E37G
	61		QIGPILP (90)	T68A
10	62		QIGPILP (90)	T22I
	63		QIGPILP (90)	S52F
	64		QIGPILP (90)	Y56H
15	65		QIGPILP (90)	A44V
	66		QIGPILP (90)	P24S
	67		RIGPILP (61)	
20	68		CIGPMVP (98)	
	69		FIGPVLP (99)	
	70		HIGPILP (100)	
25	71		HIGPIMP (101)	
	72		HIGPYLP (102)	
	73		HVGPILP (103)	
30	74		IIGPLL (104)	
	75		LIGPLL (105)	
	76		MVGPLL (106)	
35	77		NIGPYLP (107)	
	78		NIGPYLP (108)	
	79		QIGPHLP (109)	
40	80		QIGPIIP (46)	
	82		QIGPILG (110)	
	83		QIGPILS (111)	
45	83		QIGPILT (112)	
	84		QIGPIMP (113)	
	85		QIGPIPI (114)	
50	86		QIGPLLN (115)	
	87		QIGPLL (62)	
	88		QIGPVFP (116)	
55	89		QIGPVLS (117)	
	90		QIGPWLP (118)	
	92		QVGPILP (71)	
60	93		QVGPILR (118)	
	94		QVGPIMN (119)	
	95		QVGPIMP (120)	
65	96		QVGPIVP (121)	

Continuación

5	Clon No..	B:C Giro Residuos 22-28(Sec ID N°)	F:G Giro Residuos 75-81 (Sec ID N°)	Mutaciones Scaffold
	97		QVGPLLS (122)	
10	98		QVGPVLP (123)	
	99		QVGPVLT (124)	
	100		RIGPIMP (125)	
15	101		RIGPIVP (126)	
	102		RIGPMFP (127)	
	103		RIGPMIP (128)	
20	104		RIGPMVP (129)	
	105		RIGPVIP (130)	
	106		RVGPILP (131)	
25	107		RVGPLLP (132)	
	108		TVGPHIP (133)	
	109	DRKRFI (36)	PSWRSNW (134)	
30	110	EFWRGS (37)	QIGPLLP (62)	
	111	GLLDPL (38)	ALRATLE (135)	
	112	GLVLPE (39)	KYGYLTP (136)	
35	113	MASDGL (40)	RIGPMLP (137)	
	114	NKTETN (41)	NPFCSRF (138)	
	115	QAERKV (42)	QIGPLLP (62)	
40	116	QAERKV (42)	RIGPLLP (63)	
	117	SQVCTL (43)	YYLHQWC (139)	
	118	YFDKDS (44)	QIGPLLP (62)	
45	119	YFECEP (45)	HIVPLLR (140)	

Secuencias:

50	SEC ID NO. 1:
	sppkdlvvteetvnlawdnemrvteylvvytpthegglemqfrvpgdqtstiiqelepgveyfirvf
55	ailenkksipvsarvat
	SEC ID NO. 2:
60	tylpapeglkfksetsvevewdpldiafetweiifrnmnkedegeitkslrrpetsyrqtglapgqey
	eishivknntrgpglkrvttrld
	SEC ID NO. 3:
65	dapsqievkdvtddtalitwfkplaeidgieltygikdvpgdrttidltedenqysignlkipdteyevsl
	isrrgdmssnpaketftt

SEC ID NO. 4

5 tgl daprn lrrv sqtd nsitle wrng kaaids yrikyapis gg dhaevdvpksqqattkttltglrpgte
ygigvsavkedkesnpatinaateldtpkd

SEC IDE NO. 5:

10 dtpkdlqvsetaetsltllwktplakfdryrl nyslptggwvgvqlprnttsyvlrglepggqeynvlta
ekgrhk skpakskparvk

SEC IDE NO. 6:

15 gapelenltvtevgwdglrlnwtaadqayehfiiqvqean kveaarnltvp gslravdipglkaatpytv
siygviqgyrtpvlsaeastge

SEC IDE NO. 7:

20 etpnlgev vvaevgwdalklnwtapegayeyffiqvqeadtveaaqnltpvgglrstdlpglkaathyti
tirgvtqdfsttplsvevlte

SEC ID NO. 8:

25 evpdmgnltvtevs wdalrlnwtt pdgtydqftiqvqeadqveeahnltvp gslrsmeipglragtpytv
30 tlhgevrghstrplavevte

SEC ID NO. 9:

35 dlpqlgd lavsevgwdglrlnwtaadnayehfviqvqevnkveaaqnltpgslravdipgleaatpyrv
siygvirgyrtpvlsaeastakepe

SEC IDE NO. 10:

40 kepeignlnvsditpesfnlswmatdgifetftieidsnrll etveynisgaertahisglppstdfiv
ylsglapsirtktisatatte

SEC ID NO. 11:

45 alpllenltisdinpygftvswmasenafdsflvtvvdsgklldpgeftlsgtqrklelrglitgigyev
msgftqghqtkplraeivte

SEC IDE NO. 12:

50 aepevdnllvsdatpdgfrlswtadegvfdnfv lkirdtkkqsepleitllapertrdltglreateyei
elygiskgrrsqtv saiattam

SEC ID NO. 13:

55 gspkevifsditensatvswraptaqvesfrityvpitggtpsmvtvdgktqtrlvklipgveylvsii
amkgfeesepvsgsfttal

SEC IDE NO. 14:

60 dgpsglvtanitdsealarwqpaiatvdsyvisytgekvpeitrtvsgntveyaltdlepatetylrifa
ekgpqksstitakfttdl

SEC IDE NO. 15:

65

dsprdlrtatevqsetalltwrpprasvtgyllvyesvdgtvkevivgpdttssysladlspsthytakiqa
lngplrsnmiqtifttigl

5 SEC IDE NO. 16:

LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSEFLIQYQESEKVGGEAINLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVS
IYGVKGGHRSNPLSAEFTT

10 SEC ID NO. 17:

ctgccggcgccgaaaaacctggttggtttctgaagttaccgaagactctctgcggtctgtcttgaccgcgc
cggacgcggcggttcgactctttctgatccagtaggaatctgaaaaagttggtgaagcgatcaacct
15 gaccgttccgggttctgaacgttcttacgacctgaccggtctgaaacgggtaccgaatacaccgtttct
atctacgggtgttaaaggtggtcaccggttctaaccgctgtctgcggaattcaccacc

Secuencia Tencon mostrando bucles (SEC ID NO:16)

20

A-B B-C C-D
1-LPAPKNLVVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSEFLIQYQESEKVGGEA-44

25

D-E E-F F-G
45-INLTVPGSERSYDLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT-89

30 **EJEMPLO 4: Estabilizando las Mutaciones de Tencon**

Las mutaciones se diseñaron para mejorar la estabilidad de doblado del armazón Tencon descrito anteriormente en la presente (SEQ ID NO: 16). Se realizaron mutaciones de diversos puntos para producir la sustitución de residuos individuales de SEQ ID NO: 16, tales como N46V (Tencon 17-SEQ ID NO:142), E14P (Tenco18-SEQ ID NO:143), E11N (Tencon 19-SEQ ID NO:144), E37P (Tencon20-SEQ ID NO:145) y G73Y (Tencon 21-SEQ ID NO:146) de los cuales se predijo que mejorarían la estabilidad mediante el programa PoPMuSiC v2.0 (Dehouck, Grosfils et al. 2009). El mutante E86I (Tencon22-SEQ ID NO:147) se había hallado anteriormente para estabilizar una proteína homóloga, el tercer dominio FN3 de Tenascin humano (WO2009/086116²). Finalmente, se descubrió que la mutación L17A estabiliza significativamente el Tencon durante los experimentos de escaneado de alanina en los cuales todos los residuos de los giros de Tencon fueron reemplazados por alanina independientemente (no se muestran datos). Siguiendo a la ronda inicial de ensayos de estabilidad (ver más abajo), se produjeron para aumentar aún más la estabilidad los mutantes combinables N46V/E86I (Tencon23-SEQ ID NO:148), E14P/N46V/E86I (Tencon24-SEQ ID NO:149) y L17A/N46V/E86I (Tencon 25-SEQ ID NO:150).

45 **Expresión y purificación**

Se realizaron las mutaciones en las secuencias codificadoras de Tencon utilizando el kit de muta génesis QuickChange (Stratagene). Los plásmidos resultantes se transformaron en BL21-GOLD (DE3) E. coli (Stratagene) para la expresión. Se recogió una colonia sencilla y se cultivó durante la noche a 37°C en 2 mL de medio TB que contiene 100 µg/ml de ampicilina. Este cultivo se empleó para sembrar 100 mL de medio de autoinducción (Overnight Express Instant TB media, Novageen) en un matraz de deflectores de 500 mL y cultivado a 37°C durante 16 horas.

