

19



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



11 Número de publicación: **2 750 563**

51 Int. Cl.:

**C07K 14/78** (2006.01)

12

TRADUCCIÓN DE PATENTE EUROPEA

T3

86 Fecha de presentación y número de la solicitud internacional: **19.03.2015 PCT/US2015/021466**

87 Fecha y número de publicación internacional: **24.09.2015 WO15143156**

96 Fecha de presentación y número de la solicitud europea: **19.03.2015 E 15714129 (2)**

97 Fecha y número de publicación de la concesión europea: **11.09.2019 EP 3119803**

54 Título: **Moléculas con una estructura basada en fibronectina estabilizada**

30 Prioridad:

**20.03.2014 US 201461955975 P**  
**25.11.2014 US 201462084270 P**

45 Fecha de publicación y mención en BOPI de la traducción de la patente:  
**26.03.2020**

73 Titular/es:

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

72 Inventor/es:

**LIPOVSEK, DASA**

74 Agente/Representante:

**VALLEJO LÓPEZ, Juan Pedro**

ES 2 750 563 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

Moléculas con una estructura basada en fibronectina estabilizada

5 **Antecedentes**

Las adnectinas son una clase de proteínas terapéuticas con elevada afinidad y propiedades de unión a diana específicas que se derivan del décimo dominio de la fibronectina humana de tipo III (<sup>10</sup>F<sub>n</sub>3). Mientras que la <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural es muy estable y soluble, las variantes de unión a diana de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, que contienen aproximadamente 4-31 mutaciones en la secuencia natural, varían ampliamente en estabilidad y solubilidad. Las proteínas con una estructura basada en fibronectina asociadas con una estabilidad mejorada tal como una fragmentación y/o agregación reducidas se describen en el documento WO 2011/150133. No obstante, cualesquiera mutaciones en la secuencia de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural, aunque sea necesaria para la unión a la diana, tiene el riesgo de reducir la estabilidad de la proteína. Como consecuencia, sería deseable identificar mutaciones que pudieran realizarse en la secuencia de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural para estabilizarla, preferentemente independientemente de la identidad de los restos que median la unión de la adnectina a sus dianas terapéuticas.

**Sumario**

La invención se refiere a proteínas aisladas con una estructura basada en fibronectina (FBS) que comprenden un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, en la que (i) el aminoácido del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que está situado en la posición correspondiente a la posición 94 del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural definido en la SEQ ID NO:1 está directamente unido a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1; y (ii) el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> proporciona una propiedad mejorada a la proteína FBS con respecto a la proteína FBS que no está unida al resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento proteínas con una estructura basada en fibronectina estabilizadas (FBS), por ejemplo, F<sub>n</sub>3, tales como moléculas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (por ejemplo, moléculas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humanas) que están unidas por su extremo C a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1, y en la que el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> potencia al menos una característica, por ejemplo, termoestabilidad, de las proteínas FBS.

**Breve descripción de las figuras**

**Figura 1:** Representación de una estructura cristalina del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (PDB ID: 1FNA), y la secuencia de la proteína del polipéptido visible en la estructura. Los últimos dos restos definidos en la estructura, el "EI" en la secuencia de interés, se muestran como esferas negras, inmediatamente después de la cadena beta del extremo C, G.

40 **Descripción detallada****Definiciones**

Un "resto de aminoácido" es la parte que queda de un aminoácido después de perder una molécula de agua (un H<sup>+</sup> del lado del nitrógeno y un OH<sup>-</sup> del lado carboxílico) durante la formación del enlace peptídico.

Tal como se usa en el presente documento, un "dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3" o "resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3" o "molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3" se refiere al <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural y sus variantes biológicamente activas, por ejemplo, las variantes biológicamente activas que se unen específicamente a una diana, tal como una proteína diana. Un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural puede comprender una de las secuencias de aminoácidos establecidas en la SEQ ID NO: 1-8. Las variantes biológicamente activas de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural incluyen dominios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprenden al menos, como máximo o aproximadamente 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-8. Una variante biológicamente activa de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural también puede comprender, o comprender como máximo, 1-3, 1-5, 1-10, 1-15, 1-10, 1-25, 1-30, 1-35, 1-40 o 1-45 cambios de aminoácidos con respecto a un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-8. En determinadas realizaciones, una variante biológicamente activa de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural no comprende más de 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 30, 35, 40 o 45 cambios de aminoácidos, es decir, sustituciones, adiciones o deleciones, con respecto a un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprende una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-8. Los cambios de aminoácidos pueden estar en una región de bucle, en una hebra, o en la región del extremo N o el extremo C. Secuencia de aminoácidos de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 degeneradas ilustrativas que permiten cambios de aminoácidos en las regiones de bucle se proporcionan en el presente documento como las SEQ ID NOs: 9-16.

El término "polipéptido" se refiere a cualquier secuencia de dos o más aminoácidos, independientemente de la longitud, de la modificación postraduccional o de la función. Los polipéptidos pueden incluir aminoácidos naturales y aminoácidos no naturales tales como los descritos en la patente de Estados Unidos N.º 6.559.126. Los polipéptidos

- también se pueden modificar mediante cualquiera de varias formas químicas habituales (por ejemplo, se puede modificar un aminoácido con un grupo protector; el aminoácido de extremo carboxilo se puede convertir en un grupo amida terminal; el resto del extremo amino se puede modificar con grupos para, por ejemplo, mejorar la lipofilia; o el polipéptido se puede glucosilar químicamente o modificar de otro modo para aumentar la estabilidad o la semivida *in vivo*). Las modificaciones de polipéptidos pueden incluir la unión de otra estructura tal como un compuesto cíclico u otra molécula al polipéptido y también puede incluir polipéptidos que contienen uno o más aminoácidos en una configuración alterada (es decir, R o S; o L o D).
- Una "región" de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (o resto o molécula) tal como se usa en el presente documento se refiere o bien a un bucle (AB, BC, CD, DE, EF y FG), una cadena β (A, B, C, D, E, F y G), el extremo N (que corresponde a los restos de aminoácidos 1-7 de la SEQ ID NO: 1), o el extremo C (que corresponde a los restos de aminoácidos 93-94 de la SEQ ID NO: 1).
- Un "bucle polo norte" de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (o resto) se refiere a uno cualquiera de los bucles BC, DE y FG de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3.
- Un "bucle polo sur" de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (o resto) se refiere a uno cualquiera de los bucles AB, CD y EF de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3.
- Una "región de armazón" se refiere a cualquier región sin bucle de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano. La región de armazón incluye las cadenas β A, B, C, D, E, F y G β, así como la región del extremo N (aminoácidos correspondientes a los restos 1-7 de la SEQ ID NO: 1) y la región del extremo C (restos de aminoácidos correspondientes a los restos 93-94 de la SEQ ID NO: 1).
- "Porcentaje (%) de identidad de secuencia de aminoácidos" se define en el presente documento como el porcentaje de restos de aminoácidos en una secuencia candidata que son idénticos a los restos de aminoácidos en una secuencia seleccionada, después de alinear las secuencias e introducir huecos, si es necesario, para lograr el porcentaje máximo de identidad de secuencia y sin considerar ninguna sustitución conservativa como parte de la identidad de secuencia. La alineación con el fin de determinar el porcentaje de identidad de secuencia de aminoácidos puede lograrse de diversas maneras que están dentro de la experiencia de la técnica, por ejemplo, usando programas informáticos disponibles públicamente, tales como BLAST<sup>SM</sup>, BLAST<sup>SM</sup>-2, ALIGN, ALIGN-2 o el programa informático Megalign (DNASTAR®). Los expertos en la materia pueden determinar los parámetros adecuados para medir el alineamiento, incluyendo cualquier algoritmo necesario para conseguir la alineación máxima sobre toda la longitud de las secuencias que se comparan.
- Para fines del presente documento, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de una secuencia de aminoácidos dada A para, con o contra una secuencia de aminoácidos dada B (que puede, como alternativa, citarse como una secuencia de aminoácidos A que tiene o comprende un % determinado de identidad de secuencia para, con o frente a una secuencia de aminoácidos B) se calcula del modo siguiente: 100 veces la parte X/Y donde X es el número de restos de aminoácidos registrados como coincidencias idénticas mediante un programa de alineamiento de secuencias, tales como BLAST<sup>SM</sup>, BLAST<sup>SM</sup>-2, ALIGN, ALIGN-2 o Megalign (DNASTAR®), en dicha alineación de A y B en el programa y donde Y es el número total de restos de aminoácidos en B. Se apreciará que cuando la longitud de la secuencia de aminoácidos A no es igual a la longitud de la secuencia de aminoácidos B, el % de identidad de secuencia de aminoácidos de A a B no será igual al % de identidad de secuencia de aminoácidos de B a A.
- Tal como se usa en el presente documento, se considera que un resto de aminoácido en un polipéptido "contribuye a la unión" a una diana si (1) se descubre que cualquiera de los átomos que no sean de hidrógeno de la cadena lateral o de la cadena principal del resto está a cinco angstroms de cualquier átomo de la diana de unión basándose en una estructura tridimensional del complejo determinada de forma experimental, y/o (2) la mutación del resto a su equivalente en <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1), a alanina, o a un resto que tiene una cadena lateral de tamaño similar o más pequeña que el resto en cuestión, lleva a un aumento medido de la constante de disociación de equilibrio para la diana (por ejemplo, un aumento en la  $k_{on}$ ).
- La "semivida" de un polipéptido en suero o plasma se puede definir generalmente como el tiempo que tarda la concentración del polipéptido en suero en reducirse en un 50 %, *in vivo*, por ejemplo, debido a la degradación del polipéptido y/o al aclaramiento o secuestro del polipéptido mediante mecanismos naturales. La semivida puede determinarse de cualquier manera conocida per se, tal como mediante análisis farmacocinético. Las técnicas adecuadas serán evidentes para el experto en la materia, y pueden, por ejemplo, implicar generalmente las etapas de administrar una dosis adecuada de un polipéptido a un primate; recoger muestras de sangre u otras muestras de dicho primate a intervalos regulares; determinar el nivel o la concentración del polipéptido en dicha muestra de sangre; y calcular, a partir de (una gráfica de) los datos así obtenidos, el tiempo hasta que el nivel o la concentración del polipéptido se ha reducido en un 50 % en comparación con el nivel inicial en la dosificación. Se pueden encontrar métodos para determinar la semivida, por ejemplo, en Kenneth et al., *Chemical Stability of Pharmaceuticals: A Handbook for Pharmacists* (1986); Peters et al., *Pharmacokinetic Analysis: A Practical Approach* (1996); y Gibaldi, M. et al., *Pharmacokinetics*, segunda edición revisada, Marcel Dekker (1982).

La semivida en suero se puede expresar utilizando parámetros tales como t1/2-alfa, t1/2-beta y el área bajo la curva (ABC). Un "aumento en la semivida" se refiere a un aumento en una cualquiera de estos parámetros, dos cualesquiera de estos parámetros, o en los tres parámetros. En determinadas realizaciones, un aumento en la semivida se refiere a un aumento en t1/2-beta, ya sea con o sin un aumento en la t1/2-alfa y/o el ABC o ambos.

"Período de validez" de un producto farmacéutico, por ejemplo, una proteína que comprende un resto FBS y un resto HSA, es el periodo de tiempo durante el que el producto está almacenado antes se produzca la descomposición. Por ejemplo, el período de validez se puede definir como el tiempo hasta una descomposición del 0,1 %, 0,5 %, 1 %, 5 %, o 10 % del producto.

## Descripción general

La invención se refiere a proteínas aisladas con una estructura basada en fibronectina (FBS) que comprenden un dominio <sup>10</sup>Fn3, en la que (i) el aminoácido del dominio <sup>10</sup>Fn3 que está situado en la posición correspondiente a la posición 94 del dominio <sup>10</sup>Fn3 natural definido en la SEQ ID NO:1 está directamente unido a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos PmXn, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1; y (ii) el resto PmXn proporciona una propiedad mejorada a la proteína FBS con respecto a la proteína FBS que no está unida al resto PmXn.

Por tanto, se proporcionan en el presente documento proteínas que comprenden un dominio con una estructura basada en fibronectina (FBS), por ejemplo, Fn3, tal como moléculas <sup>10</sup>Fn3, que se unen específicamente a una diana, y en la que el dominio FBS está unido por su extremo C a una región que consiste en PmXn, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido y en la que n es 0 o un número entero que es al menos 1 y m es un número entero que es al menos 1. La solicitud se basa al menos en parte en el descubrimiento de que la adición de una prolina y, opcionalmente, uno o más aminoácidos a la región del extremo C de una molécula <sup>10</sup>Fn3 aumenta al menos una característica de la molécula <sup>10</sup>Fn3, por ejemplo, su termoestabilidad o solubilidad, con respecto a la molécula <sup>10</sup>Fn3 no modificada.

Las moléculas <sup>10</sup>Fn3 descritas en el presente documento se pueden diseñar para su unión a cualquier diana de interés. En realizaciones ilustrativas, la diana es un antígeno, un polipéptido o una proteína terapéutica diana de interés. Las dianas terapéuticamente deseables ilustrativas incluyen, por ejemplo, factor de necrosis tumoral alfa (TNF-α), VEGFR2, PCSK9, IL-23, EGFR e IGF1R.

## Estructuras basada en fibronectina

Tal como se usa en el presente documento, una "estructura basada en fibronectina" o proteína o resto "FBS" se refiere a proteínas o restos que se basan en una repetición de fibronectina de tipo III (Fn3). Fn3 es un dominio pequeño (aproximadamente 10 kDa) que tiene la estructura de un pliegue de la inmunoglobulina (Ig) (es decir, una estructura de tipo Ig en sándwich β, que consiste en siete cadenas β y seis bucles). La fibronectina tiene 18 repeticiones Fn3 y, aunque la homología de secuencia entre las repeticiones es baja, todas comparten una gran similitud en su estructura terciaria. Los dominios Fn3 también están presentes en muchas proteínas distintas de la fibronectina, tales como las moléculas de adhesión, las moléculas de la superficie celular, por ejemplo, receptores de citoquinas y dominios de unión a hidratos de carbono. Para las revisiones, véanse Bork et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89(19):8990-8994 (1992); Bork et al., J. Mol. Biol., 242(4):309-320 (1994); Campbell et al., Structure, 2(5):333-337 (1994); Harpez et al., J. Mol. Biol., 238(4):528-539 (1994)). El término proteína o resto "FBS" pretende incluir estructuras basadas en los dominios Fn3 de estas otras proteínas (es decir, moléculas no de fibronectina).

Un dominio Fn3 es pequeño, monomérico, soluble y estable. Carece de enlaces disulfuro y, por tanto, es estable en condiciones reductoras. Los dominios FN3 comprenden, en orden desde el extremo N al extremo C, una cadena beta o de tipo beta, A; un bucle, AB; una cadena beta o de tipo beta, B; un bucle, BC; una cadena beta o de tipo beta, C; un bucle, CD; una cadena beta o de tipo beta, D; un bucle, DE; una cadena beta o de tipo beta, E; un bucle, EF; una cadena beta o de tipo beta, F; un bucle, FG; y una cadena beta o de tipo beta, G. Las siete cadenas β antiparalelas se disponen como dos láminas beta que forman un núcleo estable, creando así dos "caras" compuestas de los bucles que conectan las cadenas beta o de tipo beta. Los bucles AB, CD y EF se localizan en una cara ("el polo sur") y los bucles BC, DE y FG se localizan en la cara opuesta ("el polo norte").

Los bucles de las moléculas Fn3 son estructuralmente similares a las regiones determinantes de la complementariedad (CDR) de los anticuerpos y, cuando se alteran, pueden estar implicadas en la unión de la molécula Fn3 a una diana, por ejemplo, una proteína diana. Otras regiones de las moléculas Fn3, tales como las cadenas beta o de tipo beta de las regiones del extremo N o del extremo C, cuando se alteran, también pueden estar implicadas en la unión a una diana. Cualquiera o todos los bucles AB, BC, CD, DE, EF y FG puede participar en la unión a una diana. Cualquiera de las cadenas beta o de tipo beta pueden estar implicadas en la unión a una diana. Los dominios Fn3 también se pueden unir a una diana mediante uno o más bucles y una o más cadenas beta o de tipo beta. La unión también puede requerir las regiones del extremo N o el extremo C. Un dominio FBS para su uso en una proteína puede comprender todos los bucles, todas las cadenas beta o de tipo beta, o solamente una parte de los mismos, mientras que algunos bucles y/o cadenas beta o de tipo beta y/o regiones del extremo N o del extremo C están modificadas (o alteradas),

siempre que el dominio FBS preferentemente se una específicamente a una diana. Por ejemplo, un dominio FBS puede comprender 1, 2, 3, 4, 5 o 6 bucles, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, u 8 cadenas beta y, opcionalmente, una región del extremo N o del extremo C, en la que uno o más bucles, una o más cadenas beta, la región del extremo N y/o las regiones del extremo C se han modificado con respecto al dominio FBS natural.