Se recolectó el cultivo mediante centrifugado a 400xg por 20 minutos y se re suspendieron las células sedimentadas en 5 mL de BugBuster HT (Novagen) por gramo de sedimento de célula húmeda. Tras 30 minutos de incubación a temperatura ambiente, se clarificaron los lisados mediante centrifugado a 30.000xg por 20 minutos y cargados en 3 mL de columna de superflujo Ni-NTA (Novagen) por gravedad. Tras la carga, se lavó cada columna con 15 mL de una solución amortiguadora de 50 mM de fosfato de sodio pH 7.4, 500 mM NaCl y 10 mM de imidazol. Después se eluyó la proteína de enlace de la columna utilizando 10 mL de una solución amortiguadora de 50 mM de fosfato de sodio pH 7.4, 500 mM NaCl y 250 mM de imidazol. Se evaluó la pureza de la proteína mediante SDS-PAGE. Antes del análisis biofísico, se dializó cada mutante a fondo en PBS pH 7.4. Se obtuvieron 28-33 mg de proteína purificada por cada mutante de un cultivo de 100 mL.

Caracterización de la Estabilidad Térmica

Se midió la estabilidad térmica del Tencon original y cada mutación mediante calorímetro diferencial de

escaneado capilar (DSC). Cada muestra se dializó extensivamente contra PBS pH 7.4 y diluyó en una concentración de 2-3 mg/mL. Se midieron las temperaturas de fusión para dichas muestras utilizando un VP-DSC instrumento equipado con inyector automático (MicroCal, LLC). Se calentaron las muestras de 10°C a 95°C o 100°C en un ratio de 1°C por minuto. Solo se realizó un escáner de solución amortiguadora entre cada muestra para calcular una línea base para la integración. Se adecuaron los datos para un modelo de despliegue de dos etapas seguido de la substracción de la única señal de la solución amortiguadora. Se determinó reversibilidad de la desnaturalización térmica por repetición del escaneado de cada muestra sin eliminarla de la célula. Se calculó la reversibilidad comparando el área bajo la curva del primer y segundo escaneados. Se presentan los resultados los experimentos DSC en la Tabla 5 así como los valores derivados de las curvas de fusión completa. Los mutantes simples Tencon17, Tencon18, Tencon 19 y Tencon 22 mejoran la estabilidad térmica comparada con la secuencia Tencon original. Solo el Tencon21 resultó significativamente desestabilizante. Las muestras de mutantes combinatorios Tencon23, Tencon24 y Tencon25 mejoran significativamente la estabilidad, indicando que las mutaciones diseñadas son aditivas con respecto a la mejora de la estabilidad térmica.

Desnaturalización por Hidrocloruro de Guanidina

Se empleó para mejorar la estabilidad, la habilidad del Tencon y cada mutante para mantenerse enlazados durante el tratamiento con concentraciones crecientes de Hidrocloruro de Guanidina (GdmCl), tal y como se había medido por fluorescencia de triptófano. El Tencon contiene sólo un residuo de triptófano. El residuo de triptófano es enterrado en el núcleo hidrofóbico y así la emisión fluorescente a 360 nm es una medida sensible del estado plegado de la proteína. Para producir una valoración de 17 puntos se pipetearon 200 uL de solución de 50 mM de sodio fosfato pH 7.0, 150 mM NaCl y concentraciones variables de GdmCl de 0.48 a 6.63 M en platos Well-96 (Greiner), negros, no uniones. Se añadieron 10 uL de una solución que contiene los mutantes de Tencon a cada plato Well para crear una nueva concentración final de proteína de 23 uM y mezcló y pipeteó suavemente hacia arriba y hacia abajo. Después de la incubación a temperatura ambiente durante 24 horas, se leyó la fluorescencia utilizando un plato lector Spectramaz M5 (Molecular Devices) con excitación de 280 nm y emisión de 360 nm. Los datos generados de cada curva se muestran en la Figura 8. La señal de fluorescencia se convirtió en fracción de despliegue mediante la ecuación (Pace 1986 Methods Enzymol 131: 266-80):

$$f_u = (y_F - y) / (y_F - y_U)$$

Donde y_F es la señal fluorescente de la muestra plegada y y_U de la muestra desplegada. Los puntos intermedios de la transición al despliegue e inclinación de la transición fueron determinados mediante la siguiente ecuación (Clarke, Hamill et al. 1997):

$$F = \frac{(\alpha_N + \beta_N[D]) + (\alpha_D + \beta_D[D]) \exp(m([D] - [D]_{50\%})/RT)}{1 + \exp(m([D] - [D]_{50\%})/RT)}$$

Donde F es la fluorescencia en la concentración desnaturalizante dada, α_N y α_D son los interceptores-y de los estados naturales y desnaturalizados, β_N y β_D son las inclinaciones de las líneas base de los estados naturales y desnaturalizados, $[D]$ es la concentración de GdmCl, $[D]_{50\%}$ la concentración de GdmCl en el punto en el que el 50% de la muestra es desnaturalizada, m la pendiente de la transición, R la constante de gas, y T la temperatura. La energía de pliegue liberada por cada muestra se estimó utilizando la ecuación (Pace 1986 supra; Clarke, Hamill et al. 1997 J Mol Biol 270(5): 771-8): $\Delta G = m[D]_{50\%}$

A menudo resulta difícil medir con precisión la pendiente de la transición, m , para dichas curvas. Adicionalmente, se espera que las mutaciones descritas no alteren el mecanismo de plegado del Tencon. De este modo, se midió el valor m para cada mutante y se realizó la media de los valores (Pace 1986 supra) para producir una $m=3544$ cal/mol/M utilizada para todos los cálculos de energía liberada. Los resultados de estos cálculos se presentan en la Tabla 5. Los resultados para los experimentos del despliegue de GdmCl demuestran que los mismos mutantes que estabilizan el Tencon con respecto a la estabilidad térmica también estabilizan la proteína contras la desnaturalización inducida de GdmCl.

Cromatografía de Exclusión por Tamaños

La cromatografía de exclusión por tamaños (SEC) fue empleada para valorar el estado de agregación del Tencon WT con cada mutante. Se inyectaron 5 uL de cada muestra en columna Superdex 75 5/150 (GE Healthcare) con un ratio de flujo 0.3 mL/min con una fase móvil PBS. Se monitorizó la elución de la columna por absorbancia 280nm. Con el objeto de valorar el estado de agregación, la columna fue previamente calibrada con estándares de peso molecular globular (Sigma). Todas las muestras examinadas, con excepción del Tencon 21, se eluyeron en un pico en un volumen de elución consistente en una muestra monomérica. Tencon 21 eluyó en dos picos, indicando la presencia de agregados.

Tabla 5.

Construct	Mutations	Tm (Kcal)	[D] _{50%} (M)	⊗G (H ₂ O) (kcal/mol)
Tencon 16 (SEQ ID NO: 16)		78.04	3.4	12.0
Tencon17 (SEQ ID NO:142)	N46V	81.88	3.6	12.8
Tencon18 (SEQ ID NO:143)	E14P	82.77	3.5	12.4
Tencon19 (SEQ ID NO:144)	E11N	79.00	3.4	12.0
Tencon20 (SEQ ID NO:145)	E37P	77.40	3.4	12.0
Tencon21 (SEQ ID NO:146)	G73Y	67.56	2.4	8.5
Tencon22 (SEQ ID NO:147)	E86I	82.78	3.7	13.1
Tencon23 (SEQ ID NO:148)	N46V/E86I	86.65	4.1	14.5
Tencon24 (SEQ ID NO:149)	E14P/N46V/E86I	87.47	4.0	14.2
Tencon25 (SEQ ID NO:150)	L17A/N46V/E86I	92.73	5.1	18.1
Tencon26 (SEQ ID NO:151)	L17A	84.9	4.6	16.2

LISTADO DE SECUENCIAS

<110> JANSEN BIOTECH, INC.