5 Los restos FBS (o diana) de unión a FBS descritos en el presente documento pueden estar basados en el décimo dominio de tipo III de fibronectina, es decir, el décimo módulo de Fn3 (<sup>10</sup>Fn3). La secuencia de aminoácidos de un resto <sup>10</sup>Fn3 humano natural es el siguiente:

**VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS**

10 TATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 1) (los bucles AB, CD y EF están subrayados; los bucles BC, FG y DE se resaltan en negrita; las cadenas β se localizan entre cada una o adyacentes a cada una de las regiones bucle; y la región del extremo N se muestra en cursiva). Los dos últimos aminoácidos de la SEQ ID NO: 1 son una parte de la región del extremo C.

15 Las moléculas <sup>10</sup>Fn3 humanas naturales también incluyen las que carecen de la región del extremo N o una parte de la misma. Por ejemplo, una molécula <sup>10</sup>Fn3 humana natural también puede comprender la SEQ ID NO: 1, de la que se han eliminado los restos de aminoácidos 1, 1-2, 1-3, 1-4, 1-5, 1-6 o 1-7 (SEQ ID NOs: 2-8, respectivamente). La Tabla 1 muestra la secuencia de aminoácidos de estos restos de <sup>10</sup>Fn3 humana natural:

20 Tabla 1: Secuencias de aminoácidos de moléculas <sup>10</sup>Fn3 humanas naturales con diversas regiones del extremo N

Versión	Región del extremo N	Dominio núcleo de <sup>10</sup> Fn3 humana natural	Longitud completa
1	VSDVPRD (SEQ ID NO: 19)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 1
2	SDVPRD (SEQ ID NO: 20)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 2
3	DVPRD (SEQ ID NO: 21)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 3
4	VPRD (SEQ ID NO: 22)	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 4
5	PRD	LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPIISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 5

(continuación)

Versión	Región del extremo N	Dominio núcleo de <sup>10</sup> F <sub>n3</sub> humana natural	Longitud completa
6	RD	LEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 6
7	D	LEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 7
8		LEVVAATPTSLISWDAPAVTVRYYRITY GETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLKPG VDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT (SEQ ID NO: 17)	SEQ ID NO: 8

En algunas realizaciones, el bucle AB corresponde a los restos 14-17, el bucle BC corresponde a los restos 23-31, el bucle CD corresponde a los restos 37-47, el bucle DE corresponde a los restos 51-56, el bucle EF corresponde a los restos 63-67, y el bucle FG corresponde a los restos 75-87 de la SEQ ID NO: 1. Los bucles BC, DE y FG se alinean a lo largo de una cara de la molécula, es decir, el "polo norte", y los bucles AB, CD y EF se alinean a lo largo de la cara opuesta de la molécula, es decir, el "polo sur". En la SEQ ID NO: 1, la cadena β A corresponde a los restos 8-13, la cadena β B corresponde a los restos 18-22, la cadena β C corresponde a los restos 32-36, la cadena beta D corresponde a los restos 48-50, la cadena β E corresponde a los restos 57-62, la cadena β F corresponde a los restos 68-74, y la cadena β G corresponde a los restos 88-92. Las cadenas β se unen entre sí a través del correspondiente bucle, por ejemplo, las cadenas A y B están conectadas a través del bucle AB en la formación de la cadena β A, el bucle AB, la cadena β B, etc.

Un ejemplo de proteínas FBS que están basadas en dominios <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> humanos son las adnectinas (Adnexus, una empresa filial totalmente propia de Bristol-Myers Squibb). Las adnectinas son moléculas <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> en las que las regiones de bucle análogas a las CDR, las cadenas β, las regiones del extremo N y/o del extremo C de un dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> se han modificado para producir una proteína capaz de unirse a un compuesto de interés. Por ejemplo, la patente de Estados Unidos n.º 7.115.396 describe proteínas del dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> en las que las alteraciones en los bucles BC, DE, y FG dan como resultado ligandos de TNFα de alta afinidad. la patente de Estados Unidos n.º 7.858.739 describe proteínas del dominio F<sub>n3</sub> en las que las alteraciones en los bucles BC, DE, y FG dan como resultado ligandos de VEGFR2 de alta afinidad.

En determinadas realizaciones, el resto FBS comprende un dominio <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> que se define generalmente por la siguiente secuencia degenerada:

VSDVPRDLEVVA(X)<sub>i</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>  
ISINYRT (SEQ ID NO: 9),

o por una secuencia seleccionada entre el grupo de la SEQ ID NO: 10-16, cuyas secuencias son idénticas a la SEQ ID NO: 9, salvo en que carecen de 1, 2, 3, 4, 5, 6 o 7 aminoácidos del extremo N, respectivamente. La Tabla 2 muestra las secuencias de aminoácidos de estas moléculas <sup>10</sup>F<sub>n3</sub> humanas degeneradas.

Tabla 2: Secuencias de aminoácidos de moléculas 10Fn3 humanas naturales degeneradas con diversas regiones del extremo N

Versión	Región del extremo N	Dominio núcleo de 10Fn3 humana natural degenerado	Longitud completa
1	VSDVPRD (SEQ ID NO: 19)	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 9
2	SDVPRD (SEQ ID NO: 20)	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 10
3	DVPRD (SEQ ID NO: 21)	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 11
4	VPRD (SEQ ID NO: 22)	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 12
5	PRD	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 13
6	RD	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 14
7	D	LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 15
8		LEVVAAX <sub>u</sub> LLISW(X) <sub>v</sub> YRITY(X) <sub>w</sub> FTV (X) <sub>x</sub> ATISGL(X) <sub>y</sub> YTITVYA(X) <sub>z</sub> ISINYRT (SEQ ID NO: 18)	SEQ ID NO: 16

5 En las SEQ ID NO: 25-32 y 50, el bucle AB se representa mediante (X)<sub>u</sub>, el bucle BC se representa mediante (X)<sub>v</sub>, el bucle CD se representa mediante (X)<sub>w</sub>, el bucle DE se representa mediante (X)<sub>x</sub>, el bucle EF se representa mediante (X)<sub>y</sub> y el bucle FG se representa mediante X<sub>z</sub>. X representa cualquier aminoácido, y el subíndice tras la X representa un número entero del número de aminoácidos. En particular, u, v, w, x, y, y z pueden ser cada uno independientemente de 2-20, 2-15, 2-10, 2-8, 5-20, 5-15, 5-10, 5-8, 6-20, 6-15, 6-10, 6-8, 2-7, 5-7, o 6-7 aminoácidos. Las secuencias de las cadenas beta (subrayadas en la SEQ ID NO: 9) pueden tener cualquiera de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, delecciones o adiciones en las 7 regiones estructurales con respecto a los correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 9-16. En algunas realizaciones, las secuencias de las cadenas beta pueden tener en cualquier parte de 0 a 10, de 0 a 8, de 0 a 6, de 0 a 5, de 0 a 4, de 0 a 3, de 0 a 2, o de 0 a 1 sustituciones, por ejemplo, sustituciones conservativas, en las 7 regiones estructurales con respecto a los

correspondientes aminoácidos mostrados en las SEQ ID NO: 9-16.

En determinadas realizaciones, los restos de aminoácidos hidrófobos del núcleo (restos en negrita en la SEQ ID NO: 9 anterior) son fijos, y cualesquiera sustituciones, sustituciones conservativas, deleciones o adiciones se producen en otros restos que no sean los restos de aminoácidos hidrófobos del núcleo. Por lo tanto, en algunas realizaciones, los restos hidrófobos del núcleo de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no se han modificado en relación con el dominio <sup>10</sup>Fn3 humano natural (por ejemplo, la SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, un resto FBS comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3, en el que el dominio <sup>10</sup>Fn3 comprende un bucle, AB; un bucle, BC; un bucle, CD; un bucle, DE; un bucle, EF; y un bucle, FG; y tiene al menos un bucle seleccionado entre el bucle AB, BC, CD, DE, EF y FG con una secuencia de aminoácidos alterada con respecto a la secuencia del correspondiente bucle del dominio <sup>10</sup>Fn3 humano natural. En algunas realizaciones, un único bucle está alterado. En algunas realizaciones, como máximo 2 bucles están alterados. En algunas realizaciones, como máximo 3 bucles están alterados. En algunas realizaciones, los bucles BC, DE y FG están alterados. En determinadas realizaciones, los bucles AB, CD y EF están alterados. En determinadas realizaciones, el bucle FG es el único bucle que se altera. En determinadas realizaciones, el bucle CD es el único bucle que se altera. En otras realizaciones, se alteran ambos bucles CD y FG, y de forma opcional, no se alteran otros bucles. En determinadas realizaciones, se alteran ambos bucles CD y EF y, de forma opcional, no se alteran otros bucles. En algunas realizaciones, se combinan una o más alteraciones específicas de la estructura con una o más alteraciones del bucle. Por "alterado" se entiende una o más alteraciones en la secuencia de aminoácidos con respecto a una secuencia de plantilla (es decir, el correspondiente dominio de fibronectina humana natural) e incluye adiciones, deleciones y sustituciones de aminoácidos. Las moléculas <sup>10</sup>Fn3 ilustrativas que comprenden combinaciones específicas de bucles y/o regiones estructurales alterados (por ejemplo, las cadenas beta, la región del extremo N y la región del extremo C) se divulgan adicionalmente en el presente documento.

Se debería de entender que no todos los restos de una región de bucle deben modificarse para lograr un dominio de unión de <sup>10</sup>Fn3 que tenga fuerte afinidad por una diana deseada. Adicionalmente, también se pueden hacer inserciones y deleciones en las regiones bucle produciéndose aún dominios de unión de <sup>10</sup>Fn3 de alta afinidad.

En algunas realizaciones, uno o más bucles seleccionados de AB, BC, CD, DE, EF y FG se pueden alargar o acortar en longitud en relación respecto al correspondiente bucle en <sup>10</sup>Fn3 humana natural. En cualquiera de los polipéptidos dados, uno o más bucles se pueden extender en longitud, uno o más bucles se pueden reducir en longitud o combinaciones de los mismos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede extender en 2-25, 2-20, 2-15, 2-10, 2-5, 5-25, 5-20, 5-15, 5-10, 10-25, 10-20, o 10-15 aminoácidos. En algunas realizaciones, la longitud de un bucle dado se puede reducir en 1-15, 1-11, 1-10, 1-5, 1-3, 1-2, 2-10, o 2-5 aminoácidos. En particular, el bucle FG de <sup>10</sup>Fn3 tiene 13 restos de longitud, mientras que el correspondiente bucle en las cadenas pesadas de los anticuerpos varía de 4-28 restos. Para optimizar la unión al antígeno en los polipéptidos que dependen del FG para la unión a la diana, por tanto, la longitud del bucle FG de <sup>10</sup>Fn3 se puede alterar en longitud así como en la secuencia para obtener la mayor flexibilidad y afinidad posibles en la unión a la diana.

En algunas realizaciones, el resto FBS comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3 en el que las regiones no de bucle comprenden una secuencia de aminoácidos que es idéntica en al menos un 80, 85, 90, 95, 98, o 100 % a las regiones no de bucle de la SEQ ID NO: 1, en la que al menos un bucle seleccionado de AB, BC, CD, DE, EF y FG está alterado. Por ejemplo, en determinadas realizaciones, el bucle AB puede tener hasta 4 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle BC puede tener hasta 10 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle CD puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle DE puede tener hasta 6 sustituciones de aminoácidos, hasta 4 deleciones de aminoácidos, hasta 13 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; el bucle EF puede tener hasta 5 sustituciones de aminoácidos, hasta 10 inserciones de aminoácidos, hasta 3 deleciones de aminoácidos o una combinación de las mismas; y/o el bucle FG puede tener hasta 12 sustituciones de aminoácidos, hasta 11 deleciones de aminoácidos, hasta 25 inserciones de aminoácidos o una combinación de las mismas.

En algunas realizaciones, un resto FBS comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3 que tiene al menos un 40 %, 50 %, 55 %, 60 %, 65 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, o 90 % de identidad con un dominio <sup>10</sup>Fn3 humano que tiene una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias que comprenden las SEQ ID NOs: 1-16. En determinadas realizaciones, el resto FBS proporcionado en el presente documento tiene al menos un 50 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO: 1-16. En otras realizaciones, el resto FBS tiene al menos un 65 % de identidad con una secuencia de aminoácidos seleccionada entre el grupo de secuencias de aminoácidos que comprenden la SEQ ID NO: 1-16. En determinadas realizaciones, uno o más de los bucles no se modificarán con respecto a la secuencia del correspondiente bucle de la secuencia natural y/o una o más de las cadenas β no se modificarán con respecto a la secuencia de la correspondiente cadena β de la secuencia natural y/o las regiones del extremo N o del extremo C no se modificarán. En determinadas realizaciones, cada una de las cadenas de tipo beta de un dominio <sup>10</sup>Fn3 de un resto FBS puede comprender, consistir esencialmente en, o consistir en una secuencia de aminoácidos que es al menos un 80 %, 85 %, 90 %, 95 % o 100 %

idéntica a la secuencia de una cadena beta o de tipo beta correspondiente de la SEQ ID NO: 1. Preferentemente, las variaciones en las regiones de la cadena  $\beta$  no alterarán la estabilidad del polipéptido en condiciones fisiológicas.

5 En algunas realizaciones, la región no de bucle del dominio  $^{10}\text{Fn3}$  se puede modificar mediante una o más sustituciones conservativas. Una cantidad como el 5 %, 10 %, 20 % o incluso el 30 % o más de los aminoácidos del dominio  $^{10}\text{Fn3}$  se pueden alterar mediante sustituciones conservativas sin alterar sustancialmente la afinidad del  $^{10}\text{Fn3}$  por un ligando. En determinadas realizaciones, las regiones no de bucle, por ejemplo, las cadenas  $\beta$  pueden comprender cualquiera de 0-15, 0-10, 0-8, 0-6, 0-5, 0-4, 0-3, 1-15, 1-10, 1-8, 1-6, 1-5, 1-4, 1-3, 2-15, 2-10, 2-8, 2-6, 2-5, 2-4, 5-15, o 5-10 sustituciones conservativas de aminoácidos. En realizaciones ilustrativas, la modificación de la estructura puede reducir la afinidad de unión del ligando  $^{10}\text{Fn3}$  por un ligando en menos de 100 veces, 50 veces, 25 veces, 10 veces, 5 veces o 2 veces. Puede ser que dichos cambios puedan alterar la inmunogenicidad del  $^{10}\text{Fn3}$  *in vivo* y, cuando se reduce la inmunogenicidad, tales cambios pueden ser deseables. Tal como se usa en el presente documento, "sustituciones conservativas" son restos que son físicamente o funcionalmente similares a los correspondientes restos de referencia. Es decir, una sustitución conservativa y su resto de referencia tienen similar tamaño, forma, carga eléctrica, propiedades químicas, incluida la capacidad de formar enlaces covalentes o de hidrógeno, o similares. Las sustituciones conservativas ilustrativas incluyen aquellas que cumplen los criterios definidos para una mutación puntual aceptada en Dayhoff et al., Atlas of Protein Sequence and Structure, 5:345-352 (1978 y Supl.). Los ejemplos de sustituciones conservativas incluyen sustituciones en los siguientes grupos: (a) valina, glicina; (b) glicina, alanina; (c) valina, isoleucina, leucina; (d) ácido aspártico, ácido glutámico; (e) asparagina, glutamina; (f) serina, treonina; (g) lisina, arginina, metionina; y (h) fenilalanina, tirosina.

25 En el presente documento se proporcionan también dominios  $^{10}\text{Fn3}$  que tienen combinaciones de modificaciones en bucles y estructura. Los conjugados pueden comprender un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que comprende (i) una modificación en la secuencia de aminoácidos de al menos uno de los bucles AB, BC, CD, DE, EF, o FG, y (ii) una modificación en la secuencia de aminoácidos de al menos una región estructural (es decir, una modificación en al menos una cadena  $\beta$ , la región del extremo N, y/o la región del extremo C), en la que el uno o más bucles modificados y la una o más regiones estructurales modificadas contribuyen, en ambos casos, a la unión a la misma diana. En realizaciones ilustrativas, las modificaciones en la región estructural se sitúan adyacentes a las modificaciones en una región de bucle, por ejemplo, si se modifica en bucle AB, las mutaciones estructurales pueden tender a localizarse en la cadena  $\beta$  A y/o en la cadena  $\beta$  B, que son adyacentes al bucle AB en la secuencia lineal del dominio  $^{10}\text{Fn3}$ . En otras realizaciones, se puede hallar una agrupación de modificaciones juntas en regiones de bucle y de estructura que son adyacentes entre sí en la secuencia lineal del dominio  $\text{Fn3}$ . Por ejemplo, los ligantes de  $\text{Fn3}$  que tienen tanto modificaciones en el bucle como en la estructura, pueden tener agrupaciones de modificaciones de aminoácidos en las siguientes combinaciones de regiones de bucle y de estructura que son adyacentes entre sí en la secuencia lineal del dominio  $\text{Fn3}$ : cadena  $\beta$ /bucle/cadena  $\beta$ , bucle/cadena  $\beta$ /bucle, bucle/cadena  $\beta$ /bucle/cadena  $\beta$ , región del extremo/cadena  $\beta$ /bucle, o bucle/cadena  $\beta$ /región del extremo, etc. Por ejemplo, los dominios  $\text{Fn3}$  que tienen nuevas combinaciones de modificaciones de bucle y de armazón pueden ser agrupaciones de modificaciones de manera que sobre un tramo de 20 aminoácidos contiguos, al menos 15 de los aminoácidos están modificados respecto al natural. En otras realizaciones, al menos 17 de 20, 18 de 20, 17 de 25, 20 de 25 o 25 de 30 restos en un tramo contiguo están modificados con respecto a la secuencia del dominio  $\text{Fn3}$  natural en el tramo correspondiente de aminoácidos. En determinadas realizaciones, un dominio  $\text{Fn3}$  dado puede tener dos o tres agrupaciones de modificaciones separadas por tramos de secuencia no modificada (es decir, naturales). Para cualquier región dada (es decir, un bucle, una cadena  $\beta$  o una región del extremo) que se modifica, se puede modificar todo o solo una parte de la región en con respecto a la secuencia natural. Cuando se modifica una región de cadena  $\beta$ , preferentemente los restos hidrófobos del núcleo permanecen sin modificar (es decir, naturales) y se modifican uno o más restos no del núcleo en la cadena  $\beta$ .

50 En algunas realizaciones, los dominios  $^{10}\text{Fn3}$  comprenden una cara de unión a lo largo del "lado oeste" de la molécula ("ligantes del lado oeste" o "ligantes WS"). Los ligantes WS pueden comprender un bucle CD modificado y un bucle FG modificado, en comparación con las correspondientes secuencias de los bucles CD y FG establecidas en la SEQ ID NO: 1. Tanto el bucle CD como el bucle FG contribuyen a la unión a la misma diana. En determinadas realizaciones, los ligantes WS pueden comprender modificaciones adicionales en una o más regiones del dominio  $\text{Fn3}$ . Por ejemplo, los ligantes WS pueden comprender modificaciones de la estructura en una o más de las regiones de cadena  $\beta$  adyacentes a los bucles CD y/o FG. En particular, los ligantes pueden comprender modificaciones de secuencia en una o más de la cadena  $\beta$  C, cadena  $\beta$  D, cadena  $\beta$  F y/o cadena  $\beta$  G. Las modificaciones de la estructura ilustrativas incluyen modificaciones en una o más posiciones de la región estructural que corresponden a las posiciones de los aminoácidos: 33, 35, 49, 69, 71, 73, 89 y/o 91 de la SEQ ID NO: 1. Los ligantes WS también pueden comprender modificaciones en el bucle BC, particularmente en la parte del extremo C del bucle BC. En una realización, los dos últimos restos del bucle BC (es decir, los correspondientes a los aminoácidos 30 y 31 del dominio  $^{10}\text{Fn3}$  natural) se modifican con respecto a la secuencia natural. Todo o parte de las modificaciones adicionales del bucle y de la estructura pueden contribuir a la unión a la diana junto con los bucles modificados CD y FG. Preferentemente, los restos hidrófobos del núcleo no se modifican con respecto a la secuencia natural.

65 Los ligantes WS ilustrativos incluyen los que tienen un aminoácido natural o mutado en las posiciones 30, 31, 33, 35, 37, 38, 46, 47, 49, 50, 67, 69, 71, 73, 75, 76, 84, 85, 86, 87, 89 o 91.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende modificaciones en los bucles CD, DE y, en algunos casos, EF, en las que todas las modificaciones de los bucles contribuyen a la unión a la diana. Estos polipéptidos se denominan como "ligantes frontales". Los ligantes frontales pueden comprender adicionalmente modificaciones en una o más regiones estructurales, particularmente en regiones estructurales que flanquean o que son adyacentes a una región de bucle modificada. Por ejemplo, los ligantes frontales pueden comprender una modificación de la estructura en una o más de la cadena β C, cadena β D y/o cadena β E con respecto a las secuencias de las correspondientes cadenas β del dominio F<sub>n</sub>3 natural, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (SEQ ID NO: 1). Preferentemente, los restos hidrófobos del núcleo no se modifican con respecto a la secuencia natural. Las modificaciones estructurales ilustrativas que pueden estar presentes en los ligantes frontales, incluyen modificaciones en una o más posiciones que se corresponden con las posiciones de aminoácidos 36, 49, 58 y/o 50 de la SEQ ID NO: 1. Dichas modificaciones de la estructura pueden contribuir a la unión a la diana junto con los bucles modificados. En determinadas realizaciones, los ligantes frontales pueden comprender agrupaciones de modificaciones que abarcan varias regiones de bucle y de cadenas del dominio F<sub>n</sub>3, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3. En particular, los ligantes frontales pueden comprender modificaciones en al menos 15, 20, 24, 25 o 27 de los 31 restos entre los aminoácidos que se corresponden con los restos 36 a 66 del F<sub>n</sub>3 natural, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (SEQ ID NO: 1). Las modificaciones del bucle y/o de la cadena pueden incluir sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. En realizaciones ilustrativas, el bucle CD se extiende en longitud o se reduce en longitud con respecto al bucle CD del F<sub>n</sub>3, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural (SEQ ID NO: 1).

En algunas realizaciones, los dominios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprenden modificaciones en los bucles EF y FG, en los que las modificaciones de los bucles contribuyen a la unión a la misma diana. Estos polipéptidos se denominan como "ligantes posteriores" en el presente documento. Los ligantes posteriores pueden comprender modificaciones adicionales en otras regiones de bucle y/o de la estructura. Por ejemplo, un ligante posterior puede contener modificaciones en al menos una parte del bucle AB, preferentemente la parte del extremo N del bucle AB. En una realización ilustrativa, los dos primeros aminoácidos del bucle AB (es decir, los que se corresponden con los restos de aminoácidos 14 y 15 del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural) se modifican con respecto a la secuencia natural. En determinadas realizaciones, un ligante posterior también puede contener una o más modificaciones de la estructura, particularmente, modificaciones en una o más regiones estructurales que son adyacentes a una región de bucle modificada. Por ejemplo, los ligantes posteriores pueden contener una o más modificaciones en una o más de la cadena β A, cadena β G, la región del extremo N y/o la región del extremo C. Preferentemente, los restos hidrófobos del núcleo no se modifican con respecto a la secuencia natural. Las modificaciones de la estructura ilustrativas incluyen modificaciones en una o más posiciones que se corresponden con las posiciones de aminoácidos 1-7, 9-13, 89, 91, 93 y/o 94 de la SEQ ID NO: 1. Una o más modificaciones adicionales del bucle y/o de la estructura pueden contribuir a la unión a la diana junto con los bucles EF y FG modificados. Las modificaciones adecuadas de la región del bucle y/o de la estructura incluyen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos o combinaciones de las mismas. En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos del bucle FG se extiende en longitud o se reduce en longitud con respecto al bucle FG del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano natural (SEQ ID NO: 1).

En determinadas realizaciones, un ligante posterior puede comprender una agrupación de restos de aminoácidos modificados sobre un tramo contiguo de varias regiones del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3. Por ejemplo, al menos 14 de los 15 primeros restos de aminoácidos del F<sub>n</sub>3, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se puede modificar con respecto a los correspondientes restos del F<sub>n</sub>3 natural, por ejemplo, dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (SEQ ID NO: 1), y/o al menos 15 de los 18 restos entre los aminoácidos correspondientes a los restos del 80 hasta el 97 (o 94) del F<sub>n</sub>3 natural, por ejemplo, dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (SEQ ID NO: 1 o 23) se pueden modificar con respecto a los correspondientes restos de la secuencia natural. Cuando se hace referencia a los aminoácidos en posiciones entre el extremo C y el 94 en una molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, esto se realiza en el contexto de una molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que comprende un enlazador flexible entre la repetición 10<sup>a</sup> y 11<sup>a</sup> del dominio F<sub>n</sub>3, es decir, EIDKPSQ, formando así una proteína de 101 aminoácidos de longitud (así, SEQ ID NO: 1 unida a EIDKPSQ por su extremo C se representa por la SEQ ID NO: 23).

**VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVP**

**GSKSTATISGLKPGVDYITITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRT EIDKPSQ (SEQ ID**

**NO: 23)**

En determinadas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende modificaciones en las secuencias de aminoácidos de la cadena β A, el bucle AB, la cadena β B, el bucle CD, la cadena β E, el bucle EF y la cadena β F, con respecto a las secuencias de las correspondientes regiones de la secuencia natural. Estos polipéptidos se denominan como "ligantes del polo sur" o "ligantes SP" en el presente documento. Los bucles y las cadenas modificadas contribuyen a la unión a la misma diana. La secuencia de aminoácidos del bucle CD se puede extender en longitud o reducir en longitud en relación con el bucle CD del F<sub>n</sub>3 natural, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 humano (SEQ ID NO: 1 o 23). Los ligantes del polo sur pueden comprender modificaciones adicionales en la cadena β G y/o en la región del extremo C con respecto a la secuencia de la correspondiente región de la secuencia natural. En realizaciones ilustrativas, los ligantes del polo sur pueden comprender una o más modificaciones en los aminoácidos que se corresponden con las posiciones 11, 12, 19, 60, 61, 69, 91, 93 y 95-97 de la secuencia natural.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende bucles BC, DE y FG modificados, en comparación con las correspondientes secuencias de los bucles BC, DE y FG establecidas en la SEQ ID NO: 1 o 23, así como modificaciones adicionales en uno o más restos de la cadena β C, cadena β D, cadena β F y cadena β G. Las modificaciones de la región del bucle y de la cadena β contribuyen juntas a la unión a la diana. Estas proteínas se denominan como "ligantes del noroeste" o "ligantes NW", en el presente documento. En realizaciones ilustrativas, los ligantes NW comprenden una o más modificaciones de la estructura en una cualquiera de, o una combinación de, posiciones de aminoácidos que se corresponden con las posiciones de la región estructural R33, T49, Y73 y S89 de la SEQ ID NO: 1 o 23. Las modificaciones adecuadas en las regiones del bucle y del armazón incluyen sustituciones, deleciones y/o inserciones de aminoácidos o combinaciones de los mismos. En determinadas realizaciones, uno o más de los bucles BC, DE y FG se extienden en longitud o se reducen en longitud, o combinaciones de los mismos, con respecto a la secuencia natural. En una realización, cada uno de los bucles BC, DE y FG se extienden en longitud o se reducen en longitud, o combinaciones de los mismos, con respecto a la secuencia natural (por ejemplo, SEQ ID NO: 1 o 23). En determinadas realizaciones, solo se modifica una parte del bucle BC, en particular, la parte del extremo C, con respecto a la secuencia natural. Por ejemplo, el bucle BC se puede modificar solo en los restos de aminoácidos que se corresponden con los aminoácidos 27-31 del bucle BC natural, mientras que el resto del bucle BC (es decir, el que se corresponde con los restos 23-26 del bucle natural) se deja sin modificar.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende un bucle BC, DE y FG modificado, así como una o más modificaciones adicionales en una cualquiera de, o una combinación de, la región del extremo N, la cadena β A, la cadena β B y/o la cadena β E. Estas proteínas se denominan como "ligantes del noreste" o "ligantes NE", en el presente documento. En realizaciones ilustrativas, los ligantes NE se modifican en una cualquiera de, o una combinación de, aminoácidos que se corresponden con las posiciones de la región estructural 1-7, E9, L19, S21 y/o T58 de la secuencia natural (SEQ ID NO: 1 o 23). La combinación de las regiones modificadas del bucle y de la estructura contribuye a la unión a la diana.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende modificaciones en uno o más de los bucles AB, CD, DE y EF, así como modificaciones adicionales en una o más de la cadena β B, la cadena β D y/o la cadena β E. Estas proteínas se denominan como "ligantes frontales del sur" en el presente documento. La combinación de restos modificados en el bucle y la cadena contribuye a la unión a la diana. En realizaciones ilustrativas, se puede modificar un ligante frontal del sur en una o más posiciones de aminoácidos que se corresponden con las posiciones de la región estructural L19, T49, T58, S60, y/o G61 de la SEQ ID NO: 1 o 23 y/o en una o más posiciones de aminoácidos que se corresponden con las posiciones de la región del bucle T14-S17, P51, T56, G40-E47, y/o K63-G65 de la SEQ ID NO: 1 o 23. En realizaciones ilustrativas, un ligante frontal del sur se puede extender en longitud o reducir en longitud en el bucle AB, entre los aminoácidos que se corresponden con los restos 18 y 20 de la secuencia natural y/o en el bucle CD.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende una cadena β A y una cadena β G modificadas, en comparación con la correspondiente cadena de la SEQ ID NO: 1 o 23. Estas proteínas se denominan como "ligantes AG" o "cadena AG" en el presente documento. En determinadas realizaciones, los ligantes de la cadena AG comprenden agrupaciones de modificaciones en las partes del extremo N y del extremo C de F<sub>n</sub>3, por ejemplo, el dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, mientras que la parte media del F<sub>n</sub>3 queda sin modificar. Por ejemplo, un aglutinante de cadena AG puede comprender modificaciones en 16 de 19 de los primeros 19 aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (es decir, correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 1-19 de la SEQ ID NO: 1 o 23) y modificaciones en 13-17 de 18 de los últimos 18 aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (es decir, correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 84-101 de la SEQ ID NO: 9) o en 14-18 de 22 de los últimos 22 aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (es decir, correspondientes a las posiciones de los aminoácidos 80-101 de la SEQ ID NO: 9). En realizaciones ilustrativas, un ligante AG puede comprender modificaciones en una o más posiciones correspondientes a las posiciones 1-7, 9, 11-17, 19, 84-89 y 91-97 de la SEQ ID NO: 9. Preferentemente, las regiones modificadas del ligante AG contribuyen a la unión a la misma diana.

En algunas realizaciones, un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 comprende un bucle CD y EF modificados, así como modificaciones adicionales en uno cualquiera de, o combinación de restos que se corresponden con las posiciones 69 o 91-97 de la SEQ ID NO: 1 o 23. Estas proteínas se denominan como "ligantes del suroeste" o "ligantes SW", en el presente documento. Las regiones modificadas del bucle y de la estructura contribuyen a la unión a la diana.

En determinadas realizaciones, las proteínas comprenden un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tiene inmunogenicidad reducida, en la que la porción del bucle BC se deja como de tipo natural. Preferentemente, tales polipéptidos tienen una menor inmunogenicidad con respecto a un polipéptido equivalente con modificaciones en una mayor parte del bucle BC. En realizaciones ilustrativas, la parte del extremo N del bucle BC se deja como de tipo natural. Por ejemplo, los primeros 1, 2, 3, 4, 5 o 5 restos del bucle BC se pueden dejar como de tipo natural, mientras que se pueden modificar los demás restos del extremo C del bucle BC. En los diseños de F<sub>n</sub>3 que tienen al menos una parte de la región del extremo N del bucle BC como de tipo natural, también puede ser deseable dejar todo o parte de la cadena β B y/o de la cadena β C sin modificar con respecto a la secuencia natural, particularmente las porciones de la cadena β B y/o de la cadena β C que son adyacentes al bucle BC (es decir, la porción del extremo C de la cadena β B y/o la porción del N de la cadena β C). En realizaciones ilustrativas, los dominios F<sub>n</sub>3 que tienen la secuencia natural en una parte del extremo N del bucle BC e inmunogenicidad reducida pueden no tener ninguna modificación en la región del extremo N de la

cadena  $\beta$  A, bucle AB, y cadena  $\beta$  B. En los diseños de Fn3 que tienen una parte del bucle BC como natural, la porción modificada del bucle BC puede contribuir a la unión a la diana junto con las modificaciones en otras regiones del dominio  $^{10}\text{Fn3}$ .

5 En determinadas realizaciones, las proteínas comprenden un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que tiene inmunogenicidad reducida, en el que el fuerte anclaje de HLA en la región de cadena  $\beta$  B/bucle BC/cadena  $\beta$  C (el "anclaje de BC") se ha eliminado o destruido (por ejemplo, modificado con respecto a la secuencia natural de una forma que reduce la afinidad de unión a uno o más receptores de HLA). Por ejemplo, el anclaje de BC se puede eliminar o destruir modificando el Fn3, por ejemplo, el dominio  $^{10}\text{Fn3}$  en una o más posiciones que se corresponden con las posiciones L19, S21, R33 y/o T35  
10 de la SEQ ID NO: 1. Cuando el anclaje de BC se ha eliminado o destruido, es posible modificar la secuencia del bucle BC sin aumentar de manera significativa el potencial inmunogénico de la región BC. En consecuencia, muchos de estos diseños de Fn3 tienen modificaciones en el bucle BC además de las modificaciones en la cadena  $\beta$  B y/o en la cadena  $\beta$  C. El bucle BC puede contribuir a la unión a la diana, de manera opcional, en combinación con modificaciones en otras regiones del dominio Fn3. Las modificaciones en la cadena  $\beta$  B y/o en la cadena  $\beta$  C pueden contribuir o no  
15 a la unión a la diana.

En realizaciones ilustrativas, una FBS, por ejemplo, un dominio  $^{10}\text{Fn3}$ , se une a una diana deseada con una  $K_d$  de menos de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menos. En algunas realizaciones, la FBS, por ejemplo, el dominio  $^{10}\text{Fn3}$ , se une a una diana deseada con una  $K_d$  entre 1 pM y 1  $\mu\text{M}$ , entre 100 pM y 500 nM,  
20 entre 1 nM y 500 nM, o entre 1 nM y 100 nM. En realizaciones ilustrativas, el resto  $^{10}\text{Fn3}$  se une específicamente a una diana que no está unida mediante un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  natural, en particular, el dominio  $^{10}\text{Fn3}$  humano natural que tiene, por ejemplo, SEQ ID NO: 1-8.