<120> COMPOSICIONES DEL DOMINIO DE FIBRONECTINA ESTABILIZADOS, MÉTODOS Y USOS

<130> P068406EP

<140> PCT/US11/34512

<141> 2011-04-29

<150> EP 11775616.3

<151> 2011-04-29

<150> PCT/US11/34512

<151> 2011-04-29

<150> 61/329980

<151> 2010-04-30

<160> 151

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 87

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 1

```

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

```

<210> 2
 <211> 95
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 2

```

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

        Ala Pro Gly Gln Glu Tyr Glu Ile Ser Leu His Ile Val Lys Asn Asn
        65          70          75          80
20      Thr Arg Gly Pro Gly Leu Lys Arg Val Thr Thr Thr Arg Leu Asp
          85          90          95
    
```

<210> 3
 <211> 88
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 3

```

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

<210> 4
 <211> 100
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 4

```

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

        Thr Pro Lys Asp
          100
    
```

<210> 5
 <211> 88

ES 2 730 693 T3

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 5

5

```

Asp Thr Pro Lys Asp Leu Gln Val Ser Glu Thr Ala Glu Thr Ser Leu
 1      5      10      15
Thr Leu Leu Trp Lys Thr Pro Leu Ala Lys Phe Asp Arg Tyr Arg Leu
      20      25      30
Asn Tyr Ser Leu Pro Thr Gly Gln Trp Val Gly Val Gln Leu Pro Arg
      35      40      45
Asn Thr Thr Ser Tyr Val Leu Arg Gly Leu Glu Pro Gly Gln Glu Tyr
      50      55      60
Asn Val Leu Leu Thr Ala Glu Lys Gly Arg His Lys Ser Lys Pro Ala
      65      70      75      80
Lys Ser Lys Pro Ala Arg Val Lys
                        85

```

10

15

<210> 6

20

<211> 92

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 6

25

```

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

```

30

35

<210> 7

40

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 7

45

```

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

Ala Thr His Tyr Thr Ile Thr Ile Arg Gly Val Thr Gln Asp Phe Ser
      65      70      75      80
Thr Thr Pro Leu Ser Val Glu Val Leu Thr Glu
                        85      90

```

50

55

<210> 8

60

<211> 91

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 8

65

ES 2 730 693 T3

	Glu	Val	Pro	Asp	Met	Gly	Asn	Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Val	Ser	Trp	Asp
	1				5					10					15	
5	Ala	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr	Thr	Pro	Asp	Gly	Thr	Tyr	Asp	Gln	Phe
				20					25					30		
	Thr	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Ala	Asp	Gln	Val	Glu	Glu	Ala	His	Asn	Leu
			35					40					45			
	Thr	Val	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Ser	Met	Glu	Ile	Pro	Gly	Leu	Arg	Ala
		50					55					60				
10	Gly	Thr	Pro	Tyr	Thr	Val	Thr	Leu	His	Gly	Glu	Val	Arg	Gly	His	Ser
	65					70					75					80
	Thr	Arg	Pro	Leu	Ala	Val	Glu	Val	Val	Thr	Glu					
					85					90						
	<210> 9															
	<211> 95															
15	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
	<400> 9															
20	Asp	Leu	Pro	Gln	Leu	Gly	Asp	Leu	Ala	Val	Ser	Glu	Val	Gly	Trp	Asp
	1				5					10					15	
	Gly	Leu	Arg	Leu	Asn	Trp	Thr	Ala	Ala	Asp	Asn	Ala	Tyr	Glu	His	Phe
				20					25					30		
	Val	Ile	Gln	Val	Gln	Glu	Val	Asn	Lys	Val	Glu	Ala	Ala	Gln	Asn	Leu
			35					40					45			
25	Thr	Leu	Pro	Gly	Ser	Leu	Arg	Ala	Val	Asp	Ile	Pro	Gly	Leu	Glu	Ala
		50					55					60				
	Ala	Thr	Pro	Tyr	Arg	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Ile	Arg	Gly	Tyr	Arg
	65					70					75					80
	Thr	Pro	Val	Leu	Ser	Ala	Glu	Ala	Ser	Thr	Ala	Lys	Glu	Pro	Glu	
30					85					90					95	
	<210> 10															
	<211> 91															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
35	<400> 10															
	Lys	Glu	Pro	Glu	Ile	Gly	Asn	Leu	Asn	Val	Ser	Asp	Ile	Thr	Pro	Glu
	1				5					10					15	
40	Ser	Phe	Asn	Leu	Ser	Trp	Met	Ala	Thr	Asp	Gly	Ile	Phe	Glu	Thr	Phe
			20						25					30		
	Thr	Ile	Glu	Ile	Ile	Asp	Ser	Asn	Arg	Leu	Leu	Glu	Thr	Val	Glu	Tyr
			35					40					45			
	Asn	Ile	Ser	Gly	Ala	Glu	Arg	Thr	Ala	His	Ile	Ser	Gly	Leu	Pro	Pro
45		50					55					60				
	Ser	Thr	Asp	Phe	Ile	Val	Tyr	Leu	Ser	Gly	Leu	Ala	Pro	Ser	Ile	Arg
	65					70					75					80
	Thr	Lys	Thr	Ile	Ser	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Glu					
					85					90						
50	<210> 11															
	<211> 91															
	<212> PRT															
	<213> Homo sapiens															
55	<400> 11															
	Ala	Leu	Pro	Leu	Leu	Glu	Asn	Leu	Thr	Ile	Ser	Asp	Ile	Asn	Pro	Tyr
	1				5					10					15	
	Gly	Phe	Thr	Val	Ser	Trp	Met	Ala	Ser	Glu	Asn	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe
				20					25					30		
60	Leu	Val	Thr	Val	Val	Asp	Ser	Gly	Lys	Leu	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Phe
			35					40					45			
	Thr	Leu	Ser	Gly	Thr	Gln	Arg	Lys	Leu	Glu	Leu	Arg	Gly	Leu	Ile	Thr
		50					55					60				
	Gly	Ile	Gly	Tyr	Glu	Val	Met	Val	Ser	Gly	Phe	Thr	Gln	Gly	His	Gln
65	65					70					75					80
	Thr	Lys	Pro	Leu	Arg	Ala	Glu	Ile	Val	Thr	Glu					
					85					90						

<210> 12
<211> 92
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 12

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

<210> 13
<211> 89
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 13

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

<210> 14
<211> 88
<212> PRT
<213> Homo sapiens

<400> 14

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

<210> 15
<211> 89
<212> PRT
<213> Homo sapiens

ES 2 730 693 T3

<400> 15

```

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

```

<210> 16

<211> 89

<212> PRT

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Polipéptido de unión

<400> 16

```

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

```

<210> 17

<211> 267

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<223> Nucleotide encoding binding polynucleotide

<400> 17