En determinadas realizaciones, un resto FBS comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos un 40 %, 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 % o 99 % idéntica a una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo de secuencias que consiste de las SEQ ID NO: 1-16, y el FBS se une específicamente a una diana, por ejemplo, con una  $K_d$  de menos de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menos. El resto FBS puede comprender cambios (o alteraciones) de aminoácidos en uno o más bucles y una o más regiones  
25 estructurales.

En algunas realizaciones, uno o más restos del motivo de unión a integrina "arginina-glicina-ácido aspártico" (RGD) (aminoácidos 78-80 de la SEQ ID NO: 1) pueden estar sustituidos para perturbar la unión a la integrina. En algunas realizaciones, el bucle FG de los polipéptidos proporcionados en el presente documento no contiene un sitio de unión a integrina RGD. En una realización, la secuencia de RGD se sustituye por una secuencia de aminoácido polar-aminoácido neutro-aminoácido ácido (en la dirección del extremo N al extremo C). En determinadas realizaciones, la secuencia RGD se sustituye por SGE o RGE.  
30

En algunas realizaciones, las secuencias de aminoácidos de las regiones del extremo N y/o del extremo C de un resto FBS se han modificado mediante delección, sustitución o inserción con respecto a las secuencias de aminoácidos de las correspondientes regiones de los dominios  $^{10}\text{Fn3}$  que comprenden, por ejemplo, SEQ ID NO: 1.  
35

En determinadas realizaciones, la secuencia de aminoácidos de los primeros 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 o 9 restos de la SEQ ID NO: 1 se pueden modificar o eliminar en los polipéptidos proporcionados en el presente documento con respecto a la secuencia de los correspondientes aminoácidos del dominio  $^{10}\text{Fn3}$  humano natural que tiene la secuencia SEQ ID NO: 1. En realizaciones ilustrativas, los aminoácidos correspondientes a los aminoácidos 1-7, 8 o 9 de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-16 se pueden sustituir por una región del extremo N alternativa que tiene de 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, 1-2, o 1 aminoácido de longitud. Las regiones del extremo N alternativas ilustrativas incluyen (representadas por el código de aminoácidos de una sola letra) M, MG, G, MGVS DVPRDL (SEQ ID NO: 24) y GVS DVPRDL (SEQ ID NO: 25), o truncamientos en el extremo N de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 24 o 25.  
40  
45  
50 Otras regiones del extremo N adecuadas alternativas incluyen, por ejemplo,  $X_n\text{SDVPRDL}$  (SEQ ID NO: 26),  $X_n\text{DVPRDL}$  (SEQ ID NO: 27),  $X_n\text{VPRDL}$  (SEQ ID NO: 28),  $X_n\text{PRDL}$  (SEQ ID NO: 29),  $X_n\text{RDL}$  (SEQ ID NO: 30),  $X_n\text{DL}$  (SEQ ID NO: 31), o  $X_n\text{L}$ , en las que  $n = 0, 1$  o 2 aminoácidos, en las que cuando  $n = 1$ , X es Met o Gly, y cuando  $n = 2$ , X es Met-Gly. Cuando se añade una secuencia de Met-Gly al extremo N de un dominio  $^{10}\text{Fn3}$ , la M generalmente se escindirá, dejando una G en el extremo N. En otras realizaciones, la región del extremo N alternativa comprende la  
55 secuencia de aminoácidos MASTSG (SEQ ID NO: 32).

Como se describe adicionalmente en el presente documento, en algunas realizaciones, los primeros siete u ocho restos (es decir, los restos 1-7 o 1-8) de la SEQ ID NO: 1 se eliminan, generando un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que tiene la secuencia de aminoácidos de, por ejemplo, SEQ ID NO: 8. También pueden añadirse secuencias adicionales al extremo N o C de un dominio  $^{10}\text{Fn3}$  que tiene la secuencia de aminoácidos de una cualquiera de las SEQ ID NOs: 1-16. Por ejemplo, en algunas realizaciones, la extensión del extremo N consiste en una secuencia de aminoácidos seleccionada del grupo que consiste en: M, MG, y G. Por ejemplo, uno cualquiera de la SEQ ID NO: 1-16 puede ir precedido de M, MG, o G.  
60

65 También se divulga en el presente documento un resto FBS que está basado en una repetición de Fn3 diferente a la repetición  $10^9$  del dominio de tipo III de la fibronectina, por ejemplo, fibronectina humana. Por ejemplo, un resto FBS

puede ser similar a cualquier otra repetición de tipo III de fibronectina, por ejemplo, la 1ª, 2ª, 3ª, 4ª, 5ª, 6ª, 7ª, 8ª, 9ª, 11ª, 12ª, 13ª, 14ª, 15ª, 16ª, 17ª y 18ª repeticiones de Fn3. Un resto de FBS divulgado en el presente documento puede proceder de una molécula diferente a la fibronectina. Los restos de FBS ilustrativos se pueden derivar de tenascina, una proteína que está compuesta por 15 dominios Fn3 con similitudes de secuencia similares entre sí a los que aparecen en la fibronectina. Estas repeticiones se describen, por ejemplo, en Jacobs et al., Protein Engineering, Design & Selection, 25:107 (2012). Basándose en la homología de las repeticiones de la molécula de fibronectina y las que aparecen en la molécula de tenascina, se han creado moléculas artificiales basadas en estas homologías. Las proteínas que comprenden una secuencia de aminoácidos de consenso basada en la homología de los dominios de la molécula de fibronectina se denominan como Fibcon y FibconB (documento WO 2010/093627 y Jacobs et al. (2012) *supra.*) y las basadas en la homología de los dominios de la molécula de tenascina se denominan como Tencon. Una secuencia de aminoácidos Fibcon ilustrativa comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: MPAPTDLRFTNETPSSLLISWTPPRVQITGYIIRYGPVGS DGRVKEFTVPPSVSSATI TGLKPGTEYITISVIALKDNQSESEPLRGRVTTGG (FibconB; SEQ ID NO: 33), en la que el bucle AB consiste de los aminoácidos 13-16 (TPSS; SEQ ID NO: 34), el bucle BC consiste de los aminoácidos 22-28 (TPPRVQI; SEQ ID NO: 35), el bucle CD consiste de los aminoácidos 38-43 (VGSDGR; SEQ ID NO: 36), el bucle AB consiste de los aminoácidos 51-54 (PSVS; SEQ ID NO: 37), el bucle EF consiste de los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 38) y el bucle FG consiste de los aminoácidos 75-81 (KDNQSESE; SEQ ID NO: 39). Otra secuencia de aminoácidos Fibcon ilustrativa comprende la siguiente secuencia de aminoácidos: LDAPTDLQVTNVTDTSTVSWTPPSATITGYRITYTPSNGPGPEKELTVPPSSTSVTI TGITPGVEYVSVYALKDNQESPLVGTCTT (SEQ ID NO: 40; Jacobs et al., *supra.*)

Las proteínas Fn3 derivadas de tenascina incluyen Tencons (documentos WO 2010/051274, WO 2010/051310 y WO 2011/137319. Una proteína Tencon ilustrativa tiene la siguiente secuencia de aminoácidos: LPAPKNLVSEVTEDSLRLSWTAPDAAFDSFLIQYQSEKVG EAINLTVPGSERSY DLTGLKPGTEYTVSIYGVKGGHRSNPLSAEFTT (SEQ ID NO: 41; Jacobs et al., *supra.*, y WO 2011/137319), en la que el bucle AB consiste de los aminoácidos 13-16 (TEDS; SEQ ID NO: 42), el bucle BC consiste de los aminoácidos 22-28 (TAPDAAF; SEQ ID NO: 43), el bucle CD consiste de los aminoácidos 38-43 (SEKVGE; SEQ ID NO: 44), el bucle AB consiste de los aminoácidos 51-54 (GSER; SEQ ID NO: 45), el bucle EF consiste de los aminoácidos 60-64 (GLKPG; SEQ ID NO: 46) y el bucle FG consiste de los aminoácidos 75-81 (KGGHRSN; SEQ ID NO: 47).

Un resto Fibcon, FibconB o Tencon, o variantes de unión a diana de los mismos, tanto por sí mismos como unidos a un resto heterólogo, se pueden fusionar como se describe en el presente documento. Los dominios Fn3 de otras proteínas, por ejemplo, hormonas de la superficie celular y receptores de citoquinas, chaperoninas y dominios de unión a hidratos de carbono, se pueden conjugar como se describe en el presente documento.

Las proteínas o restos FBS se describen, por ejemplo, en los documentos WO 2010/093627, WO 2011/130324, WO 2009/083804, WO 2009/133208, WO 02/04523, WO 2012/016245, WO 2009/023184, WO 2010/051310, WO 2011/020033, WO 2011/051333, WO 2011/051466, WO 2011/092233, WO 2011/100700, WO 2011/130324, WO 2011/130328, WO 2011/137319, WO 2010/051274, WO 2009/086116, WO 09/058379, WO 2013/067029, WO 2012/016245, WO 2014/120891 y WO 2014/043344: cualesquiera de las proteínas o restos FBS descritos en dichas publicaciones se pueden usar como se describe en el presente documento.

En determinadas realizaciones, una proteína comprende al menos 2 restos FBS, por ejemplo, la proteína comprende un resto FBS multivalente. Por ejemplo, un FBS multivalente puede comprender 2, 3 o más restos FBS, por ejemplo, dominios <sup>10</sup>Fn3 que están asociados covalentemente. En realizaciones ilustrativas, el resto FBS es una proteína biespecífica o dimérica que comprende dos dominios <sup>10</sup>Fn3.

Los restos FBS, por ejemplo, los dominios <sup>10</sup>Fn3, de una proteína multivalente pueden estar conectados mediante un enlazador polipeptídico. Los enlazadores polipeptídicos ilustrativos incluyen polipéptidos que tienen 1-20, 1-15, 1-10, 1-8, 1-5, 1-4, 1-3, o 1-2 aminoácidos. Los enlazadores adecuados para unir los dominios <sup>10</sup>Fn3 son los que permiten que los dominios separados se plieguen independientemente entre sí formando una estructura tridimensional que permite la unión de alta afinidad a una molécula diana. Los ejemplos específicos de enlazadores adecuados incluyen enlazadores de tipo glicina-serina, enlazadores de tipo glicina-prolina, enlazadores de tipo prolina-alanina, así como cualesquiera otros enlazadores descritos en el presente documento. En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de tipo glicina-prolina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y prolina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, y 3 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen GPG, GPGPGPG (SEQ ID NO: 48) y GPGPGPGPGPG (SEQ ID NO: 49). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de tipo prolina-alanina. Estos enlazadores comprenden restos de prolina y alanina y pueden tener entre 3 y 30, 10 y 30, 3 y 20 y 6 y 18 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen PAPAPA (SEQ ID NO: 50), PAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 51) y PAPAPAPAPAPAPAPAPA (SEQ ID NO: 52). En algunas realizaciones, el enlazador es un enlazador de tipo glicina-serina. Estos enlazadores comprenden restos de glicina y serina y pueden tener entre 8 y 50, 10 y 30, y 10 y 20 aminoácidos de longitud. Los ejemplos de dichos enlazadores incluyen GSGSGSGSGS ((GS)<sub>5</sub>; SEQ ID NO: 53), GSGSGSGSGSGS ((GS)<sub>6</sub>; SEQ ID NO: 54), GSGSGSGSGSGSGSGSGS ((GS)<sub>10</sub>; SEQ ID NO: 55), GGGSGGGSGGGSG ((G<sub>4</sub>S)<sub>4</sub>; SEQ ID NO: 56), GGGSGGGSGGGSGGGSGGGSG ((G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>; SEQ ID NO: 57), y GGGSGGGSGGGSGGGSG ((G<sub>4</sub>S)<sub>5</sub>; SEQ ID NO: 58). En realizaciones ilustrativas, el enlazador no contiene ningún par Asp-Lys (DK).

Restos PmXn, por ejemplo, Restos estabilizantes

5 En el presente documento se divulga un FBS, por ejemplo, un resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, que está unido por su extremo C a un resto que consiste en PmXn, en el que P es una prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1, y P es el extremo N respecto a X. El resto PmXn comprendido en la proteína FBS aislada de la invención está unido directamente al 94° aminoácido de un resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (basándose en la numeración de aminoácidos de la SEQ ID NO: 1). Un resto PmXn puede estar unido a un resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tiene una  
10 una secuencia de aminoácidos que es homóloga de la SEQ ID NO: 1 o comprende, consiste esencialmente o consiste en una secuencia de aminoácidos mostrada en la Tabla 1 o 2. Un resto de prolina individual en el extremo de la SEQ ID NO: 1 se denomina como "95Pro" o "Pro95" o "P95" o "95P".

Los restos <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 ilustrativos unidos a un resto PmXn incluyen los siguientes:

LEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK  
PGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (SEQ ID NO: 59)

15 VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKS  
TATISGLKPGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTPmXn (SEQ ID NO: 60)

En PmXn, m puede ser 1, 2, 3 o más. Por ejemplo, m puede ser 1-3 o m puede ser 1-2. "n" puede ser 0, 1, 2, 3 o más, por ejemplo, n puede ser 1-3 o 1-2.

20 Como se describe adicionalmente en el presente documento, estos restos <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se pueden modificar para unirse a una diana (y formar restos FBS), modificando la secuencia de aminoácidos de uno o más bucles y/o una o más cadenas β. Los restos de FBS que están unidos a PmXn se denominan en el presente documento como "restos FBS modificados". En consecuencia, en el presente documento se proporcionan proteínas que comprenden un resto FBS que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 80 %, 90 %, o 95 % idéntica a la SEQ ID NO: 59 o 60, en la que la proteína comprende PmXn, y en la que el FBS se une específicamente a una diana (diferente a la del dominio RGD).  
25

En PmXn, n puede ser 0, en cuyo caso, el aminoácido del extremo C de la proteína es Pm, por ejemplo, P. En determinadas realizaciones, n no es 0, y puede ser, por ejemplo, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10 o más. Por ejemplo, n puede ser 0-10, 0-5, 0-3, 1-10, 1-5, 1-3 o 1-2. Sin embargo, más de 10 aminoácidos pueden estar unidos a la prolina. Por ejemplo, en un resto FBS en tándem o un resto FBS fusionado con otro polipéptido, el aminoácido del extremo C del resto FBS puede estar unido a una o más prolinas, y la última prolina está unida al segundo resto FBS o con el resto heterólogo. Por tanto, en determinadas realizaciones, n puede ser un número entero comprendido de 0-100, 0-200, 0-300, 0-400, 0-500 o más.  
35

En determinadas realizaciones, PmXn comprende una cisteína. Por ejemplo, el primer aminoácido después de la prolina puede ser una cisteína, y la cisteína puede ser el último aminoácido de la molécula o la cisteína puede ir seguida de uno o más aminoácidos. La presencia de una cisteína permite la conjugación de restos heterólogos al resto FBS, por ejemplo, restos químicos, por ejemplo, PEG. Los restos PmXn ilustrativos que comprenden una cisteína incluyen: PmCXn, en la que C es una cisteína. Otro ejemplo es PmXn<sub>1</sub>CXn<sub>2</sub>, en la que n<sub>1</sub> y n<sub>2</sub> son independientemente 0 o un número entero que es al menos 1. Por ejemplo, n<sub>1</sub> puede ser 1 y n<sub>2</sub> puede ser 1, 2, 3, 4 o 5.  
40

Los restos PmXn ilustrativos incluyen los relacionados en la Tabla 3.

45

Tabla 3: Restos PmXn ilustrativos

Restos con 1 prolina	Restos con 2 prolinas
P	PP
PI	PPI
PC	PPC
PID	PPID
PIE	PPIE

(continuación)

Restos con 1 prolina	Restos con 2 prolinas
PIDK (SEQ ID NO: 61)	PPIDK (SEQ ID NO: 62)
PIEK (SEQ ID NO: 63)	PPIEK (SEQ ID NO: 64)
PIDKP (SEQ ID NO: 65)	PPIDKP (SEQ ID NO: 66)
PIEKP (SEQ ID NO: 67)	PPIEKP (SEQ ID NO: 68)
PIDKPS (SEQ ID NO: 69)	PPIDKPS (SEQ ID NO: 70)
PIEKPS (SEQ ID NO: 71)	PPIEKPS (SEQ ID NO: 72)
PIDKPC (SEQ ID NO: 73)	PPIDKPC (SEQ ID NO: 74)
PIEKPC (SEQ ID NO: 75)	PPIEKPC (SEQ ID NO: 76)
PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77)	PPIDKPSQ (SEQ ID NO: 78)
PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79)	PPIEKPSQ (SEQ ID NO: 80)
PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81)	PPIDKPCQ (SEQ ID NO: 82)
PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83)	PPIEKPCQ (SEQ ID NO: 84)
PHHHHHH (SEQ ID NO: 85)	PPHHHHHH (SEQ ID NO: 86)
PCHHHHHH (SEQ ID NO: 87)	PPCHHHHHH (SEQ ID NO: 88)

5 Cualquiera de los restos PmXn, por ejemplo, los mostrados en la Tabla 3, pueden ir seguidos de una cola de histidina, por ejemplo, una etiqueta 6xHis, u otra etiqueta. Esto no excluye que una cola de histidina pueda estar incluida en PmXn.

10 La adición de un resto PmXn a un resto FBS potencia una o más características del resto FBS. Por ejemplo, como se muestra en los Ejemplos, esto potencia la termoestabilidad de un resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 con respecto a un resto que no está unido a un resto PmXn. Se espera que la mejora en la termoestabilidad mejore otras propiedades deseables tales como la solubilidad, el correcto plegado y el nivel de expresión. Por ejemplo, como se muestra en el Ejemplo, la presencia de un resto PmXn en el extremo C de un FBS potencia la solubilidad del FBS con respecto al FBS que no se ha unido al resto PmXn.

15 Por lo tanto, en determinadas realizaciones, la T<sub>m</sub> de un FBS, por ejemplo, un resto <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se potencia en al menos 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, o 15 °C con respecto al resto FBS que no se ha unido a un resto PmXn. Por ejemplo, la T<sub>m</sub> puede aumentarse en 1-30, 1-25, 1-20, 1-15, 1-10, o 1-5 °C con respecto al resto FBS que no se ha unido a un resto PmXn. La T<sub>m</sub> se puede medir por fluorescencia de exploración térmica (TSF), por ejemplo, de la siguiente manera. Muestras de proteínas, por ejemplo, muestras de HTPP, se normalizaron a 0,2 mg/ml en PBS. Se añadió 1 µl de tinte naranja SYPRO® diluido 1:40 con PBS a 25 µl de cada muestra y la placa se selló con un sello adhesivo transparente para microplacas de 96 pocillos. Las muestras se exploraron utilizando una máquina BioRad RT-PCR con aumento de la temperatura de 25 °C - 95 °C, a una velocidad de 2 grados por minuto. Los datos se analizaron utilizando el programa BioRad CFX manager 2.0. La T<sub>m</sub> también se midió por calorimetría de barrido diferencial (DSC) de la siguiente forma. Se exploró una solución de 0,5 mg/ml en un calorímetro de barrido diferencial VP-capilar (GE Microcal) con aumento de la temperatura de 15 °C a 110 °C a una velocidad de 1 grado por minuto a una presión de 70 p.s.i. Los datos se analizaron frente a un ciclo de control con el tampón apropiado utilizando el mejor ajuste utilizando el programa informático Origin (OriginLab Corp).

25 En determinadas realizaciones, la solubilidad de un resto FBS se potencia mediante su unión a un resto PmXn. Dicha molécula puede existir a una concentración de al menos 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

#### Restos PKE

35 Los restos FBS se pueden unir a restos PKE para ampliar la semivida de los restos FBS. Los restos PKE ilustrativos incluyen albúmina de suero humano; proteínas que se unen a la albúmina de suero humano (por ejemplo, una FBS que se une a HSA o ABD); Fc; o cualquiera de sus porciones o variantes; y PEG. Estos restos se pueden unir por el extremo N o por el extremo C al resto PmXn y/o a FBS.

40 Marcadores y compuestos terapéuticos conjugados con cisteína

En determinadas realizaciones, un resto FBS unido a un resto PmXn (y denominado como "resto FBS modificado"), en el que al menos uno o más de los aminoácidos "X" es una cisteína, está unido mediante la una o más cisteínas, a un resto heterólogo, tal como un resto marcador, un resto biológicamente activo (por ejemplo, un agente terapéutico) o un resto de unión.

5 Los restos FBS descritos en el presente documento se pueden conjugar mediante una cisteína del extremo C a un agente terapéutico para formar un inmunoconjugado tal como un conjugado FBS-fármaco (FBS-DC; también "conjugado de adnectina-fármaco").

10 En un FBS-DC, la FBS está conjugada a un fármaco, actuando la FBS como un agente de direccionamiento para dirigir el FBS-DC a una célula diana que expresa su antígeno, tal como una célula cancerosa. Preferentemente, el antígeno es un antígeno asociado a un tumor, es decir, uno que se expresa o expresa en exceso de forma única por la célula cancerosa. Una vez allí, el fármaco se libera, bien dentro o bien fuera de la célula diana o en su proximidad, para actuar como agente terapéutico. Para una revisión del mecanismo de acción y del uso de conjugados de fármacos que se utilizan con anticuerpos, por ejemplo, en terapia contra el cáncer, véase Schrama et al., Nature Rev. Drug Disc., 5:147 (2006).

Los agentes terapéuticos adecuados para su uso en conjugados de fármacos incluyen antimetabolitos, agentes alquilantes, ligantes del surco menor del ADN, intercaladores de ADN, reticulantes de ADN, inhibidores de la histona desacetilasa, inhibidores de exportación nuclear, inhibidores del proteosoma, inhibidores de la topoisomerasa I o II, inhibidores de la proteína de choque térmico, inhibidores de tirosina quinasa, antibióticos y agentes antimitóticos. En un FBS-DC, la FBS y el agente terapéutico se conjugan preferentemente mediante un enlazador escindible tal como un enlazador de peptidilo, disulfuro o hidrazona. Más preferentemente, el enlazador es un enlazador de peptidilo tal como Val-Cit, Ala-Val, Val-Ala-Val, Lys-Lys, Pro-Val-Gly-Val-Val (SEQ ID NO: 89), Ala-Asn-Val, Val-Leu-Lys, Ala-Ala-Asn, Cit-Cit, Val-Lys, Lys, Cit, Ser o Glu. Los FBS-DC se pueden preparar de acuerdo con métodos similares a los descrito en las patentes de Estados Unidos con números 7.087.600; 6.989.452; y 7.129.261; publicaciones PCT números WO 02/096910; WO 07/038658; WO 07/051081; WO 07/059404; WO 08/083312; y WO 08/103693; publicaciones de patente estadounidense con nros. 2006/0024317; 2006/0004081; u 2006/0247295. Un enlazador puede estar unido él mismo, por ejemplo, unido covalentemente, por ejemplo, usando química de maleimida, a una cisteína del resto PmXn, en el que al menos una X es una cisteína. Por ejemplo, un enlazador puede estar unido covalentemente a un FBS-PmXn, en el que al menos una X es una cisteína. Por ejemplo, un enlazador puede estar unido a un FBS-PmCn, en el que P es una prolina, C es una cisteína, y m y n son números enteros que son al menos 1, por ejemplo, 1-3. La unión a una cisteína puede llevarse a cabo como es conocido en la técnica, usando química de maleimida (por ejemplo, Imperiali, B. et al., Protein Engineering: Nucleic Acids and Molecular Biology, Vol. 22, págs. 65-96, Gross, H.J., ed. (2009)). Para conectar un enlazador a una cisteína de una FBS, el enlazador puede, por ejemplo, comprender un resto maleinimido, dicho resto reacciona a continuación con la cisteína para formar un enlace covalente. En determinadas realizaciones, los aminoácidos que rodean la cisteína están optimizados para facilitar la reacción química. Por ejemplo, una cisteína puede estar rodeada por aminoácidos cargados negativamente para una reacción más rápida con respecto a una cisteína que está rodeada por un tramo de aminoácidos cargados positivamente (documento EP 1074563).

Para el tratamiento del cáncer, el fármaco es preferentemente un fármaco citotóxico que produce la muerte de la célula cancerosa diana. Los fármacos citotóxicos que se pueden usar en los FBS-DC incluyen los siguientes tipos de compuestos, y sus análogos y derivados:

45 (a) enediinas tales como caliqueamicina (véase, por ejemplo, Lee et al., J. Am. Chem. Soc., 109:3464, 3466 (1987)) y uncial-amicina (véase, por ejemplo, Davies et al., documento WO 2007/038868 A2 (2007) y Chowdari et al., patente de Estados Unidos n.º 8.709.431 B2 (2012));

50 (b) tubulisininas (véase, por ejemplo, Domling et al., patente de Estados Unidos n.º 7.778.814 B2 (2010); Cheng et al., patente de Estados Unidos n.º 8.394.922 B2 (2013); y Cong et al., publicación de Estados Unidos n.º 2014/0227295 A1;

55 (c) CC-1065 y duocarmicina (véase, por ejemplo, Boger, patente de Estados Unidos n.º 6.5458.530 B1 (2003); Sufi et al., patente de Estados Unidos n.º 8.461.117 B2 (2013); y Zhang et al., publicación de Estados Unidos n.º 2012/0301490 A1 (2012));

60 (d) epotilonas (véase, por ejemplo, Vite et al., publicación de Estados Unidos n.º 2007/0275904 A1 (2007) y patente de Estados Unidos n.º RE42,930 E (2011));

(e) auristatinas (véase, por ejemplo, Senter et al., patente de Estados Unidos n.º 6.844.869 B2 (2005) y Dronina et al., patente de Estados Unidos n.º 7.498.298 B2 (2009));

65 (f) dímeros de pirrolobenzodiazepina (PBD) (véase, por ejemplo, Howard et al., publicaciones de Estados Unidos números 2013/0059800 A1 (2013) y 2013/0028919 A1 (2013); y documento WO 2013/041606 A1 (2013)); y

(g) maitansinoides tales como DM1 y DM4 (véase, por ejemplo, Chari et al., patente de Estados Unidos n.º 5.208.020 (1993) y Amphlett et al., patente de Estados Unidos n.º 7.374.762 B2 (2008)).

5 En determinadas realizaciones, un FBS-PmXn, en el que al menos un X es una cisteína, está unido a un resto marcador o detectable para su uso, por ejemplo, en detección o formación de imágenes *in vitro* o *in vivo*.

10 Los marcadores detectables pueden ser cualquiera de los diversos tipos usados actualmente en el campo del diagnóstico *in vitro*, incluyendo marcadores particulados que incluyen soles metálicos tales como oro coloidal, isotopos tales como I<sup>125</sup> o Tc<sup>99</sup> presentados por ejemplo con un agente quelante peptídico del tipo N<sub>2</sub>S<sub>2</sub>, N<sub>3</sub>S o N<sub>4</sub>, cromóforos que incluyen marcadores fluorescentes, biotina, marcadores luminiscentes, marcadores fosforescentes y similares, así como marcadores enzimáticos que convierten un sustrato dado en un marcador detectable. y etiquetas de polinucleótidos que se revelan tras la amplificación tal como mediante la reacción en cadena de la polimerasa. Un anticuerpo biotinilado podría a continuación ser detectable por unión a avidina o estreptavidina. Los marcadores enzimáticos adecuados incluyen peroxidasa de rábano picante, fosfatasa alcalina y similares. Por ejemplo, el marcador puede ser la enzima fosfatasa alcalina, detectada midiendo la presencia o la formación de quimioluminiscencia tras la conversión de sustratos de 1,2 dioxetano tales como adamantil metoxi fosforiloxi fenil dioxetano (AMPPD), 3-(4-(metoxiespiro{1,2-dioxetano-3,2'-(5'-cloro)tricyclo {3.3.1. 1 3,7} decan}-4-il)fenilfosfato disódico (CSPD), así como CDP y CDP-STAR® u otros sustratos luminiscentes bien conocidos por los expertos en la materia, por ejemplo, los quelatos de lantánidos adecuados tales como Terbio(III) y Europio(III).

20 Los restos detectables que se pueden usar incluyen agentes radioactivos, tales como: metales pesados radiactivos tales como quelatos de hierro, quelatos radioactivos de gadolinio o manganeso, emisores de positrones de oxígeno, nitrógeno, hierro, carbono o galio, <sup>18</sup>F, <sup>60</sup>Cu, <sup>61</sup>Cu, <sup>62</sup>Cu, <sup>64</sup>Cu, <sup>124</sup>I, <sup>86</sup>Y, <sup>89</sup>Zr, <sup>66</sup>Ga, <sup>67</sup>Ga, <sup>68</sup>Ga, <sup>44</sup>Sc, <sup>47</sup>Sc, <sup>11</sup>C, <sup>111</sup>In, <sup>114m</sup>In, <sup>114</sup>In, <sup>125</sup>I, <sup>124</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>131</sup>I, <sup>123</sup>I, <sup>32</sup>Cl, <sup>33</sup>Cl, <sup>34</sup>Cl, <sup>74</sup>Br, <sup>75</sup>Br, <sup>76</sup>Br, <sup>77</sup>Br, <sup>78</sup>Br, <sup>89</sup>Zr, <sup>186</sup>Re, <sup>188</sup>Re, <sup>86</sup>Y, <sup>90</sup>Y, <sup>177</sup>Lu, <sup>99</sup>Tc, <sup>212</sup>Bi, <sup>213</sup>Bi, <sup>212</sup>Pb, <sup>225</sup>Ac, o <sup>153</sup>Sm.

25 El medio de detección se determina por el marcador seleccionado. Se puede conseguir el aspecto del marcador o sus productos de reacción a simple vista, cuando el marcador está en forma de partículas y se acumula a niveles adecuados, o utilizando instrumentos tales como un espectrofotómetro, un luminómetro, un fluorómetro, y similares, todos de acuerdo con la práctica convencional.

30 Un resto detectable puede unirse a una cisteína de acuerdo con los métodos conocidos en la materia. Cuando el resto detectable es un agente radioactivo, por ejemplo, los descritos adicionalmente en el presente documento, el resto detectable se une a una FBS mediante un agente quelante que es reactivo con las cisteínas, tal como un agente quelante que contiene una maleimida, tal como una maleimida-NODAGA o una maleimida-DBCO. La maleimida-NODAGA o la maleimida-DBCO se pueden hacer reaccionar con una cisteína en el extremo C de una FBS (por ejemplo, mediante el resto PmXn, en el que al menos un X de PmXn es una cisteína), para dar FBS-NODAGA o FBS-DBCO, respectivamente. Uno cualquiera de los siguientes agentes quelantes se puede usar con la condición de que comprenda, o pueda modificarse para comprender, un resto reactivo que reaccione con cisteínas: DFO, DOTA y sus derivados (CB-DO2A, 3p-C-DEPA, TCMC, Oxo-DO3A), TE2A, CB-TE2A, CB-TE1A1P, CB-TE2P, MM-TE2A, DM-TE2A, diamsar y sus derivados, NODASA, NODAGA, NOTA, NETA, TACN-TM, DTPA, 1B4M-DTPA, CHX-A"-DTPA, TRAP (PRP9), NOPO, AAZTA y sus derivados (DATA), H<sub>2</sub>dedpa, H<sub>4</sub>octapa, H<sub>2</sub>azapa, H<sub>5</sub>decapa, H<sub>6</sub>fospa, agentes quelantes basados en HBED, SHBED, BPCA, CP256, PCTA, HEHA, PEPA, EDTA, TETA, y TRITA, y análogos cercanos y derivados de los mismos.

45 En determinadas realizaciones, una FBS se marca con un trazador PET y se utiliza como agente de obtención de imágenes *in vivo*. Por ejemplo, una FBS se puede marcar con el trazador PET <sup>64</sup>Cu. El <sup>64</sup>Cu se puede unir a una FBS por una cisteína del extremo C con un agente quelante, tal como maleimida-NODAGA.

#### 50 Moléculas ilustrativas

55 En determinadas realizaciones, una proteína comprende (i) un resto FBS que comprende una secuencia de aminoácidos que es al menos aproximadamente un 50 %, 60 %, 70 %, 75 %, 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 97 %, 98 %, o 99 % idéntica a una cualquiera de las SEQ ID NOS: 1-16; y (ii) PmXn, en el que P es una prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1, en el que la proteína se une específicamente a una diana (por ejemplo, con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, 100 nM, 50 nM, 10 nM, 5 nM, 1 nM, 500 pM, 100 pM o menos, tal como se determina, por ejemplo, mediante resonancia de plasmón superficial (SPR), tal como Biacore) y en la que el resto PmXn mejora al menos una propiedad del resto FBS con respecto a una proteína que consiste en el resto FBS sin modificar.

60 En determinadas realizaciones, una propiedad potenciada transmitida por el resto PmXn es una estabilidad de la proteína potenciada, por ejemplo, un aumento en la temperatura de fusión (T<sub>m</sub>) de al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C, 6 °C, 7 °C, 8 °C, 9 °C, 10 °C, 11 °C, 12 °C, 13 °C, 14 °C, 15 °C, 1-15 °C, 2-15 °C, 3-15 °C, 5-15 °C, 5-15 °C, 1-10 °C, 2-10 °C, 3-10 °C, 4-10 °C o 5-10 °C. La T<sub>m</sub> se puede determinar, por ejemplo, mediante Fluorescencia de barrido térmico (TSF) o Calorimetría de barrido diferencial (DSC). "T<sub>m</sub> potenciada" se refiere a una potenciación estadísticamente significativa de la T<sub>m</sub>.

En determinadas realizaciones, una proteína que comprende un resto FBS y un resto PmXn está presente en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, a una concentración de al menos 10 mg/ml, 20 mg/ml, 30 mg/ml, 40 mg/ml, 50 mg/ml, 60 mg/ml, 70 mg/ml, 80 mg/ml, 90 mg/ml o 100 mg/ml.