```

ctgccggcgc cgaacaaacct ggttggtttct gaagttaccg aagactctct gcgtctgtct 60
tggaccgcgc cggacgcggc gttcgactct ttcctgatcc agtaccagga atctgaaaaa 120
ggttggtgaag cgatcaacct gaccgttccg ggttctgaac gttcttacga cctgaccggg 180
ctgaaaccgg gtaccgaata caccgtttct atctacggtg ttaaaggtgg tcaccgttct 240
aaccgcgtgt ctgcggaatt caccacc

```

<210> 18

<211> 68

<212> ADN

<213> Secuencia Artificial

<220>

<221> desconocido

<222> (28) (29) (31) (32) (34) (35) (37) (38) (40) (41) (43) (49) (46) (47)

<223> Cebador en el que la n puede ser representada por a, c, t o g

<400> 18

ES 2 730 693 T3

gaatacacccg tttctatcta cgggtgttnns nnsnnsnnsn nsnnnsnscg gctgtctgcg 60
 <210> 19 gaattcac 68
 <211> 64
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 5
 <220>
 <221> desconocido
 <222> (22) (23) (25) (26) (28) (29) (31) (32) (34) (35) (37) (38)
 <223> Cebador en el que la n puede ser representada por a, c, t o g
 10
 <400> 19
 gactctctgc gtctgtcttg gnnsnnsnns nnsnnsnnt tcgactcttt cctgatccag 60
 tacc 64
 15
 <210> 20
 <211> 63
 <212> ADN
 <213> Secuencia Artificial
 20
 <220>
 <221> desconocido
 <222> (21) (22) (23) (24) (25) (26) (27) (28) (29) (30) (31) (32) (33) (34) (35) (36) (37) (38) (39) (40) (41)
 <223> Cebador en el que la n puede ser representada por a, c, t o g y s puede ser representado por g o c.
 25
 <400> 20
 gtgaattccg cagacagcgg snnsnnsnns nnsnnsnnsn naacaccgta gatagaaacg 60
 gtg 63
 30
 <210> 21
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 35
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 40
 <400> 21
 Ser Tyr Gly Phe Asn Asn
 1 5
 45
 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 50
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 55
 <400> 22
 Thr Tyr Glu Gly Glu Ser
 1 5
 60
 <210> 23
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia Artificial
 65
 <220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 23

5 **Thr Tyr Glu Ser Glu Ser**
 1 5

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 24

20 **Thr Asn Trp Met Asp Ser**
 1 5

<210> 25

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 25

35 **Lys Ser Val Phe Ile Met**
 1 5

<210> 26

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 26

45 **Tyr Ser Ser Tyr Ala Thr**
 1 5

<210> 27

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 27

60 **Arg Phe His Pro Phe Pro**
 1 5

<210> 28

<211> 6

65

<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 28

Met Met Cys Met Pro Leu
1 5

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 29

Tyr Cys Arg Val Arg Asp
1 5

<210> 30
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 30

Met Asp Cys Phe Met Gly
1 5

<210> 31
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
<400> 31

Thr Tyr Arg Phe Asn Ser
1 5

<210> 32
<211> 6
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 32

Ala Ser Arg Arg Ser Leu
1 5

5	<210> 33 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
10	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
15	<400> 33 Thr Ile Glu Ser Glu Ser 1 5
20	<210> 34 <211> 5 <212> PRT <213> Secuencia artificial
25	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
30	<400> 34 Thr Leu Met Gln Ser 1 5
35	<210> 35 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
40	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
45	<400> 35 Ile Tyr Asp Ser Glu Ser 1 5
50	<210> 36 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
55	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
60	<400> 36 Asp Arg Lys Arg Phe Ile 1 5
65	<210> 37 <211> 6 <212> PRT <213> Secuencia artificial
	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
	<400> 37 Glu Phe Trp Arg Gly Ser 1 5
	<210> 38 <211> 6

<212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 38

Gly Leu Leu Asp Pro Leu
1 5

 10
 <210> 39
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 15
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 39

Gly Leu Val Leu Pro Glu
1 5

 20
 <210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 25
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 40

Met Ala Ser Asp Gly Leu
1 5

 30
 <210> 41
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 35
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 41

Asn Lys Thr Glu Thr Asn
1 5

 40
 <210> 42
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 45
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 42

Gln Ala Glu Arg Lys Val
1 5

 50
 <210> 43
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

 55
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 43

<400> 43

5 **Ser Gln Val Cys Thr Leu**
 1 5

<210> 44

10 <211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

15 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 44

20 **Tyr Phe Asp Lys Asp Ser**
 1 5

<210> 45

<211> 6

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

25

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 45

30 **Tyr Phe Glu Cys Glu Pro**
 1 5

<210> 46

<211> 7

35 <212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

40 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 46

45 **Gln Ile Gly Pro Ile Ile Pro**
 1 5

<210> 47

<211> 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

50

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 47

55 **Ser Ile Arg Thr Ile Asp Ser**
 1 5

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

60 <213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

65

<400> 48

		Pro Lys Phe His Ser Pro Leu
		1 5
5	<210> 49 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 49	
15		Trp Lys Thr Thr Ile Trp Phe
		1 5
20	<210> 50 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
25	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 50	
30		Arg Lys Asn Trp Lys Thr Arg
		1 5
35	<210> 51 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
40	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 51	