5 En determinadas realizaciones, una proteína que comprende un resto FBS y un resto PmXn está presente en una composición, por ejemplo, una composición farmacéutica, principalmente como monómero, por ejemplo, al menos el 80 %, 85 %, 90 %, 95 %, 98 % o 99 % de la proteína en la composición está en forma monomérica. Se puede determinar el grado de monomericidad de una solución de proteína mediante cromatografía de exclusión molecular (SEC), por ejemplo, usando una columna Superdex (GE Healthcare) en un sistema HPLC Agilent 1100 o 1200 con detección UV a  $A_{214}$  nm y  $A_{280}$  nm y con detección por fluorescencia (excitación = 280 nm, emisión = 350 nm). Se puede emplear un tampón de sulfato de sodio 100 mM, fosfato de sodio 100 mM, cloruro de sodio 150 mM, (por ejemplo, pH 6,8) a un caudal adecuado de la columna SEC. Se usan patrones de filtración en gel (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) para la calibración del peso molecular.

15 En determinadas realizaciones, una proteína que comprende un resto FBS y un resto PmXn tiene una actividad biológica que es al menos tan fuerte como la del resto FBS sin modificar. La actividad biológica puede ser una afinidad de unión a una diana o una actividad biológica en un ensayo, por ejemplo, la capacidad para destruir células tumorales. En determinadas realizaciones, la actividad biológica de la proteína está comprendida en un 5 %, 10 %, 25 %, 50 %, 20 100 %, 2 veces o más de la actividad del resto FBS sin modificar.

Una proteína que comprende un resto FBS y un resto PmXn puede comprender también una combinación de las anteriores características. Por ejemplo, una proteína puede ser soluble a concentraciones de hasta 50 mg/ml, estar presente al menos en un 90 % en forma monomérica, y/o tener una actividad biológica que es al menos tan potente como la de la FBS sin modificar.

25 Cuando se refiere a una propiedad potenciada, la potenciación es una potenciación estadísticamente significativa.

#### 30 Tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína

Una forma de crear y probar rápidamente dominios FBS con propiedades de unión específicas es la tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína de Adnexus, una empresa de Bristol-Myers Squibb. Dicha tecnología de expresión y marcado *in vitro*, denominada PROfusion, aprovecha las fusiones de ácido nucleico-proteína (fusiones de ARN y ADR de proteínas) se puede usar para identificar nuevos polipéptidos y motivos de aminoácidos que son importantes para la unión a proteínas. La tecnología de fusión de ácido nucleico-proteína es una tecnología que acopla covalentemente una proteína a su información genética codificante. Para una descripción detallada de la tecnología de fusión de ARN-proteína y los métodos de selección de la biblioteca de proteínas estructurales basados en fibronectina, véase Szostak et al., patentes de Estados Unidos números 6.258.558; 6.261.804; 6.214.553; 6.281.344; 6.207.446; 6.518.018; publicaciones PCT números WO 00/34784; WO 01/64942; WO 02/032925; y Roberts et al., Proc Natl. Acad. Sci., 94:12297-12302 (1997).

#### Realizaciones de vectores y polinucleótidos

45 Los ácidos nucleicos que codifican cualquiera de las diversas proteínas que comprenden un resto FBS y un resto PmXn divulgados en el presente documento pueden sintetizarse de forma química, enzimática o recombinante. El uso del codón se puede seleccionar para mejorar la expresión en una célula. Dicho uso de codón dependerá del tipo de célula seleccionada. Se han desarrollado patrones de uso de codones especializados para *E. coli* y otras bacterias, así como células de mamíferos, células vegetales, células de levadura o células de insectos. Véanse, por ejemplo: Mayfield et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 100(2):438-442 (21 de Ene de 2003); Sinclair et al., Protein Expr. Purif., 26(1):96-105 (Oct. 2002); Connell, N.D., Curr. Opin. Biotechnol., 12(5):446-449 (Oct. 2001); Makrides et al., Microbiol. Rev., 60(3):512-538 (Sep. 1996); y Sharp et al., Yeast, 7(7):657-678 (Oct. 1991).

55 Las técnicas generales para manipular el ácido nucleico se describen, por ejemplo, en Sambrook et al., Molecular Cloning: A Laboratory Manual, segunda edición, Vol. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press (1989) o Ausubel, F. et al., Current Protocols in Molecular Biology, Green Publishing y Wiley-Interscience, Nueva York, 1987) y actualizaciones periódicas. El ADN que codifica el polipéptido está unido operativamente a elementos reguladores de la transcripción o la traducción adecuados derivados de genes de mamíferos, virus o insectos. Dichos elementos reguladores incluyen un promotor de la transcripción, una secuencia operadora opcional para controlar la transcripción, una secuencia que codifica sitios de unión al ribosoma de ARNm adecuados y secuencias que controlan la terminación de la transcripción y la traducción. Además, se incorpora la capacidad de replicarse en un hospedador, generalmente transmitida por un origen de replicación, y un gen de selección para facilitar el reconocimiento de transformantes.

65 Las proteínas descritas en el presente documento pueden producirse de forma recombinante no solo directamente, sino también como polipéptido con un polipéptido heterólogo, que es preferentemente una secuencia de señalización u otro polipéptido que tiene un sitio de escisión específico en el extremo N de la proteína o polipéptido maduro. La secuencia de señalización heteróloga seleccionada preferentemente es una que se reconoce y procesa (es decir,

escindida por una peptidasa de señalización) por la célula hospedadora. Para las células hospedadoras procariontas que no reconocen y procesan una secuencia de señalización nativa, la secuencia de señalización se sustituye por una secuencia de señalización procarionta seleccionada, por ejemplo, del grupo de la fosfatasa alcalina, penicilinas, Ipp, o líderes de la enterotoxina II estable al calor. Para secreción en levaduras, la secuencia de señalización natural puede sustituirse por, por ejemplo, el líder de invertasa de levadura, un líder de factor (incluidos los líderes del factor alfa de *Saccharomyces* y *Kluyveromyces*), o el líder de la fosfatasa ácida, el líder de glucoamilasa de *C. albicans*, o la señalización descrita en la publicación PCT n.º WO 90/13646. En la expresión en células de mamífero, están disponibles secuencias de señalización de mamíferos así como líderes secretorios víricos, por ejemplo, la señal gD del herpes simple. El ADN de dichas regiones precursoras puede unirse en un marco de lectura con el ADN que codifica la proteína.

Los vectores de expresión y de clonación contienen una secuencia de ácido nucleico que permite al vector replicarse en una o más células hospedadoras seleccionadas. En general, en los vectores de clonación, esta secuencia es una que permite al vector replicarse independientemente del ADN cromosómico del hospedador, e incluye orígenes de replicación o secuencias que se replican autónomamente. Dichas secuencias son bien conocidas para varias bacterias, levaduras, y virus. El origen de replicación para el plásmido pBR322 es adecuado para la mayoría de bacterias Gram-negativas, el origen del plásmido 2  $\mu$  es adecuado para las levaduras, y diversos orígenes víricos (SV40, poliovirus, adenovirus, VSV o BPV) son útiles para vectores de clonación en células de mamíferos. En general, el origen del componente de replicación no es necesario para vectores de expresión de mamífero (el origen de SV40 puede utilizarse de forma típica solamente porque contiene el promotor temprano).

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

Un gen de selección adecuado para su uso en levaduras es el gen *trp1* presente en el plásmido de levadura YRp7 (Stinchcomb et al., *Nature*, 282:39 (1979)). El gen *trp1* proporciona un marcador de selección para una cepa mutante de levadura que carece de la capacidad de crecer en triptófano, por ejemplo, ATCC® N.º 44076 o PEP4-1. Jones, *Genetics*, 85:12 (1977). La presencia de la lesión *trp1* en el genoma de la célula hospedadora de levadura proporciona, por tanto, un ambiente eficaz para detectar su transformación mediante crecimiento en ausencia de triptófano. Análogamente, las cepas de levadura deficientes en *Leu2* (ATCC® 20.622 o 38.626) se complementan mediante plásmidos conocidos que transportan el gen *Leu2*.

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

Son conocidas las secuencias promotoras para eucariotas. Virtualmente todos los genes eucariotas tienen una región rica en AT localizada aproximadamente a 25-30 bases en dirección 5' del sitio donde se inicia la transcripción. Otra secuencia encontrada a 70 a 80 bases en la dirección 5' del inicio de la transcripción de muchos genes es una región CNCAAT (SEQ ID NO: 109) donde N puede ser cualquier nucleótido. En el extremo 3' de la mayoría de genes eucariotas hay una secuencia AATAAA (SEQ ID NO: 110) que puede ser la señal para la adición de la cola de poli-A al extremo 3' de la secuencia de codificación. Todas estas secuencias se insertan de manera adecuada en vectores de expresión de eucariotas.

Los ejemplos de secuencias promotoras adecuadas para su uso con hospedadores de levaduras incluyen los promotores para la 3-fosfoglicerato cinasa u otras enzimas glicolíticas, tales como enolasa, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, hexocinasa, piruvato descarboxilasa, fosfofructocinasa, glucosa-6-fosfato isomerasa, 3-fosfoglicerato mutasa, piruvato cinasa, trifosfato isomerasa, fosfoglucosa isomerasa y glucocinasa.

Otros promotores de levadura, que son promotores inducibles que tienen la ventaja adicional de transcripción controlada por condiciones de crecimiento, son las regiones promotoras de alcohol deshidrogenasa 2, isocitocromo C, fosfatasa ácida, enzimas degradantes asociadas con el metabolismo del nitrógeno, metalotienina, gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenasa, y enzimas responsables de la utilización de la maltosa y la galactosa. Los vectores y promotores adecuados para su uso en la expresión de levaduras se describen además en la publicación de patente EP n.º 73.657 y en las publicaciones PCT números WO 2011/124718 y WO 2012/059486. También se usan de manera ventajosa potenciadores de levadura junto con promotores de levadura.

La transcripción a partir de vectores en células hospedadoras de mamíferos se puede controlar, por ejemplo, con promotores obtenidos de los genomas de virus tales como virus de poliovirus, virus de la viruela aviar, adenovirus (como

adenovirus 2), virus del papiloma bovino, virus del sarcoma aviar, citomegalovirus, un retrovirus, el virus de la hepatitis B y lo más preferible el virus 40 de simio (SV40), procedentes de promotores heterólogos de mamíferos, por ejemplo, el promotor ACTIN® o un promotor de la inmunoglobulina, de promotores de choque térmico, con la condición de que dichos promotores sean compatibles con los sistemas de células hospedadoras.

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

15 La transcripción de un ADN que codifica una proteína por eucariotas superiores a menudo aumenta cuando se inserta una secuencia potenciadora en el vector. En la actualidad se conocen muchas secuencias potenciadoras de genes de mamíferos (globina, elastasa, albúmina,  $\alpha$ -fetoproteína, e insulina). Por lo general, sin embargo, se usará un potenciador de un virus de una célula eucariótica. Los ejemplos incluyen el potenciador de SV40 en el lado posterior del origen de replicación (pb 100-270), el potenciador del promotor temprano del citomegalovirus, el potenciador del  
20 polioma en el lado posterior del origen de replicación y potenciadores de adenovirus. Véase también Yaniv, Nature, 297:17-18 (1982) sobre los elementos potenciadores para la activación de los promotores eucariotas. El potenciador se puede cortar y empalmar en el vector en una posición 5' o 3' de la secuencia que codifica el polipéptido, pero se localiza preferentemente en el sitio 5' a partir del promotor.

25 Los vectores de expresión utilizados en células hospedadoras eucariotas (por ejemplo, levadura, hongos, insecto, planta, animal, ser humano o células nucleadas de otros organismos multicelulares) también contendrán secuencias necesarias para la terminación de la transcripción y para estabilizar el ARNm. Dichas secuencias están comúnmente disponibles a partir de las regiones 5' y, ocasionalmente 3', no traducidas de ADN o ADNc eucariota o vírico. Estas regiones contienen segmentos de nucleótidos transcritos como fragmentos poliadenilados en la porción no traducida  
30 del ARNm que codifica el polipéptido. Un componente útil de terminación de la transcripción es la región de poliadenilación de la hormona de crecimiento bovina. Véase el documento WO 94/11026 y el vector de expresión divulgado en el anterior.

El ADN recombinante también puede incluir cualquier tipo de secuencia de marcador proteico que puede ser útil para purificar la proteína. Los ejemplos de marcadores de proteínas incluyen, aunque no de forma limitativa, un marcador de histidina, un marcador FLAG®, un marcador myc, un marcador HA o un marcador GST. Los vectores de clonación y expresión adecuados para su uso con hospedadores celulares bacterianos, fúngicos, de levaduras, y de mamíferos pueden encontrarse Cloning Vectors: A Laboratory Manual, Elsevier, Nueva York (1985).

40 La construcción de expresión puede introducirse en la célula hospedadora utilizando un método adecuado para la célula hospedadora, como será evidente para un experto en la materia. Se conocen en la técnica diversos métodos para introducir ácidos nucleicos en células hospedadoras, incluyendo, aunque no de forma limitativa, electroporación; transfección empleando cloruro de calcio, cloruro de rubidio, fosfato de calcio, DEAE-dextrano u otras sustancias; bombardeo de microproyectiles; lipofección; e infección (donde el vector es un agente infeccioso).

45 Las células hospedadoras adecuadas incluyen procariotas, levadura, células de mamífero o células bacterianas. Las bacterias adecuadas incluyen organismos gram negativos o gram positivos, por ejemplo, *E. coli* o *Bacillus* spp. Levaduras, preferentemente de la especie *Saccharomyces*, tal como *S. cerevisiae*, también pueden usarse en la producción de polipéptidos. También se pueden emplear diversos sistemas de cultivo de células de mamíferos o  
50 insectos para expresar proteínas recombinantes. Los sistemas de baculovirus para la producción de proteínas heterólogas en células de insecto se han revisado en Luckow et al. (BiolTechnology, 6:47 (1988)). Los ejemplos de líneas de células hospedadoras de mamíferos adecuadas incluyen células endoteliales, células de riñón de mono COS-7, CV-1, células L, C127, 3T3, ovario de hámster chino (CHO), células de riñón embrionario no humano, HeLa, 293, 293T y BHK. Las proteínas purificadas se preparan cultivando sistemas de hospedadores/vectores adecuados  
55 para expresar las proteínas recombinantes. La proteína FBS se purifica a continuación del medio de cultivo o extractos celulares.

#### Producción de proteínas

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

65 Las células hospedadoras utilizadas para producir las proteínas pueden cultivarse en diversos medios. Los medios comercialmente disponibles tales como de Ham F10 (Sigma), Medio esencial mínimo ((MEM), (Sigma)), RPMI-1640

(Sigma), medio Eagle modificado por Dulbecco ((DMEM), (Sigma)) son adecuados para el cultivo de las células hospedadoras. Además, cualquiera de los medios descritos en Ham et al., Meth. Enzymol., 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem., 102:255 (1980), patentes de Estados Unidos números 4.767.704; 4.657.866; 4.927.762; 4.560.655; o 5.122.469; publicaciones PCT números WO 90/03430; WO 87/00195; o la patente de Estados Unidos n.º 5 RE30.985 pueden usarse como medio de cultivo para las células hospedadoras. Cualquiera de estos medios puede complementarse según sea necesario con hormonas y/u otros factores de crecimiento (tales como insulina, transferrina o factor de crecimiento epidérmico), sales (tal como cloruro de sodio, calcio, magnesio y fosfato), tampones (tal como HEPES), nucleótidos (tales como adenosina y timidina), antibióticos (tales como el fármaco gentamicina), elementos traza (definidos como compuestos inorgánicos habitualmente presentes a concentraciones finales en el intervalo micromolar) y glucosa o una fuente de energía equivalente. También se pueden incluir cualesquiera otros suplementos necesarios a concentraciones adecuadas que conocerán los expertos en la materia. Las condiciones de cultivo, tales como la temperatura, pH y similares, son las utilizadas previamente con la célula hospedadora seleccionada para la expresión, y serán evidentes para el experto en la materia.

15 Las proteínas divulgadas en el presente documento pueden producirse también usando sistemas de traducción exentos de células. Con dicho fin, los ácidos nucleicos que codifican la proteína deben modificarse para permitir la transcripción *in vitro* para producir ARNm y para permitir la traducción sin células del ARNm en el sistema sin células que se utiliza (eucariótico, como un sistema de traducción sin células de mamíferos o levaduras, o procariótico, como un sistema de traducción sin células bacterianas).

20 Las proteínas también se pueden producir mediante síntesis química (por ejemplo, mediante los métodos descritos en Solid Phase Peptide Synthesis, segunda edición, The Pierce Chemical Co., Rockford, IL (1984)). Las modificaciones de la proteína también se pueden producir mediante síntesis química.

25 Las proteínas divulgadas en el presente documento pueden purificarse por métodos de aislamiento/purificación de proteínas generalmente conocidos en el campo de la química de proteínas. Los ejemplos no limitantes incluyen extracción, recristalización, desalación (por ejemplo, con sulfato de amonio o sulfato de sodio), centrifugación, diálisis, ultrafiltración, cromatografía de adsorción, cromatografía de intercambio iónico, cromatografía hidrófoba, cromatografía de fase normal, cromatografía de fase inversa, filtración en gel, cromatografía de permeación en gel, cromatografía de afinidad, electroforesis, distribución en contracorriente o cualquier combinación de estas. Después de la purificación, las proteínas pueden intercambiarse en diferentes tampones y/o concentrarse por cualquiera de varios métodos conocidos en la técnica, incluyendo, aunque no de forma limitativa, filtración y diálisis.

35 La proteína purificada es preferentemente al menos un 85% pura, más preferentemente al menos un 95% pura, y lo más preferentemente al menos un 98% o 99% pura. Independientemente del valor numérico exacto de la pureza, la proteína es lo suficientemente pura como para utilizarla como producto farmacéutico.

#### Usos ilustrativos

40 Las proteínas FBS modificadas se pueden usar para cualquier fin para el cual se pueden usar las proteínas FBS que no están modificadas mediante la adición de un resto PmXn.

45 En un aspecto, la solicitud proporciona proteínas que comprenden un resto FBS modificado que es útil en el tratamiento de trastornos. Las enfermedades o trastornos que se pueden tratar estarán determinados por la especificidad de unión del resto FBS. Como se describe en el presente documento, los restos FBS modificados se pueden diseñar para unirse a cualquier diana de interés. Las dianas ilustrativas incluyen, por ejemplo, TNF-alfa, VEGFR2, PCSK9, IL-23, EGFR e IGF1R. Simplemente como un ejemplo, los restos FBS modificados que se unen a TNF-alfa se pueden usar para tratar trastornos autoinmunitarios tales como artritis reumatoide, enfermedad inflamatoria del intestino, psoriasis y asma. Las proteínas FBS modificadas descritas en el presente documento se pueden utilizar también para tratar el cáncer.

50 En determinadas realizaciones, un método para tratar a un sujeto que tiene una enfermedad, por ejemplo, cáncer, comprende administrar al sujeto un conjugado de un fármaco FBS modificado.

55 Se proporcionan en el presente documento métodos para administrar proteínas a un sujeto. En algunas realizaciones, el sujeto es un ser humano. En algunas realizaciones, las proteínas son farmacéuticamente aceptables para un mamífero, en particular, un ser humano. Una composición "farmacéuticamente aceptable" se refiere a una composición que se administra a un animal sin consecuencias médicas adversas significativas. Los ejemplos de composiciones farmacéuticamente aceptables incluyen composiciones que comprenden restos FBS que carecen del dominio de unión a integrina (RGD) y composiciones que están esencialmente exentas de endotoxinas o pirógenos o tienen niveles muy bajos de endotoxinas o pirógenos.

65 Otros usos de las proteínas FBS modificadas descritas en el presente documento incluyen su uso en ensayos de detección *in vitro* o *in vivo*. Por ejemplo, se pueden usar para detectar una molécula diana en una muestra. Un método puede comprender poner en contacto la muestra con una FBS modificada descrita en el presente documento, en la que dicha puesta en contacto se lleva a cabo en condiciones que permiten la formación del complejo FBS diana; y detectar dicho complejo, detectando por tanto dicha diana en dicha muestra. La detección puede llevarse a cabo

utilizando cualquier técnica reconocida en la materia, tales como, por ejemplo, radiografía, inmunoensayo, detección por fluorescencia, espectroscopía de masas, o resonancia de plasmón superficial. La muestra puede ser de un ser humano u otro mamífero. Para fines diagnósticos, los agentes adecuados son marcadores detectables que incluyen radioisótopos, para la obtención de imágenes de cuerpo completo, y radioisótopos, enzimas, marcadores fluorescentes y otras etiquetas de anticuerpos adecuadas para el ensayo de las muestras.

En determinadas realizaciones, las FBS modificadas descritas en el presente documento son útiles en varias aplicaciones de diagnóstico y obtención de imágenes. En determinadas realizaciones, una FBS modificada se marca con un resto que es detectable *in vivo* y dicha FBS marcada se puede usar como agente de obtención de imágenes *in vivo*, por ejemplo, para la obtención de imágenes de cuerpo completo. Por ejemplo, en una realización, un método para detectar un tumor que comprende un antígeno dado en un sujeto comprende administrar al sujeto una FBS modificada unida a un marcador detectable, y tras un tiempo adecuado, detectar el marcador en el sujeto.

Un agente FBS de obtención de imágenes se puede usar para diagnosticar un trastorno o enfermedad asociado con niveles crecientes de un antígeno dado, por ejemplo, un cáncer en el que un tumor expresa en exceso selectivamente el antígeno. De una manera similar, se puede usar una FBS modificada que se une específicamente a un antígeno dado para controlar los niveles del antígeno en un sujeto que está siendo tratado de una dolencia asociada con el antígeno. La FBS modificada puede utilizarse con o sin modificación, y puede marcarse mediante unión covalente o no covalente de un resto detectable.

#### Formulación y administración

La solicitud proporciona además composiciones farmacéuticamente aceptables que comprenden las proteínas descritas en el presente documento, en las que la composición es esencialmente una endotoxina y/o está exenta de pirógenos.

Las formulaciones terapéuticas que comprenden proteínas se preparan para su almacenamiento mezclando las proteínas descritas que tienen el grado de pureza deseado con transportadores, excipientes o estabilizantes opcionales fisiológicamente aceptables, A., ed., Remington's Pharmaceutical Sciences, 16ª Edición (1980)), en la forma de soluciones acuosas, liofilizadas u otras formulaciones secas. Los transportadores, excipientes y/o estabilizantes aceptables no son tóxicos para los receptores a las dosis y concentraciones empleadas e incluyen tampones tales como fosfato, citrato y otros ácidos orgánicos; antioxidantes, incluyendo ácido ascórbico y metionina; conservantes (tales como cloruro de octadecildimetilbencil amonio; cloruro de hexametonio; cloruro de benzalconio, cloruro de bencetonio; fenol, alcohol butílico o bencílico; alquil parabenos tales como metil o propil parabeno; catecol; resorcinol; ciclohexanol; 3-pentanol; y m-cresol); polipéptidos de bajo peso molecular (menos de aproximadamente 10 restos); proteínas, tales como seroalbúmina, gelatina o inmunoglobulinas; polímeros hidrófilos tales como polivinilpirrolidona; aminoácidos tales como glicina, glutamina, asparagina, histidina, arginina o lisina; monosacáridos, disacáridos y otros hidratos de carbono incluyendo glucosa, manosa o dextranos; agentes quelantes tales como EDTA; azúcares tales como sacarosa, manitol, trehalosa o sorbitol; contraiones formadores de sales tales como sodio; complejos metálicos (por ejemplo complejos de Zn-proteína); y/o tensioactivos no iónicos, tales como Tween, PLURONIC® o polietilenglicol (PEG).

Las formulaciones del presente documento también pueden contener más de un principio activo según sea necesario para la indicación concreta que se está tratando, preferentemente los que tengan actividades complementarias que no se vean afectadas negativamente entre sí. Dichas moléculas están presentes de manera conveniente en combinación en cantidades que son eficaces para el fin que se pretende.

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

Las formulaciones que se van a usar para su administración *in vivo* deben ser estériles. Esto se lleva a cabo fácilmente mediante filtración a través de membranas de filtración estériles.

Se pueden preparar preparaciones de liberación sostenida. Los ejemplos adecuados de preparaciones de liberación sostenida incluyen matrices semipermeables de polímeros hidrófobos sólidos que contienen las proteínas descritas en el presente documento, estando dichas matrices en forma de artículos conformados, por ejemplo, películas o microcápsulas. Los ejemplos de matrices de liberación sostenida incluyen poliésteres, hidrogeles (por ejemplo, poli(2-hidroxietil-metacrilato) o poli(vinilalcohol)), polilactidas (patente de E.E.UU. n.º 3.773.919), copolímeros de ácido L-glutámico y  $\gamma$ -etil-L-glutamato, acetato de etileno-vinilo no degradable, copolímeros de ácido láctico-ácido glicólico degradables, tales como la serie LUPRON DEPOT® (microesferas inyectables compuestas por un copolímero de ácido láctico-ácido glicólico y acetato de leuprolida) y poli-ácido D-(-)-3-hidroxi-butírico. Aunque que los polímeros tales como acetato de etileno-vinilo y ácido láctico-ácido glicólico permiten la liberación de moléculas durante

aproximadamente 100 días, determinados hidrogeles liberan proteínas durante periodos de tiempo más cortos. Cuando las proteínas encapsuladas permanecen en el cuerpo durante un tiempo prolongado, se pueden desnaturar o agregar como resultado de la exposición a la humedad a 37°C, dando como resultado una pérdida de actividad biológica y posibles cambios en la inmunogenicidad. Se pueden diseñar estrategias racionales para la estabilización según el mecanismo involucrado. Por ejemplo, si se descubre que el mecanismo de agregación es la formación de un enlace S-S intermolecular a través de un intercambio tio-disulfuro, se puede lograr la estabilización modificando restos sulfhidrilo, liofilizando a partir de soluciones ácidas, controlando el contenido de humedad, usando aditivos adecuados y desarrollando composiciones de matrices poliméricas específicas.

10 Aunque que el técnico experto entenderá que la dosis de cada proteína dependerá de la identidad de la proteína, las dosis preferidas pueden variar de aproximadamente 10 mg/metro cuadrado a aproximadamente 2000 mg/metro cuadrado, más preferentemente de aproximadamente 50 mg/metro cuadrado a aproximadamente 1000 mg/metro cuadrado.

15 En aplicaciones terapéuticas, las proteínas se administran a un sujeto, en una forma de dosificación farmacéuticamente aceptable. Se pueden administrar por vía intravenosa como un bolo o mediante infusión continua durante un periodo de tiempo, por vías intramuscular, subcutánea, intraarticular, intrasínovial, intratecal, oral, tópica o inhalación. Se puede administrar también la proteína por las vías intratumoral, peritumoral, intralesional, o perilesional, para ejercer efectos terapéuticos tanto locales como sistémicos. Los transportadores, diluyentes, y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados son bien conocidos y los expertos en la materia pueden determinarlos según la situación clínica. Los ejemplos de transportadores, diluyentes y/o excipientes adecuados incluyen: (1) Solución salina tamponada con fosfato de Dulbecco, pH aproximadamente 7,4, que contiene aproximadamente de 1 mg/ml a 25 mg/ml de albúmina de suero humano, (2) solución salina al 0,9 % (NaCl al 0,9 % en p/v ), y (3) dextrosa al 5 % (en p/v). Los métodos de la presente invención se pueden llevar a la práctica *in vitro*, *in vivo*, o *ex vivo*.

25 La administración de proteínas, y uno o más agentes terapéuticos adicionales, administrados tanto simultánea como secuencialmente, se puede realizar como se ha descrito anteriormente para aplicaciones terapéuticas. Los expertos en la materia entenderán que los transportadores, diluyentes, y excipientes farmacéuticamente aceptables adecuados para la administración simultánea dependen de la identidad del agente terapéutico concreto que e está administrando.

30 Cuando se presenta en una forma farmacéutica acuosa, en lugar de liofilizada, la proteína normalmente se formulará a una concentración de aproximadamente 0,1 mg/ml a 100 mg/ml, aunque se permite una amplia variación fuera de estos intervalos. Para el tratamiento de enfermedades, la dosis adecuada de proteínas dependerá del tipo de enfermedad a tratar, la gravedad y evolución de la enfermedad, de si las proteínas se administran con fines preventivos o terapéuticos, la evolución de la terapia anterior, el historial clínico del paciente y la respuesta a la fusión, y el criterio del médico a cargo del tratamiento. La proteína se administra adecuadamente al paciente de una vez o en una serie de tratamientos.

#### Realizaciones ilustrativas

40 1. Una proteína estructural aislada basada en fibronectina (FBS) que comprende un dominio <sup>10</sup>Fn3, en la que el aminoácido del dominio <sup>10</sup>Fn3 que está situado en la posición correspondiente a la posición 94 del dominio <sup>10</sup>Fn3 natural definido en la SEQ ID NO:1 está directamente unido a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos PmXn, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1; y (ii) el resto PmXn proporciona una propiedad mejorada a la proteína FBS con respecto a la proteína FBS que no está unida al resto PmXn.

45 2. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en P (m es 1 y n es 0).

50 3. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en PP (m es 2 y n es 0).

4. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en PmXn, en la que n es 1-150.

55 5. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en PmXn, en la que n es 1-10.

6. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en PmXn, en la que n es 1-5.

60 7. La proteína FBS aislada de la realización 1, en la que el resto consiste en PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 61), PIEK (SEQ ID NO: 63), PIDKP (SEQ ID NO: 65), PIEKP (SEQ ID NO: 67), PIDKPS (SEQ ID NO: 69), PIEKPS (SEQ ID NO: 71), PIDKPC (SEQ ID NO: 73), PIEKPC (SEQ ID NO: 75), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83), PHHHHHH (SEQ ID NO: 87) o PCHHHHHH (SEQ ID NO: 86).

65 8. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-7, en la que la proteína <sup>10</sup>Fn3 es una proteína <sup>10</sup>Fn3 humana.

9. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-8, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

5 10. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-9, que comprende al menos una mutación de aminoácido en al menos un bucle o una región estructural.

10 11. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-10, que comprende la secuencia de aminoácidos LEVVAA(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>ISIN YRT (SEQ ID NO: 16), en las que (X)<sub>u</sub>, (X)<sub>v</sub>, (X)<sub>w</sub>, (X)<sub>x</sub>, (X)<sub>y</sub> y (X)<sub>z</sub> consisten en la secuencia de aminoácidos natural (SEQ ID NO: 1) o comprenden al menos una diferencia de un aminoácido con la secuencia natural correspondiente.

15 12. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-11, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 es al menos un 50 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, y en la que la proteína FBS se une específicamente a una diana con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, cuya diana no se une mediante una molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural que comprende la SEQ ID NO: 1.

13. La proteína FBS aislada de la realización 12, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 es al menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.

20 14. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-12, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 es al menos un 60 % idéntica a la SEQ ID NO: 1, y en la que la proteína FBS se une específicamente a una diana con una K<sub>d</sub> de menos de 500 nM, cuya diana no se une mediante una molécula <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural que comprende la SEQ ID NO: 1.

25 15. La proteína FBS aislada de cualquiera de las realizaciones 1-14, en la que al menos una X de P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es una cisteína.

30 16. La proteína FBS aislada de la reivindicación 10, en la que el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es P<sub>m</sub>CX<sub>n</sub> o P<sub>m</sub>X<sub>n</sub><sub>1</sub>CX<sub>n</sub><sub>2</sub>, en la que C es cisteína y n<sub>1</sub> y n<sub>2</sub> son independientemente 0 o un número entero que es al menos 1.

17. La proteína FBS aislada de la realización 15 o 16, en la que la cisteína se conjuga a un resto heterólogo.

18. La proteína FBS aislada de la realización 17, en la que la molécula heteróloga es un resto detectable.

35 19. La proteína FBS aislada de la realización 17 o 18, en la que la molécula heteróloga es un resto de fármaco y el resto de fármaco y la FBS forman un conjugado de FBS-fármaco.

40 20. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las realizaciones 1-19, en la que la propiedad potenciada conferida por el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es una estabilidad potenciada.

21. La proteína FBS aislada de la realización 20, en la que la estabilidad potenciada es un aumento en la T<sub>m</sub> de al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C o más.

45 Los siguientes Ejemplos representativos contienen información adicional, ilustración y directrices que se pueden adaptar a la práctica de la presente invención en sus diversas realizaciones y los equivalentes de las mismas. Se pretende que estos ejemplos ayuden a ilustrar la invención.

### Ejemplos

50 Ejemplo 1: Potenciación de la termoestabilidad añadiendo la prolina en el extremo C de las moléculas <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3

En la naturaleza, <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 forma parte de una cadena larga de dominios de tipo III de fibronectina; el dominio inmediatamente en la dirección 3' de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se denomina <sup>11</sup>F<sub>n</sub>3. La secuencia siguiente muestra las secuencias naturales de los dominios <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 (en cursivas) y <sup>11</sup>F<sub>n</sub>3 (en negrita) y la unión entre ellos (subrayada).

55

*VSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATIS*  
**GLKPGVDYITIVYAVTGRGDSPASSKPI****SIN****YRTE****IDKPSQ****MQVTDVQDNSISVKWLP**  
**SSSPVTGYRVTTTPKNGPGPTKTKTAGPDQ****TEM****TIEGLQPTVEYVVS****VYAQNPSG**  
**ESQPLVQTAVT** (SEQ ID NO: 90)

Basándose en las estructuras cristalinas y de RMN de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 y de la alineación de la secuencia entre <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 y <sup>11</sup>F<sub>n</sub>3

(Dickinson et al., "Crystal structure of the tenth type III cell adhesion module of human fibronectin", J. Mol. Biol., 36:1079-1092 (1994)), los primeros dos restos de esta secuencia, RT, forman parte de la hebra beta final de <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 ("hebra G"), y el resto de la secuencia, EIDKPSQ, es un enlazador flexible entre el décimo y undécimo dominios de tipo III estructurados de la fibronectina.

5 El extremo C de los dominios de la proteína diseñados mediante ingeniería genética en <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 se modifica a menudo a partir de la secuencia natural para facilitar su clonación, expresión y purificación. Durante una exploración de diferentes extremos C de adnectinas diseñados mediante ingeniería genética se encontró que una mutación de RTE a RTP ha conducido a una termoestabilidad aumentada de varias adnectinas diferentes. La Tabla 4 relaciona los  
10 diferentes extremos C utilizados en este estudio.

15 Tabla 4: Enlazador natural entre <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 y <sup>11</sup>F<sub>n</sub>3 y las secuencias del extremo C de la adnectina diseñadas mediante ingeniería genética que se compararon en este estudio. El "extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética con P y la etiqueta His" y "el extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética con PC" contienen la mutación RTE a RTP.