		Arg Leu Phe Arg Ile Tyr Gln
		1 5
45	<210> 52 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
50	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 52	
		Trp Leu Ser Arg Ser Tyr Asp
		1 5
55	<210> 53 <211> 7 <212> PRT	
60	<213> Secuencia artificial <220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 53	
65		Trp Leu Ser Arg Ser Cys Asp
		1 5

<210> 54
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 54

Trp Met Gly Pro Tyr Cys Asp
1 5

<210> 55
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 55

Arg Arg Arg Arg Tyr Ser Phe
1 5

<210> 56
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 56

His Ile Val Pro Met Val Pro
1 5

<210> 57
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 57

Gln Ile Glu Pro Ile Ile Arg
1 5

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 58

Pro Ser Ala Ala Asn Asn Pro
1 5

<210> 59
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

5 <400> 59

Val Arg Leu Arg Tyr Val Gln
1 5

10 <210> 60
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 60

Gln Val Gly Pro Leu Ile Pro
1 5

20 <210> 61
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 61

Arg Ile Gly Pro Ile Leu Pro
1 5

30 <210> 62
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

40 <400> 62

Gln Ile Gly Pro Leu Leu Pro
1 5

45 <210> 63
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 63

Arg Ile Gly Pro Leu Leu Pro
1 5

55 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 64

Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro
1 5

5 <210> 65
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 65

Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro
 1 5

15 <210> 66
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 66

Gln Ile Gly Pro Val Leu Pro
 1 5

25 <210> 67
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

35 <400> 67

Arg Ile Gly Pro Val Leu Pro
 1 5

40 <210> 68
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 68

Gln Ile Gly Pro Met Met Pro
 1 5

50 <210> 69
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 69

Gln Val Gly Pro Leu Val Pro
 1 5

60 <210> 70
 <211> 7
 <212> PRT

65

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 70

Gln Ile Gly Pro Met Leu Pro
1 5

<210> 71

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 71

Gln Val Gly Pro Ile Leu Pro
1 5

<210> 72

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 72

Gln Val Gly Pro Met Leu Pro
1 5

<210> 73

$\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

$\langle 220 \rangle$

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 73

Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro
1 5

<210> 74

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 74

Met Ile Gly Pro Leu Leu Pro
1 5

<210> 75

 $\langle 211 \rangle$ 7

<212> PRT

<213> Secuencia artificial

<220>

<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

	<400> 75	
		Gln Ile Gly Pro Leu Phe Pro
		1 5
5	<210> 76 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 76	
		Gln Ile Gly Pro Met Val Pro
15		1 5
	<210> 77 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
20	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
25	<400> 77	
		Gln Ile Gly Pro Ile Val Pro
		1 5
30	<210> 78 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 78	
		Arg Ile Glu Pro Ile Leu Pro
40		1 5
	<210> 79 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
45	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
50	<400> 79	
		Val Ala Gly Ser Val Trp Pro
		1 5
55	<210> 80 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
60	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 80	
		Arg Glu Gly Ala Thr Leu Tyr
65		1 5

<210> 81
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 81

Lys Gln Ile Pro Pro Ile Leu
1 5

<210> 82
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 82

Leu Ser Leu Ser Ser Val Leu
1 5

<210> 83
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 83

His Met Leu Leu Pro Leu Pro
1 5

<210> 84
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 84

Met Ile Gly Pro Leu Ile Pro
1 5

<210> 85
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 85

Thr Ile Gly Pro His Ile Pro
1 5

<210> 86
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

<220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

5 <400> 86

Glu Ile Gly Pro Cys Leu Pro
 1 5

10 <210> 87
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 87

Glu Ile Gly Pro Val Leu Pro
 1 5

20 <210> 88
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

25 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 88

Lys Ile Gly Pro Cys Leu Pro
 1 5

30 <210> 89
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

35 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

40 <400> 89

Met Ile Gly Pro Val Leu Pro
 1 5

45 <210> 90
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 90

Gln Ile Gly Pro Ile Leu Pro
 1 5

55 <210> 91
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 91

Glu Val Gly Pro Ile Leu Pro
 1 5

65

5 <210> 92
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 92

Gln Val Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

15 <210> 93
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 93

Gln Ile Gly Pro Val Met Pro
 1 5

25 <210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 94

Gln Ile Gly Pro Cys Val Pro
 1 5

35 <210> 95
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

45 <400> 95

Gln Ile Gly Pro Leu Val Pro
 1 5

50 <210> 96
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 96

Arg Gly Leu Val Met Pro Met
 1 5

60 <210> 97
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

65

		His Ile Gly Pro Tyr Leu Pro
		1 5
5	<210> 103 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
10	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 103	
		His Val Gly Pro Ile Leu Pro
15		1 5