Descriptor	Secuencia	Propósito	Comentarios
La unión natural entre <sup>10</sup> F <sub>n</sub> 3 y <sup>11</sup> F <sub>n</sub> 3	RTEIDKPSQ (SEQ ID NO: 91)	la secuencia humana natural	contiene RTE
Extremo C largo diseñado mediante ingeniería genética con la etiqueta His	RTEIEKPSQH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 92)	H <sub>6</sub> permite la purificación mediante cromatografía de quelatos metálicos	contiene RTE; la mutación DK->EK redujo la sensibilidad a las proteasas
Extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética con P y la etiqueta His	RTPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 93)	H <sub>6</sub> permite la purificación mediante cromatografía de quelatos metálicos	contiene RTP
Extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética con EC	RTEC (SEQ ID NO: 94)	C permite la modificación específica de sitio usando la química de la maleimida	contiene RTE; sin etiqueta de purificación
Extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética con PC	RTPC (SEQ ID NO: 95)	C permite la modificación específica de sitio usando la química de la maleimida	contiene RTP; sin etiqueta de purificación

20 Se ensayó el efecto de la mutación de RTE a RTP sobre la termoestabilidad de las adnectinas comparando diversas parejas de adnectinas que diferían en su extremo C. La Tabla 5 describe las parejas de adnectinas usadas en este estudio, incluidos sus nombres, dianas, y propiedades termodinámicas. La adnectina 1 es una adnectina que se une a la diana X. Todas las adnectinas relacionadas se seleccionaron de bibliotecas de alta complejidad usando tecnología PROfusión (expresión del ARNm), y sus extremos C se rediseñaron mediante ingeniería genética con mutagénesis dirigida a sitio. Se muestran a continuación las secuencias completas de la proteína.

25 Tabla 5: Nombre del clon, Extremo C, diana, y temperatura de fusión (como se determinó mediante calorimetría de barrido diferencial a 0,5 mg/ml, en PBS, a pH 7,4). Se conjugaron las adnectinas PRD-1414 y PRD-1417 a PEG birramificado de 40 kDa, (NOF, n.º de Cat. GL2-400MA01)

Proteína ID (RTE) extremo C	Proteína ID (RTP) extremo C	Diana	T <sub>m</sub> (RTE)	T <sub>m</sub> (RTP)	Aumento en la T <sub>m</sub> de la proteína que contiene RTE sobre RTP
ADX_2382_D09 RTEIEKPSQH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 92)	ADX_5484_A03 RTPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 93)	PCSK9	84 °C	87 °C	+3 °C
ADX_2987_H07 RTEIEKPSQH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 92)	ADX_5484_A04 RTPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 93)	Miostatina	58 °C	57 °C	+1 °C
PRD-1414 RTEC-PEG (SEQ ID NO: 94)	PRD-1417 RTPC-PEG (SEQ ID NO: 95)	PCSK9	64 °C	78 °C	+ 12 °C
Adnectina 1 RTEIEKPSQH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 94)	Adnectina 1 RTPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 95)	X	61 °C	64 °C, 72 °C	+3 °C, +11 °C

Secuencias de aminoácidos de las proteínas usadas en este Ejemplo:

ADX\_2382\_D09:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS  
 KGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYYHRPISINYRTEIDKPSQHSHHHHHH\*  
 (SEQ ID NO: 96)

5

ADX\_5484\_A03:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS  
 KGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYYHRPISINYRTPHSHHHHHH\* (SEQ ID  
 NO: 97)

10

ADX\_2987\_H07:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG  
 RGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTEIDKPSQHSHHHHHH\*  
 (SEQ ID NO: 97)

15

ADX\_5484\_A04:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWTLPHAGRAHYRITYGETGGNSPVQEFTVPG  
 RGVTATISGLKPGVDYTITVYAVTVTTTKVIHYKPISINYRTPHSHHHHHH\* (SEQ ID  
 NO: 98)

PRD-1414:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS  
 KGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYYHRPISINYRTEC\* (SEQ ID NO: 99)

20

PRD-1417:

MGVSDVPRDLEVVAATPTSLLISWDAPAEGYGYRITYGETGGNSPVQEFTVPVS  
 KGTATISGLKPGVDYTITVYAVEFDGAGYYHRPISINYRTPC\* (SEQ ID NO:  
 100)

25

La "\*" en cada secuencia anterior denota el codón de detención, y el extremo C de cada adnectina.

Se retiró M del extremo N durante la expresión bacteriana de cada proteína. Los restos C en las proteínas PRD-1414 y PRD-1417 purificadas se conjugaron a PEG antes de la caracterización de cada proteína.

30

Como se muestra en la Tabla 5, las adnectinas con extremos C que contienen una prolina en lugar del ácido glutámico natural en el extremo C (mutación RTE a RTP) muestran una mayor termoestabilidad. Se observó este aumento en la estabilidad en varios ejemplos cuando un extremo C más largo, modelado sobre el enlazador natural entre <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 y <sup>11</sup>F<sub>n</sub>3 se sustituyó con un extremo C más corto diseñado mediante ingeniería genética que contenía solo la prolina y una etiqueta de purificación de la hexahistidina. Se observó también una termoestabilidad potenciada en una proteína <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que tenía un extremo C corto diseñado mediante ingeniería genética y un polietilenglicol (PEG) tras la adición de una prolina en la prolina del extremo C. El aumento en la estabilidad puede atribuirse a la presencia de una prolina en esta posición específica.

35

Ejemplo 2: Estabilización de la segunda adnectina PCSK9 con una prolina en el extremo C

Este ejemplo muestra que la termoestabilidad de otra molécula de adnectina PCSK9 está también potenciada por la adición de una prolina en el extremo C.

En este ejemplo, el extremo C de la adnectina PCSK9 pegilada (PEG ramificada de 40kDa) ADX\_2013\_E01 se modificó a partir de NYRTEIEKPCQ (SEQ ID NO: 101) a NYRTPC (SEQ ID NO: 102) y se midió la termoestabilidad mediante TSF. Se proporciona la secuencia de aminoácidos de esta adnectina en el documento WO 2011/130354 que describe generalmente las proteínas del dominio estructural basado en fibronectina que se unen a PCSK9. Los resultados indican que la adnectina pegilada con el extremo C NYRTEIEKPCQ (SEQ ID NO: 101) tiene una Tm de 70 °C, mientras que la adnectina pegilada con el extremo C de NYRTPC (SEQ ID NO: 102) tiene una Tm de 76 °C.

Por lo tanto, la termoestabilidad de esta adnectina PCSK9 se potenció en 6 °C por la presencia de una prolina en el extremo C.

Ejemplo 3: Comparación de diversos extremos C sobre la termoestabilidad

Este ejemplo muestra una comparación de la termoestabilidad de las adnectinas con o sin una prolina en su extremo C, así como adnectinas que tienen 2 prolinas en su extremo C.

Dos de las adnectinas descritas en el Ejemplo 1 (ADX\_2392\_D09 se une a PCSK9 y ADX\_2987\_H07 se une a miostatina) y una adnectina adicional se une a una diana diferente (la adnectina 1, se une a la diana X) se modificaron en su extremo C, como se indica en la Tabla 6, y se determinaron su termoestabilidad y el % de monómeros. Se modificó también una adnectina ("Adnectina 1") por una diana diferente con las mismas secuencias en el extremo C. Se determinó la termoestabilidad mediante TSF y el % de monómeros mediante SEC.

Tabla 6: Porcentaje de monómeros y termoestabilidad de las adnectinas con diversos extremos C

Precursor \ extremo C.	NYRTEIEKPSQH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 103)	NYRTH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 104)	NYRTPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 105)	NYRTPPH <sub>6</sub> (SEQ ID NO: 106)
ADX_2392_D09 PCSK9	>99 % 84 °C	>99 % 83 °C	>99 % 87 °C	99 % 87 °C
ADX_2987_H07 Miostatina	99 % 56 °C	>99 % 51 °C	>99 % 57 °C	>99 % 57 °C
Adnectina 1 Diana X	~ 8 % 61 °C	>99 % 58 °C	>98 % 64 °C, 72 °C	>98 % 64 °C, 72 °C

Los resultados, que se indican en la Tabla 6, muestran que la identidad del extremo C no tiene efecto significativo sobre el % de monómeros, sin embargo, tiene efectos sobre la temperatura de fusión (Tm). Como se describe en el Ejemplo 1, NYRTPH<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 105) aumenta la termoestabilidad con respecto a NYRTH<sub>6</sub> (SEQ ID NO: 104) de ambas adnectinas: en 4 °C para la adnectina PCSK9 y en 6 °C para la adnectina miostatina. Además, la presencia de una segunda prolina proporciona un efecto estabilizante que es similar al proporcionado por una única prolina.

Por lo tanto, la presencia de una o dos prolinas en el extremo C potencia la termoestabilidad de las adnectinas con respecto a la misma molécula sin la(s) prolina(s) en el extremo C.

Ejemplo 4: La adición de una prolina en el extremo C potencia la solubilidad

Este ejemplo demuestra que la presencia de una prolina en el extremo C potencia la solubilidad de una adnectina en tándem con respecto a la misma adnectina en tándem sin la prolina en el extremo C.

Una adnectina en tándem, es decir, dos adnectinas unidas cada una a una diana diferente unida mediante un enlazador, y que contienen tanto un extremo C NYRTE (SEQ ID NO: 107) o un extremo C NYRTP (SEQ ID NO: 108) se expresaron en células BLR de *E. coli* y fermentaron a 30 °C. El título del tándem sin la prolina fue de 1,2 g/l de proteína soluble y 2,8 g/l de proteína total, indicando que la proteína expresada era un 43 % soluble. El título del tándem con la prolina fue de 2,56 g/l solubles y 2,61 g/l totales. Incluso tras renaturalizar la fracción insoluble del tándem sin la prolina, y obteniendo una solución que era un 98 % pura y monomérica a 2,5 mg/ml, esta composición de proteínas no muestra una significativa unión con su diana, lo que sugiere que puede no replegarse adecuadamente.

Por lo tanto, considerando que la única diferencia entre las dos proteínas era la presencia de una E frente a una P en el extremo C, los resultados sugieren que la presencia de una prolina proporciona una solubilidad potenciada del tándem.

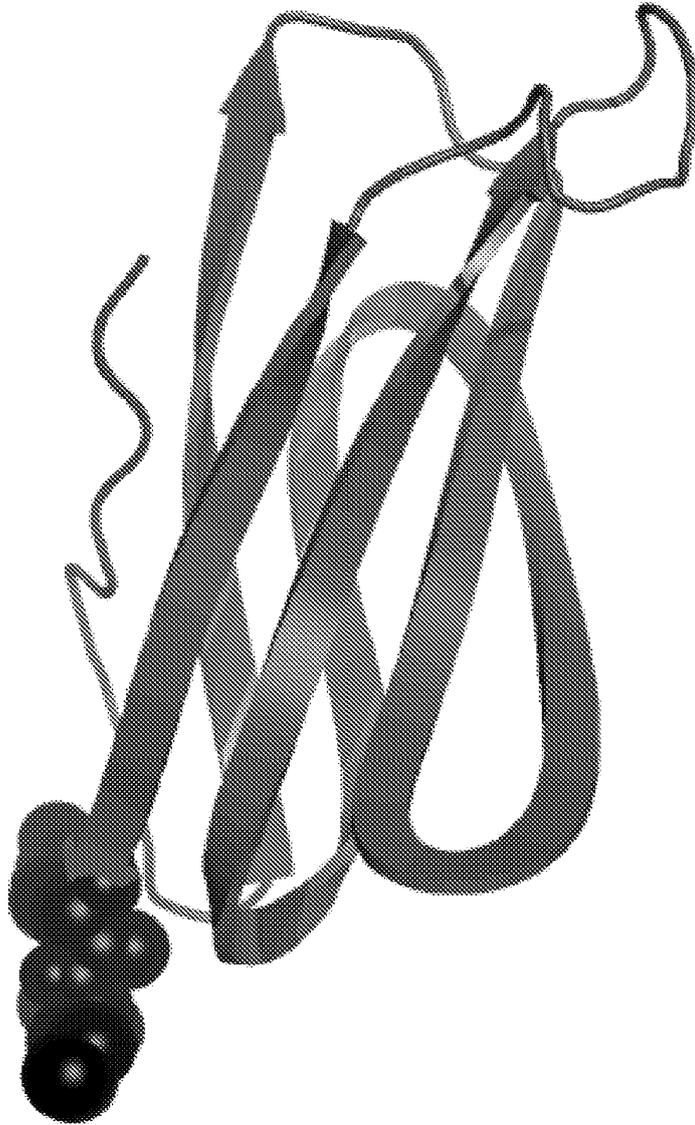
Se pretende que las realizaciones divulgadas en el presente documento sean ilustraciones de aspectos individuales de la invención. Serán evidentes diversas modificaciones de los modelos y métodos de la invención, además de los descritos anteriormente, para los expertos en la materia a partir de la siguiente descripción y enseñanzas, y se pretende de manera similar que se encuentren comprendidas en el alcance de la invención.

5

## REIVINDICACIONES

1. Una proteína estructural aislada basada en fibronectina (FBS) que comprende un dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3, en la que
- 5 (i) el aminoácido del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 que está situado en la posición correspondiente a la posición 94 del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 natural definido en la SEQ ID NO:1 está directamente unido a un resto que consiste en la secuencia de aminoácidos P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en la que P es prolina, X es cualquier aminoácido, m es un número entero que es al menos 1 y n es 0 o un número entero que es al menos 1; y
- 10 (ii) el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> proporciona una propiedad mejorada a la proteína FBS con respecto a la proteína FBS que no está unida al resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>.
2. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en P (m es 1 y n es 0).
3. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en PP (m es 2 y n es 0).
- 15 4. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en donde n es 1-150.
5. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en donde n es 1-10.
- 20 6. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en P<sub>m</sub>X<sub>n</sub>, en donde n es 1-5.
7. La proteína FBS aislada de la reivindicación 1, en la que el resto consiste en PI, PC, PID, PIE, PIDK (SEQ ID NO: 61), PIEK (SEQ ID NO: 63), PIDKP (SEQ ID NO: 65), PIEKP (SEQ ID NO: 67), PIDKPS (SEQ ID NO: 69), PIEKPS (SEQ ID NO: 71), PIDKPC (SEQ ID NO: 73), PIEKPC (SEQ ID NO: 75), PIDKPSQ (SEQ ID NO: 77), PIEKPSQ (SEQ ID NO: 79), PIDKPCQ (SEQ ID NO: 81), PIEKPCQ (SEQ ID NO: 83), PHHHHHH (SEQ ID NO: 87) o PCHHHHHH (SEQ ID NO: 86).
- 25 8. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-7, que comprende la secuencia de aminoácidos LEVVAA(X)<sub>u</sub>LLISW(X)<sub>v</sub>YRITY(X)<sub>w</sub>FTV(X)<sub>x</sub>ATISGL(X)<sub>y</sub>YTITVYA(X)<sub>z</sub>ISINYRT (SEQ ID NO: 16), en donde (X)<sub>u</sub>, (X)<sub>v</sub>, (X)<sub>w</sub>, (X)<sub>x</sub>, (X)<sub>y</sub> y (X)<sub>z</sub> consisten en la secuencia de aminoácidos natural (SEQ ID NO: 1) o comprenden al menos una diferencia de un aminoácido con la secuencia natural correspondiente.
- 30 9. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-8, en la que la secuencia de aminoácidos del dominio <sup>10</sup>F<sub>n</sub>3 es al menos un 70 % idéntica a la SEQ ID NO: 1.
- 35 10. La proteína FBS aislada de cualquiera de las reivindicaciones 1 y 4-9, en la que al menos una X de P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es una cisteína.
- 40 11. La proteína FBS aislada de la reivindicación 10, en la que el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es P<sub>m</sub>CX<sub>n</sub> o P<sub>m</sub>X<sub>n</sub><sub>1</sub>CX<sub>n</sub><sub>2</sub>, en donde C es cisteína y n<sub>1</sub> y n<sub>2</sub> son independientemente 0 o un número entero que es al menos 1.
12. La proteína FBS aislada de la reivindicación 10 o la reivindicación 11, en la que la cisteína está conjugada a un resto heterólogo, y opcionalmente está conjugada a una molécula heteróloga que es un resto detectable.
- 45 13. La proteína FBS aislada de la reivindicación 12, en la que la molécula heteróloga es un resto de fármaco y el resto de fármaco y la FBS forman un conjugado de FBS-fármaco.
14. La proteína FBS aislada de una cualquiera de las reivindicaciones 1-13, en la que la propiedad potenciada conferida por el resto P<sub>m</sub>X<sub>n</sub> es una estabilidad potenciada.
- 50 15. La proteína FBS aislada de la reivindicación 14, en la que la estabilidad potenciada es un aumento en la T<sub>m</sub> de al menos 1 °C, 2 °C, 3 °C, 4 °C, 5 °C o más.

FIG. 1



RDLEVVAATPTSLLISWDAPAVTVRYRITYGETGGNSPVQEFTVPGSKSTATISGLK  
PGVDYTITVYAVTGRGDSPASSKPISINYRTEI