20	<210> 104 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 104	
25		Ile Ile Gly Pro Leu Leu Pro
		1 5
30	<210> 105 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
35	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 105	
		Met Val Gly Pro Leu Leu Pro
40		1 5
45	<210> 106 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
	<400> 106	
50		Met Val Gly Pro Leu Leu Pro
		1 5
55	<210> 107 <211> 7 <212> PRT <213> Secuencia artificial	
	<220> <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia	
60	<400> 107	
		Asn Ile Gly Pro Tyr Leu Pro
65		1 5
	<210> 108 <211> 7	

5
 <210> 119
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 119

Gln Val Gly Pro Ile Met Asn
1 5

15
 <210> 120
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 120

Gln Val Gly Pro Ile Met Pro
1 5

25
 <210> 121
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 121

Gln Val Gly Pro Ile Val Pro
1 5

35
 <210> 122
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 122

Gln Val Gly Pro Leu Leu Ser
1 5

45
 <210> 123
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

50
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 123

Gln Val Gly Pro Val Leu Pro
1 5

55
 <210> 124
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60
 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
 <400> 124

Gln Val Gly Pro Val Leu Pro
1 5

65
 <210> 125
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

<220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

5 <400> 124

Gln Val Gly Pro Val Leu Pro
1 5

10 <210> 125
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

15 <220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 125

Arg Ile Gly Pro Ile Met Pro
1 5

20 <210> 126
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

25 <220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 126

Arg Ile Gly Pro Ile Val Pro
1 5

30 <210> 127
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

35 <220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

40 <400> 127

Arg Ile Gly Pro Met Phe Pro
1 5

45 <210> 128
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

50 <220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 128

Arg Ile Gly Pro Met Ile Pro
1 5

55 <210> 129
<211> 7
<212> PRT
<213> Secuencia artificial

60 <220>
<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 129

Arg Ile Gly Pro Met Val Pro
1 5

65

5 <210> 130
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

10 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 130

Arg Ile Gly Pro Val Ile Pro
 1 5

15 <210> 131
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 131

Arg Val Gly Pro Ile Leu Pro
 1 5

25 <210> 132
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

30 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

35 <400> 132

Arg Val Gly Pro Leu Leu Pro
 1 5

40 <210> 133
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

45 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 133

Thr Val Gly Pro His Ile Pro
 1 5

50 <210> 134
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55 <220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 134

Pro Ser Trp Arg Ser Asn Trp
 1 5

60 <210> 135
 <211> 7
 <212> PRT

65

	<213> Secuencia artificial
	<220>
5	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
	<400> 135
	Ala Leu Arg Ala Thr Leu Glu
	1 5
10	<210> 136
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
15	<220>
	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
	<400> 136
20	Lys Tyr Gly Tyr Leu Thr Pro
	1 5
	<210> 137
	<211> 7
	<212> PRT
25	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
30	<400> 137
	Arg Ile Gly Pro Met Leu Pro
	1 5
	<210> 138
	<211> 7
35	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
	<220>
	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
40	<400> 138
	Asn Pro Phe Cys Ser Arg Phe
	1 5
45	<210> 139
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
50	<220>
	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
	<400> 139
	Tyr Tyr Leu His Gln Trp Cys
	1 5
55	<210> 140
	<211> 7
	<212> PRT
	<213> Secuencia artificial
60	<220>
	<223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia
	<400> 140
65	His Ile Val Pro Leu Leu Arg
	1 5

<210> 141
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

5

<220>
 <223> Andamios de proteínas basada en un tipo fibronectina humana III (FN3) Dominio de secuencia

<400> 141

10

Thr Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 142
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

15

<220>
 <223> Polipéptido de unión

20

<400> 142

25

Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
 Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
 20 25 30

30

Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Val Leu Thr
 35 40 45
 Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Gly Val Lys Gly Gly His Arg Ser
 65 70 75 80
 Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85

35

<210> 143
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Polipéptido de unión

40

<400> 143

45

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

50

<210> 144
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

55

<220>
 <223> Polipéptido de unión

60

<400> 144

65

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

15 <210> 145
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Polipéptido de unión

20 <400> 145

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

35 <210> 146
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido de unión

45 <400> 146
 Leu Pro Ala Pro Lys Asn Leu Val Val Ser Glu Val Thr Glu Asp Ser
 1 5 10 15
Leu Arg Leu Ser Trp Thr Ala Pro Asp Ala Ala Phe Asp Ser Phe Leu
 20 25 30
Ile Gln Tyr Gln Glu Ser Glu Lys Val Gly Glu Ala Ile Asn Leu Thr
 35 40 45
Val Pro Gly Ser Glu Arg Ser Tyr Asp Leu Thr Gly Leu Lys Pro Gly
 50 55 60
50 Thr Glu Tyr Thr Val Ser Ile Tyr Tyr Val Lys Gly Gly His Arg Ser
 65 70 75 80
Asn Pro Leu Ser Ala Glu Phe Thr Thr
 85

55 <210> 147
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polipéptido de unión

65 <400> 147

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

15 <210> 148
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

20 <220>
 <223> Polipéptido de unión

 <400> 148

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

35 <210> 149
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

40 <220>
 <223> Polipéptido de unión

 <400> 149

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

55 <210> 150
 <211> 89
 <212> PRT
 <213> Secuencia artificial

60 <220>
 <223> Polipéptido de unión

65 <400> 1

	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Glu	Asp	Ser
	1				5					10					15	
5	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Leu
				20					25					30		
	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Val	Leu	Thr
			35					40					45			
	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly
		50					55					60				
10	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	His	Arg	Ser
	65					70					75					80
	Asn	Pro	Leu	Ser	Ala	Ile	Phe	Thr	Thr							
					85											
15	<210> 151															
	<211> 89															
	<212> PRT															
	<213> Secuencia artificial															
20	<220>															
	<223> Polipéptido de unión															
	<400> 151															
25	Leu	Pro	Ala	Pro	Lys	Asn	Leu	Val	Val	Ser	Glu	Val	Thr	Glu	Asp	Ser
	1				5					10					15	
	Ala	Arg	Leu	Ser	Trp	Thr	Ala	Pro	Asp	Ala	Ala	Phe	Asp	Ser	Phe	Leu
				20					25					30		
	Ile	Gln	Tyr	Gln	Glu	Ser	Glu	Lys	Val	Gly	Glu	Ala	Ile	Asn	Leu	Thr
			35					40					45			
30	Val	Pro	Gly	Ser	Glu	Arg	Ser	Tyr	Asp	Leu	Thr	Gly	Leu	Lys	Pro	Gly
		50					55					60				
	Thr	Glu	Tyr	Thr	Val	Ser	Ile	Tyr	Gly	Val	Lys	Gly	Gly	His	Arg	Ser
	65					70					75					80
35	Asn	Pro	Leu	Ser	Ala	Glu	Phe	Thr	Thr							
					85											

REIVINDICACIONES

1. Un polipéptido que comprende una molécula de base de armazón que comprende dominios en giro topológicamente similares a dominios del tercer dominio de fibronectina, el polipéptido tiene una secuencia de aminoácidos basada en una secuencia de consenso del tercer dominio de fibronectina que tiene:

(i) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:16, en donde los residuos específicos de la SEQ ID NO:16 se reemplazan y mejoran la estabilidad térmica de la molécula basada en armazón, en donde la molécula basada en armazón comprende una sustitución E11N; o

(ii) la secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:144.

2. Un polipéptido de acuerdo con la reivindicación 1 con giros capaces de contactar con un objetivo, en donde las regiones de giro han sido modificadas para alternar residuos en las posiciones seleccionadas para el grupo que consiste de 13-16, 22-28, 28-43, 51-54, 60-64, y 75-81 de una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste de las SEQ ID NO: 16, y 144, opcionalmente en donde dicho armazón se une a un objetivo con por lo menos una afinidad seleccionada de una K_D de por lo menos $10^{-9}M$, por lo menos $10^{-10}M$, por lo menos $10^{-11}M$, y por lo menos $10^{-12}M$, por lo menos $10^{-13}M$, por lo menos $10^{-14}M$, y por lo menos $10^{-15}M$, como se determina por resonancia de plasmones de superficie o el método Kinexa.

3. Un armazón de proteína aislado en base al dominio de fibronectina tipo III (FN3), Tencon 16 (SEQ ID NO:16), de acuerdo con la reivindicación 1(i), que tiene una sustitución, E11N, y que comprende además:

una parte de esqueleto que tiene una secuencia de aminoácidos idéntica a la SEQ ID NO:16 en los residuos 1-21, 29-74, y 82-89; una parte de giro B:C entre los residuos 21 y 29 de la SEQ ID NO:16 que tiene por lo menos un 75% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO:21-45; y

una parte de giro F:G entre los residuos 74 y 82 de la SEQ ID NO:16 que tiene por lo menos un 75% de identidad con cualquiera de las SEQ ID NO:46-140, en donde el armazón de proteína es capaz de unirse a IgG humana.

opcionalmente en donde dicho armazón se une a un objetivo con por lo menos una afinidad seleccionada de una K_D menor que o igual a $10^{-9}M$, menor que o igual a $10^{-10}M$, menor que o igual a $10^{-11}M$, menor que o igual a $10^{-12}M$, menor que o igual a $10^{-13}M$, menor que o igual a $10^{-14}M$, y menor que o igual a $10^{-15}M$, como se determina por resonancia de plasmones de superficie o el método Kinexa, como en donde los giros forman sitios para la unión a IgG.

4. Un método para construir una biblioteca de proteínas basada en armazón que se derivan de una secuencia de consenso mejorada de estabilidad de un dominio de FN3 que incorpora codones aleatorizados para producir variantes de polipéptidos, que comprende los pasos de:

proporcionar un polinucleótido que codifica un polipéptido en donde la secuencia de consenso mejorada de estabilidad es la SEQ ID NO:144; y

introducir codones aleatorizados en la secuencia de polinucleótidos en las posiciones seleccionadas; y

propagar copias del polinucleótido para formar una biblioteca de polinucleótidos que codifican variantes de proteínas de armazón.

5. El método de la reivindicación 4, en donde los codones aleatorizados se seleccionan del grupo NNS y NNK, como en donde los codones aleatorizados se incorporan en las posiciones que codifican una región de giro seleccionada del grupo que consiste de los residuos en las posiciones 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64, y 75-81 de la SEQ ID NO:144.

6. Una biblioteca producida por el método de la reivindicación 4 o la reivindicación 5, opcionalmente en donde:

(i) los polinucleótidos de la biblioteca están enlazados operativamente con una proteína de representación que codifica la secuencia e introducidos en un vector de expresión para mostrar y expresarse como una proteína de fusión; o

(ii) la proteína de representación se selecciona de una proteína anclada a la membrana de una célula eucariota, una proteína de célula procariota y una proteína de recubrimiento de fagos.

7. Un método para generar una unión de armazón de proteína con un objetivo específico con una afinidad de unión predefinida, que comprende poner en contacto la biblioteca de la reivindicación 6 con el objetivo específico y aislar una unión de armazón de proteína con el objetivo específico con la afinidad predefinida, opcionalmente en donde:

(i) el paso de aislamiento que comprende aislar moléculas de almacén que se unen al objetivo específico y probar las moléculas de almacén aisladas para su afinidad de unión con el objetivo específico, como en donde el paso de aislamiento comprende cribar la biblioteca con el objetivo específico, capturar moléculas de almacén unidas al objetivo específico, y aislar las moléculas de almacén de unión;

(ii) la afinidad como se mide por K_D es menor que o igual a aproximadamente $10^{-7}M$.

8. Una molécula de ácido nucleico aislada que codifica un almacén de proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-3

9. Un vector de ácido nucleico aislado que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 8.

10. Una célula huésped procariota o eucariota que comprende la molécula de ácido nucleico aislada de acuerdo con la reivindicación 8, opcionalmente en donde dicha célula huésped es por lo menos una seleccionada de *E. coli* BL21 Star(DE3), otras célula de *E. coli*, almidón, células de insecto, COS-1, COS-7, HEK 293, HEK21, CHO, BSC-1, Hep G2, 653, SP/0, 293, HeLa, células de mieloma o linfoma, o célula inmortalizada o transformada de los mismos.

11. Una composición que comprende el almacén de proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-3 y por lo menos un portador o diluyente farmacéuticamente aceptable, que comprende opcionalmente además por lo menos un compuesto o polipéptido seleccionado de un marcador o informador detectable, un antagonista de TNF, un fármaco anti-infeccioso, un fármaco para el sistema cardiovascular (CV), un fármaco para el sistema nervioso central (CNS), un fármaco para el sistema nervioso autónomo (ANS), un fármaco para el tracto respiratorio, un fármaco para el tracto gastrointestinal (GI), un fármaco hormonal, un fármaco o fluido para el equilibrio de electrolitos, un fármaco hematológico, un antineoplásico, un fármaco inmuno-modulador, un fármaco oftálmico,ótico o nasal, un fármaco tópico, alimento funcional activo, citoquina y un antagonista de citoquina.

12. Un dispositivo médico, que comprende el almacén de proteína de cualquiera de la reivindicaciones 1-3, en donde dicho dispositivo es adecuado para poner en contacto o administrar dicho almacén de proteína por al menos un modo seleccionado de parenteral, subcutáneo, intramuscular, intravenoso, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginoso, intracavitario, intracelular, intracerebral, intracerebroventricular, intracólico, intracervical, intragástrico, intrahepático, intramiocardiaco, intraostial, intrapélvico, intrapericárdico, intraperitoneal, intrapleural, intraprostático, intrapulmonar, intrarectal, intrarrenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácico, intrauterino, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmico.

13. Un artículo de fabricación para uso farmacéutico o de diagnóstico humano, que comprende material de envasado y un recipiente que comprende una solución o una forma liofilizada del almacén de proteína de cualquiera de las reivindicaciones 1-3, opcionalmente en donde dicho recipiente es un componente de un dispositivo o sistema de administración parenteral, subcutánea, intramuscular, intravenosa, intraarticular, intrabronquial, intraabdominal, intracapsular, intracartilaginosa, intracavitaria, intracelular, intracerebral, intracerebroventricular, intracólica, intracervical, intragástrica, intrahepática, intramiocardiaca, intraostial, intrapélvica, intrapericárdica, intraperitoneal, intrapleural, intraprostática, intrapulmonar, intrarectal, intrarrenal, intraretinal, intraespinal, intrasinovial, intratorácica, intrauterina, intravesical, intralesional, bolo, vaginal, rectal, bucal, sublingual, intranasal y transdérmica.

14. Un almacén de proteína aislado basado en un dominio de fibronectina tipo III (FN3) que comprende una secuencia de aminoácidos de la SEQ ID NO:144, que comprende además sustituciones en el B:C (residuos 22-28) o F:G (residuos 75-81) en donde la proteína de almacén se seleccionó por unión con una proteína objetivo, opcionalmente en donde la proteína objetivo es IgG humana o TNF humana o fragmentos de las mismas, por ejemplo en donde el B:C (residuos 22-28) o F:G (residuos 75-81) están representados por una o más de las SEQ ID NO: 21-140 y el almacén de proteína se une a IgG humana, como en donde:

(i) el almacén comprende 7 cadenas y 6 giros entre las cadenas; o

(ii) el almacén comprende la secuencia de aminoácidos de cualquiera de un giro B:C o F:G de las SEQ ID NO:21-140, en donde el almacén de proteína forma giros en o alrededor de los residuos 13-16, 22-28, 38-43, 51-54, 60-64, y 75-81.

FIG. 1

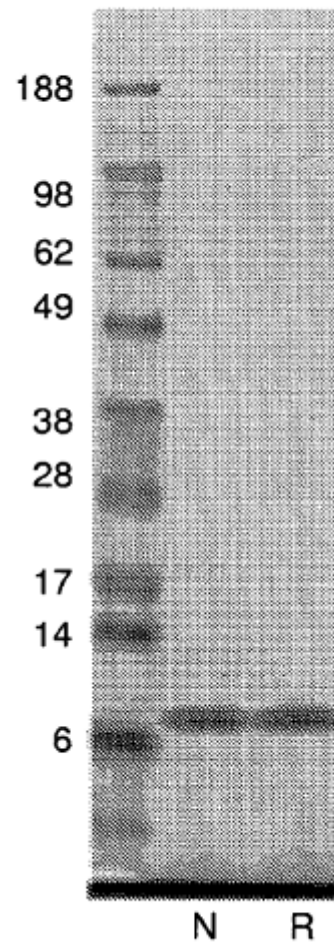
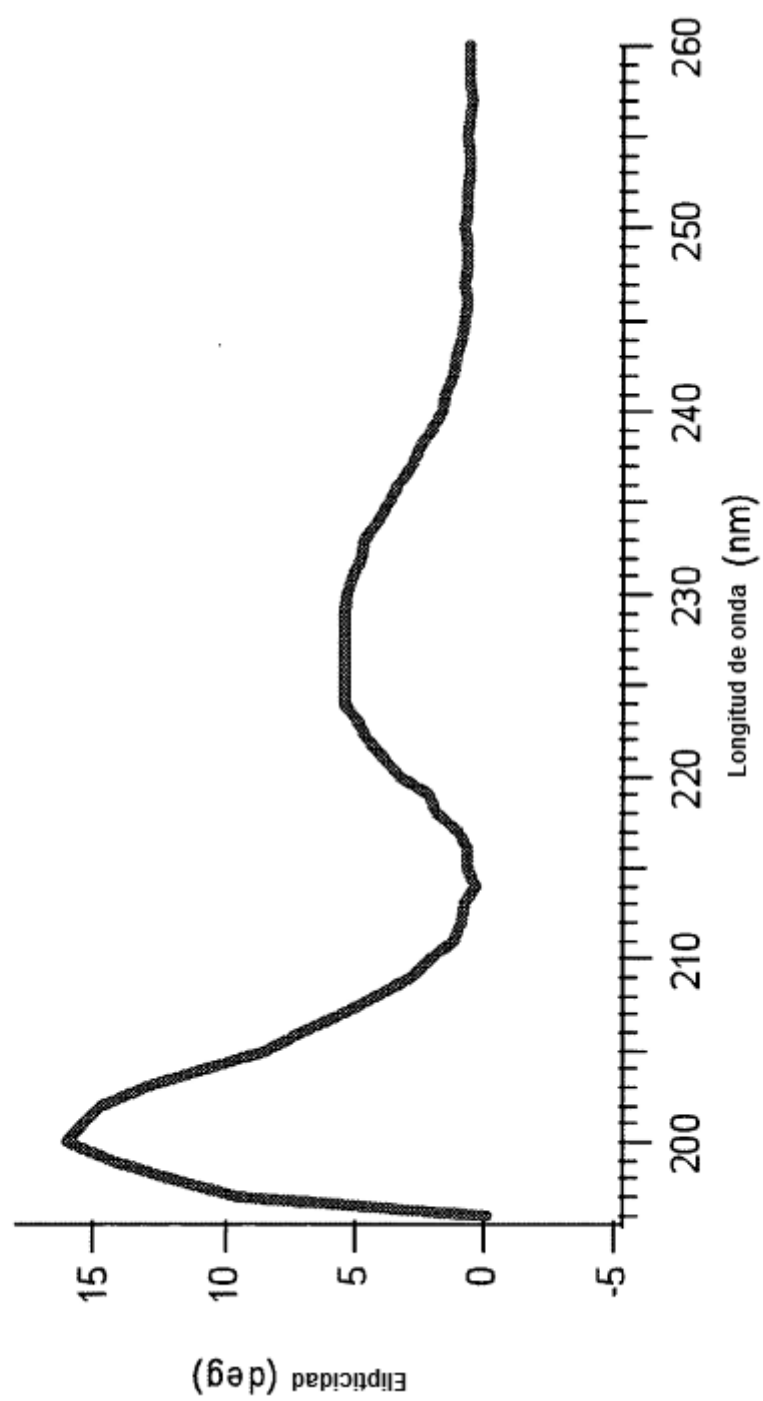


FIG. 2

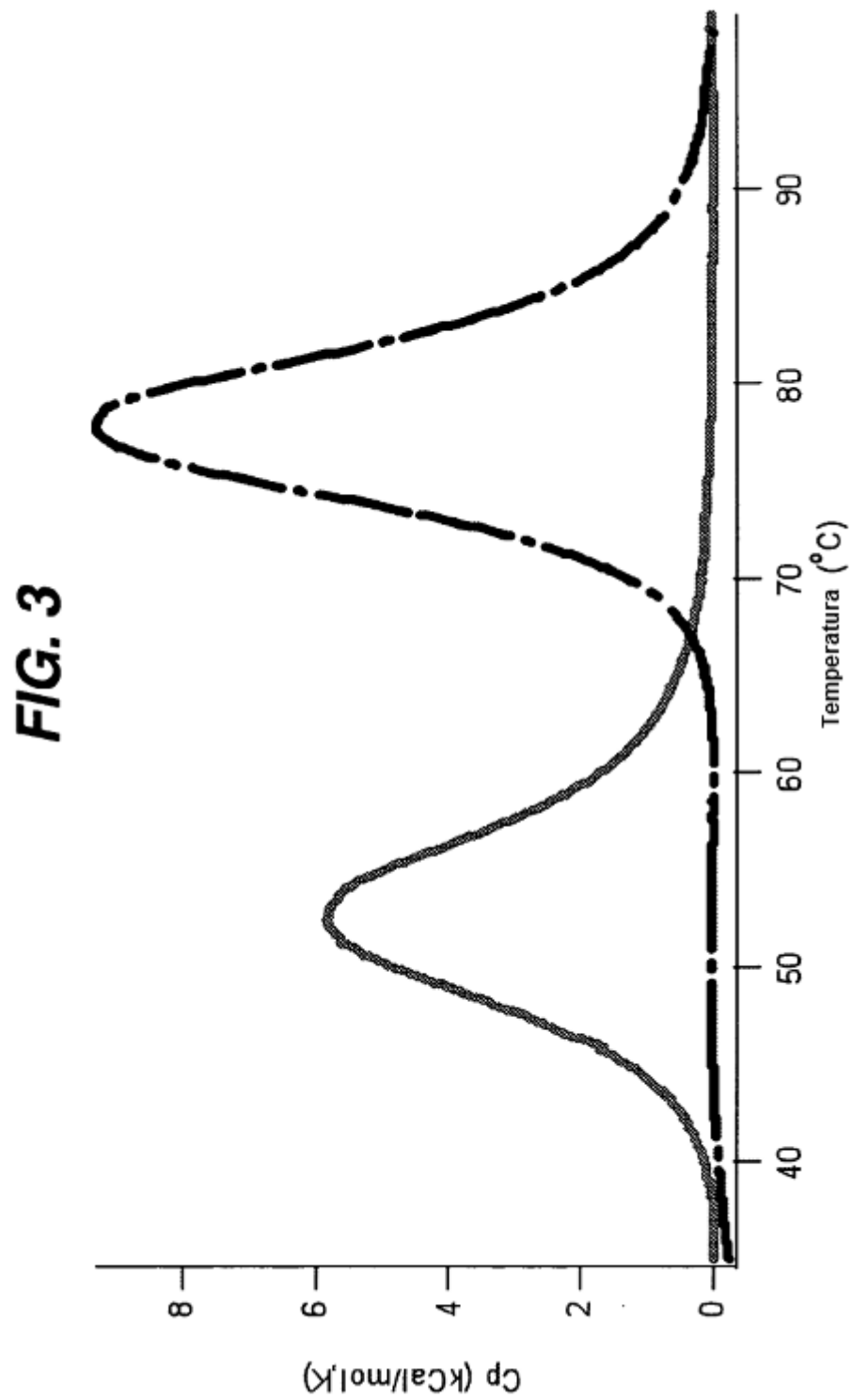


FIG. 4

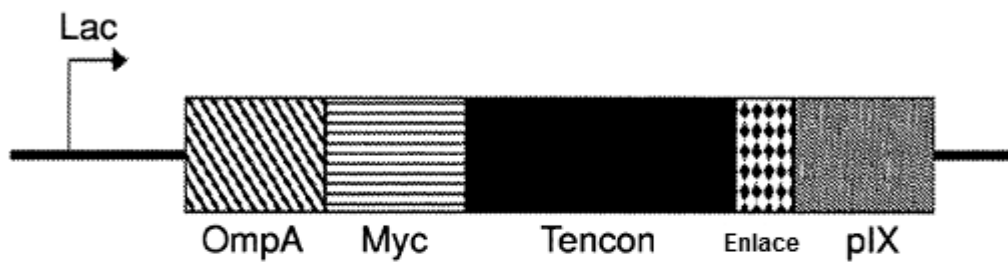


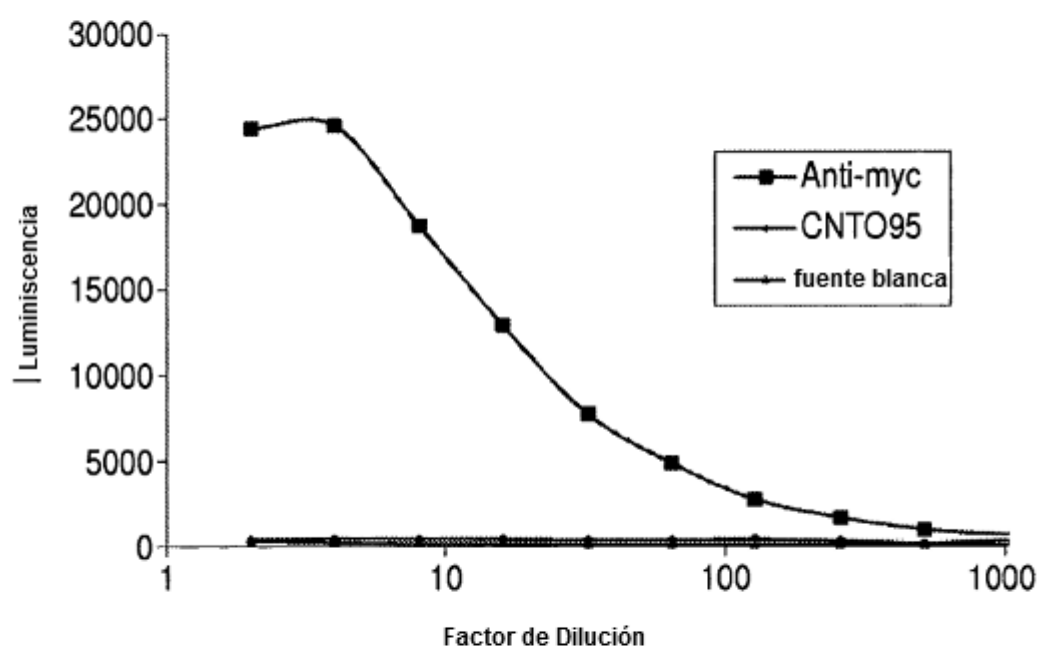
FIG. 5

FIG. 6

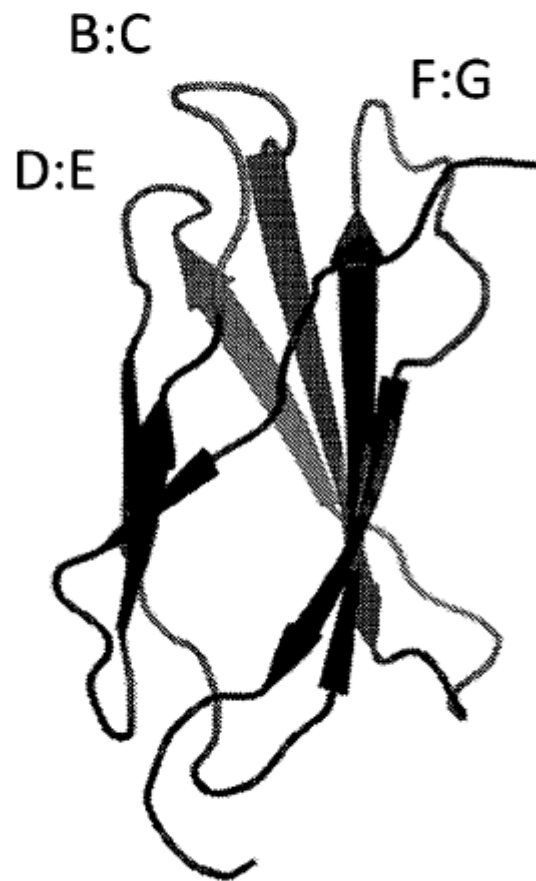


FIG. 7

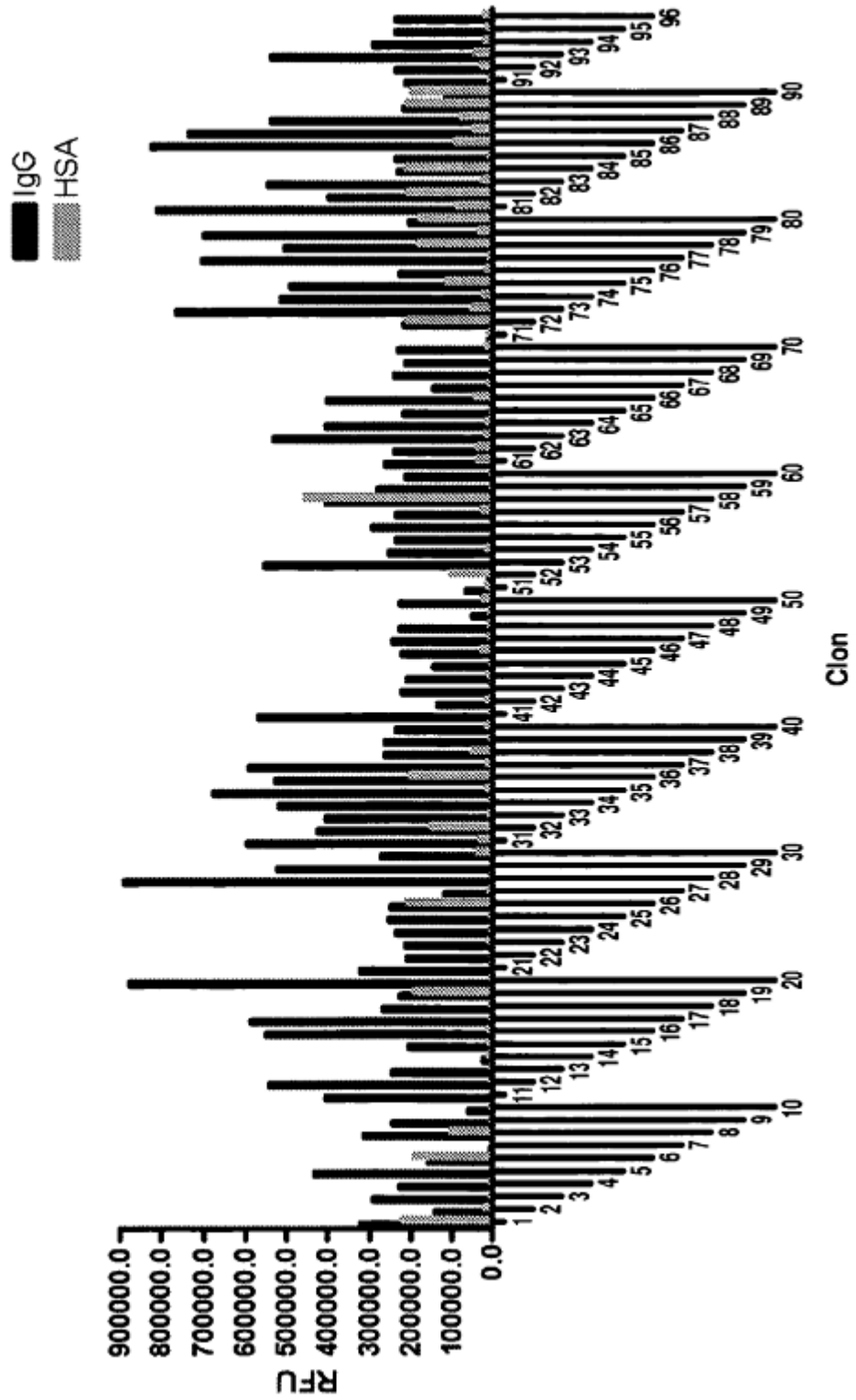


FIG. 8A

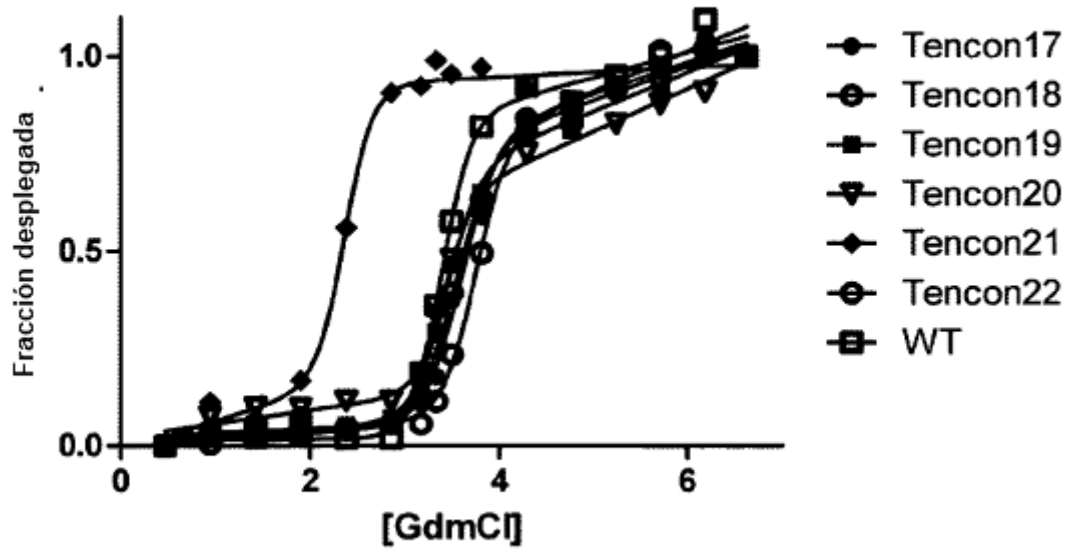


FIG. 8B

